



**DAIANA DE FÁTIMA SOUSA PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Metarhizium*  
spp. E DA DELTAMETRINA NA MORFOLOGIA DO  
INTEGUMENTO E DO OVÁRIO DE *Rhipicephalus microplus*  
(ACARI: IXODIDAE)**

**LAVRAS - MG  
2025**

**DAIANA DE FÁTIMA SOUSA PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Metarhizium* spp. E DA  
DELTAMETRINA NA MORFOLOGIA DO INTEGUMENTO E DO OVÁRIO DE  
*Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio  
Orientador

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração  
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com  
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Daiana de Fátima Sousa.

Avaliação dos efeitos dos extratos de *Metarhizium* spp. e da deltametrina na morfologia do integumento e do ovário de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) / Daiana de Fátima Sousa Pereira. - 2025.

88 p. : il.

Orientador: Rafael Neodini Remedio

Coorientador: Filipe Elias de Freitas Soares

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Controle de carrapatos. 2. Carrapato-do-boi. 3. Fungos. 4. Enzimas. 5. Histopatologia. I. Remedio, Rafael Neodini . II. Soares, Filipe Elias de Freitas. III. Universidade Federal de Lavras. IV. Título.

**DAIANA DE FÁTIMA SOUSA PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Metarhizium* spp. E DA DELTAMETRINA NA MORFOLOGIA DO INTEGUMENTO E DO OVÁRIO DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF EXTRACTS OF *Metarhizium* spp. AND DELTAMETRIN ON THE MORPHOLOGY OF THE INTEGUMENT AND OVARY OF *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de julho de 2025  
Dr. Isaac Filipe Moreira Konig, UFMT  
Dr. José Ribamar Lima de Souza, UFAC  
Dr. Rodrigo Avelaira Barbosa, UFLA

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio  
Orientador

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2025**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida e por me capacitar para a realização deste curso.

Agradeço ao meu pai Sebastião, que nunca mediu esforços e sempre me incentivou para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. Agradeço à minha mãe Ana Maria (*in memoriam*), por seu exemplo de fé, coragem, bondade e amor ao próximo. Agradeço à minha madrinha Maria (*in memoriam*), pelo amor incondicional. Aos meus irmãos Daniela e Danilo, pela amizade, companheirismo e presença constante em minha vida. Ao meu noivo Adeilson, pela compreensão, carinho, amor e cuidado. Agradeço a toda minha família por sempre estar presente.

Agradeço ao meu orientador, professor Rafael Neodini Remedio, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pela paciência, confiança, disponibilidade e exemplo de profissionalismo. Ao meu coorientador, professor Filippe Elias de Freitas Soares, pelo apoio e relevantes contribuições durante a condução deste trabalho.

Agradeço à Aline Chaves Reis, pela amizade e por ter se mostrado disponível em todos os momentos que precisei, sempre com entusiasmo e boa vontade.

Agradeço aos membros da banca examinadora, professores José Ribamar Lima de Souza e Rodrigo Avelaira Barbosa, por terem aceito participar e contribuir com esta dissertação, bem como pelas valiosas sugestões durante a banca de qualificação.

Agradeço à UFLA, ao Departamento de Medicina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade e por terem concedido todas as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica Aplicada, pelo apoio.

Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado, essencial para a conclusão desta etapa da minha formação acadêmica. (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001).

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa!

Muito obrigada!

## RESUMO

Os carrapatos *Rhipicephalus microplus* são responsáveis por grandes prejuízos na pecuária. Entre os danos causados aos seus hospedeiros preferenciais, os bovinos, estão a transmissão de patógenos, diminuição de produtividade e danos ao couro. A principal forma de controle desses ectoparasitos é o uso de produtos acaricidas sintéticos. Entretanto, essas substâncias, principalmente quando utilizadas de maneira incorreta, geram efeitos adversos, como o acúmulo de resíduos nos produtos de origem animal e no meio ambiente, além de favorecer a seleção de cepas de carrapatos resistentes. Nesse contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas de controle. O uso de extratos fúngicos, que podem ser obtidos a partir da fermentação de *Metarhizium anisopliae* (MA) e *Metarhizium robertsii* (MR), por exemplo, pode ser uma alternativa promissora, por conterem substâncias biodegradáveis e altamente específicas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos extratos ativos e desnaturados de MA IP119 e MR IP146, aplicados de forma isolada ou acrescida do acaricida sintético deltametrina, sobre a mortalidade e a morfologia do integumento e do ovário de *R. microplus*. Para isso, os carrapatos foram imersos nos diferentes tratamentos e observados diariamente, durante sete dias, para avaliação de mortalidade e coleta de amostras de integumento e ovário. As lâminas histológicas foram confeccionadas conforme técnicas de rotina e os órgãos foram avaliados por meio de análises morfométrica e semiquantitativa. Como resultados, foi observada mortalidade de carrapatos expostos aos extratos fúngicos, enquanto a adição de deltametrina resultou em efeitos distintos entre os grupos. As principais alterações morfológicas encontradas no integumento foram cutícula com morfologia alterada, desaparecimento das subdivisões cuticulares, ausência parcial da subcutícula, estratificação e desorganização epitelial e núcleos picnóticos. Na análise semiquantitativa desse órgão, os tratamentos com ambos os extratos de *M. anisopliae*, aplicados de forma isolada ou associada à deltametrina, assim como o grupo exposto apenas ao extrato desnaturado de *M. robertsii*, apresentaram médias dos índices individuais maiores em relação ao grupo controle. No ovário, foram observados ovócitos com formato irregular, vacuolização citoplasmática e nucleolar e irregularidades e espessamento do córion. Na análise semiquantitativa desse órgão, todos os grupos de tratamento apresentaram médias dos índices individuais maiores do que o grupo controle. Desta forma, os resultados demonstraram que os extratos de *Metarhizium* spp. afetaram negativamente o integumento e o ovário, com potencial contribuição para o controle de *R. microplus*.

**Palavras-chave:** controle de carrapatos; carrapato-do-boi; fungos; enzimas; histopatologia.

## ABSTRACT

*Rhipicephalus microplus* ticks are responsible for significant losses in livestock production. Among the damage caused to their preferred hosts, cattle, are the transmission of pathogens, reduced productivity, and skin damage. The primary method of controlling these ectoparasites is the use of synthetic acaricides. However, these substances, especially when misused, can lead to adverse effects such as the accumulation of residues in animal-derived products and the environment, as well as the selection of resistant tick strains. In this context, it is necessary to develop new control alternatives. The use of fungal extracts, which can be obtained from the fermentation of *Metarhizium anisopliae* (MA) and *Metarhizium robertsii* (MR), for example, represents a promising alternative, as they contain biodegradable and highly specific substances. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of active and denatured extracts of MA IP119 and MR IP146, applied either alone or in combination with the synthetic acaricide deltamethrin, on the mortality of ticks and morphology of the integument and ovaries of *R. microplus*. To achieve this, ticks were immersed in different treatment solutions and observed daily for seven days to assess mortality and to collect integument and ovary samples. Histological slides were prepared using standard techniques, and the organs were evaluated through morphometric and semiquantitative analyses. The results showed tick mortality in groups exposed to fungal extracts, while the addition of deltamethrin led to distinct effects among the groups. The main morphological changes observed in the integument included altered cuticle morphology, disappearance of cuticular subdivisions, partial absence of the subcuticle, epithelial stratification and disorganization, and pyknotic nuclei. In the semiquantitative analysis, treatments with both *M. anisopliae* extracts, applied alone or in association with the synthetic acaricide, as well as the group exposed to the denatured extract of *M. robertsii*, showed higher individual index averages compared to the control group. Among the alterations observed in the ovaries were oocytes with irregular shapes, cytoplasmic and nucleolar vacuolization, and irregularities and thickening of the chorion. In the semiquantitative analysis, all treatment groups exhibited higher individual index averages than the control group. Thus, the results demonstrated that *Metarhizium* spp. extracts negatively affected the integument and ovaries, with potential implications for the control of *R. microplus*.

**Keywords:** tick control; cattle tick; fungi; enzymes; histopathology.

## INDICADORES DE IMPACTO

O presente estudo aborda o uso potencial de extratos de *Metarhizium* spp. no controle de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, considerando a crescente resistência aos acaricidas sintéticos, bem como os impactos ambientais e os prejuízos à saúde de espécies não-alvo decorrentes do uso indiscriminado dos acaricidas sintéticos. Os extratos foram testados isoladamente ou associados ao acaricida sintético deltametrina, sendo observada mortalidade e alterações na morfologia externa e interna desses ectoparasitos. Potencialmente, esses resultados podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos ou formulações, que sejam sustentáveis, seguros e eficazes no controle de *R. microplus*. Os impactos desse estudo se enquadram nas áreas de Meio Ambiente e Saúde da Política Nacional de Extensão. Adicionalmente, contribui para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), especialmente Saúde e Bem-Estar (ODS 3) e Consumo e Produção Responsáveis (ODS 12). Isso porque o controle de carrapatos por meio de acaricidas naturais pode reduzir o uso extensivo dos acaricidas sintéticos e, conseqüentemente, minimizar a contaminação ambiental e a presença de resíduos tóxicos em produtos de origem animal, contribuindo, portanto, para a conservação ambiental e a saúde de animais e humanos.

## IMPACT INDICATORS

This study addresses the potential use of *Metarhizium* spp. extracts in the control of *Rhipicephalus microplus* ticks, considering the increasing resistance to synthetic acaricides, as well as the environmental impacts and harm to non-target species resulting from their indiscriminate use of synthetic acaricides. The extracts were tested either alone or in combination with the synthetic acaricide deltamethrin, and tick mortality and internal morphological changes were observed. These results can potentially contribute to the development of new products or formulations that are sustainable, safe, and effective for the control of *R. microplus*. The impacts of this study fall within the Environmental and Health areas of the National Extension Policy. Additionally, it contributes to the United Nations (UN) Sustainable Development Goals (SDGs), particularly Good Health and Well-Being (SDG 3) and Responsible Consumption and Production (SDG 12). This is because tick control through natural acaricides can reduce the extensive use of synthetic acaricides and, consequently, minimize environmental contamination and the presence of toxic residues in animal-derived products, thereby contributing to environmental conservation and the health of animals and humans.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
2.1 Carrapatos .....	12
2.1.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	13
2.1.2 Morfologia do integumento de carrapatos .....	14
2.1.3 Morfologia do ovário de carrapatos .....	16
2.2 Controle de carrapatos .....	18
2.2.1 Piretroides sintéticos .....	19
2.2.2 Controle alternativo .....	20
2.2.3 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	22
2.2.4 <i>Metarhizium robertsii</i> .....	24
2.2.5 Enzimas .....	26
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Obtenção dos extratos de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Metarhizium robertsii</i> .....	30
4.2 Ensaio de atividade enzimática .....	30
4.2.1 Atividade total de proteases .....	30
4.2.2 Atividade total de quitinases .....	31
4.3 Carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	31
4.4 Teste de Imersão de Adultos .....	32
4.5 Análises histológicas e histoquímicas .....	34
4.6 Análises morfométricas e semiquantitativas .....	34
4.7 Análise estatística .....	36
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 Atividade total de proteases .....	37
5.2 Atividade total de quitinases .....	37

5.3 Mortalidade de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	37
5.4 Análise histopatológica do integumento.....	39
5.4.1 Grupo Controle .....	39
5.4.2 Tratamento com <i>M. anisopliae</i> .....	39
5.4.3 Tratamento com <i>M. robertsii</i> .....	41
5.4.4 Grupo Deltametrina .....	42
5.5 Análise semiquantitativa do integumento.....	46
5.6 Análise morfométrica do integumento .....	50
5.7 Análise histopatológica do ovário .....	52
5.7.1 Grupo Controle .....	52
5.7.2 Tratamento com <i>M. anisopliae</i> .....	52
5.7.3 Tratamento com <i>M. robertsii</i> .....	54
5.7.4 Grupo Deltametrina .....	55
5.8 Análise semiquantitativa do ovário .....	59
5.9 Análise morfométrica do ovário .....	62
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das atividades mais importantes para a economia brasileira, sendo fonte de emprego e renda para produtores e de alimentos para bilhões de famílias rurais e urbanas (Herrero *et al.*, 2013). O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, com cerca de 238,6 milhões de cabeças (IBGE, 2023). Nesse contexto, os carrapatos constituem uma das principais ameaças à bovinocultura, afetando a produtividade, a saúde e o bem-estar animal (Alonso-Díaz; Fernández-Salas, 2021). Por serem importantes vetores de patógenos que afetam a saúde de humanos e animais, estão incluídos no conceito de “One Health” ou “Saúde Única”, que reconhece as interações entre a saúde ambiental, animal e humana, destacando a ligação e a interdependência entre esses componentes. Além disso, o aumento na incidência das doenças transmitidas por esses ectoparasitos pode ser influenciado por diversos fatores, como mudanças climáticas, características do hospedeiro e comportamento humano (Machtinger *et al.*, 2024).

A espécie *Rhipicephalus microplus* é a mais importante para bovinos em regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, vem expandindo seu alcance, devido às mudanças climáticas e ao intenso comércio de animais (Oyen; Poh, 2025). A infestação por esses ectoparasitos gera perdas econômicas severas aos produtores, considerando que podem acarretar anemia, estresse, redução nas produções de carne e leite e danos à pele e ao couro. Além disso, atuam na transmissão de patógenos causadores da babesiose e anaplasiose bovinas (Desta, 2016).

Atualmente, o principal método empregado no controle de carrapatos é o uso de acaricidas sintéticos (Oyen; Poh, 2025; Waldman *et al.*, 2023), como a deltametrina (Achi *et al.*, 2022). Entretanto, para o controle racional e sustentável desses ectoparasitos, torna-se necessário conhecer sua ecologia e epidemiologia. Isso porque o uso prolongado e incorreto dessas substâncias favorece a seleção de linhagens resistentes (Desta, 2016), como já relatado para diversas cepas de *R. microplus* (Janer *et al.*, 2021; Ouedraogo *et al.*, 2021; Oyen; Poh, 2025). Ademais, seus resíduos podem ser encontrados em produtos de origem animal e no meio ambiente (Raynal *et al.*, 2013), gerando efeitos adversos para plantas, humanos e animais (Sifuna *et al.*, 2025). Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de controle (Alonso-Díaz; Fernández-Salas, 2021).

Os fungos entomopatogênicos são capazes de infectar artrópodes na natureza, de forma enzoótica ou epizootica (Mora; Castilho; Fraga, 2017). Por isso, desde meados do século XIX, vêm sendo utilizados no controle biológico de insetos (Schrank; Vainstein, 2010), sendo

empregados, atualmente, no controle de diversas pragas agrícolas (Mondal *et al.*, 2016). Dentre esses fungos estão *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, espécies cosmopolitas encontradas no solo, com capacidade de infectar uma grande variedade de artrópodes (Hu *et al.*, 2014).

Sua patogenicidade se deve à produção de compostos biologicamente ativos (Dhanapal *et al.*, 2024), com propriedades antioxidantes (Isaka *et al.*, 2005), antibacterianas (Shin *et al.*, 2013), antifúngicas, antivirais, inseticidas e citotóxicas (Wang; Xu, 2012). Dentre esses compostos, estão enzimas como lipases, proteases e quitinases, essenciais para a degradação da cutícula de seu hospedeiro durante o processo infeccioso (Mondal *et al.*, 2016). Essas enzimas também podem estar presentes em extratos, obtidos a partir da fermentação dos fungos em diferentes meios de cultura (Figuroa *et al.*, 2024).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a mortalidade e os efeitos morfológicos no integumento e no ovário de carrapatos *R. microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*, aplicados de forma isolada ou em associação com a deltametrina. O material foi avaliado em microscopia de luz, por meio de análises morfométrica e semiquantitativa.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Carrapatos

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios de ampla distribuição mundial (Bhowmick; Han, 2020; Jamil *et al.*, 2022; Obaid *et al.*, 2022). Possuem como hospedeiros animais vertebrados terrestres: anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Keirans; Durden, 2005), e se desenvolvem em quatro estágios distintos: ovo, larva, ninfa e adultos (Estrada-Peña, 2015).

Algumas espécies possuem importância médica e veterinária (Dantas-Torres *et al.*, 2019; Nwanade; Yu; Liu, 2020), por atuarem na transmissão de agentes patogênicos, como bactérias, protozoários e vírus (Ossa-López *et al.*, 2023). Os carrapatos são considerados o segundo principal vetor de doenças para humanos, depois dos mosquitos, e o principal vetor de patógenos para animais (Fuente *et al.*, 2008). Além disso, podem causar problemas diretos aos seus hospedeiros, como irritação, prurido, alergias, toxicoses e paralisias (Jongejan; Uilenberg, 2004).

Esses ectoparasitos estão classificados no filo Arthropoda, classe Arachnida e ordem Ixodida (Taylor; Coop; Wall, 2017). Atualmente, são reconhecidas mais de 900 espécies de carrapatos, divididas em três famílias: Ixodidae, que abrange mais de 700 espécies; Argasidae, com mais de 200 espécies; e Nuttalliellidae, que compreende uma única espécie (Nava *et al.*, 2017).

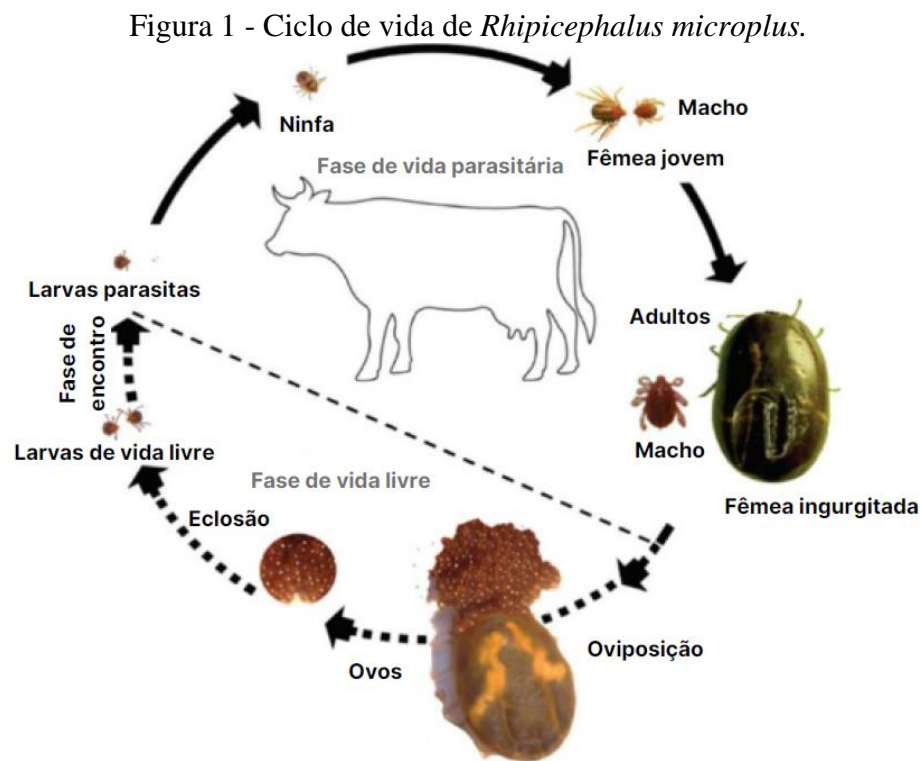
Os carrapatos da família Ixodidae possuem um escudo na região dorsal do seu corpo ou idiossoma, por isso, são conhecidos como “carrapatos duros”. Os carrapatos da família Argasidae (“carrapatos moles”), por sua vez, possuem um integumento coriáceo, sem a presença do escudo dorsal (Mans *et al.*, 2011). A espécie *Nuttalliella namaqua* é a única pertencente à família Nuttalliellidae. Possui características distintas dos carrapatos das outras duas famílias e é considerada a espécie viva mais próxima da linhagem ancestral dos carrapatos (Ledwaba; Malatji, 2024).

No Brasil, é descrita a ocorrência de cerca de 70 espécies de carrapatos. Destas, 23 espécies pertencem à família Argasidae, e estão incluídas nos gêneros *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis* e *Ornithodoros*. As outras 47 espécies pertencem à família Ixodidae e estão classificadas nos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*. Duas importantes espécies do gênero *Rhipicephalus* ocorrem no território brasileiro: *R. microplus* e *R. sanguineus* (Dantas-Torres *et al.*, 2019).

### 2.1.1 *Rhipicephalus microplus*

*R. microplus* é uma espécie originária da Ásia que se espalhou por regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo através do transporte de hospedeiros infestados (Muhanquzi *et al.*, 2020). Atualmente, é uma das espécies da família Ixodidae com maior distribuição mundial (Jamil *et al.*, 2022). Essa espécie foi classificada, inicialmente, como *Boophilus microplus*, porém foi reclassificada para o gênero *Rhipicephalus*, com base em características morfológicas e moleculares (Murrell; Barker, 2003).

É um carrapato monoxeno (Figura 1), ou seja, todo o seu desenvolvimento, de larvas a adultos, ocorre em um único hospedeiro, geralmente bovinos (Higa *et al.*, 2015), por isso é conhecido como “carrapato-do-boi”. Entretanto, pode parasitar outros mamíferos domésticos, como bubalinos, equinos, caprinos, ovinos, suínos e cães, além de mamíferos selvagens (Bautista-Garfias *et al.*, 2023).



O ciclo se divide em duas fases: fase de vida livre e de vida parasitária. A fase de vida livre se inicia quando as fêmeas adultas ingurgitadas deixam o hospedeiro. No ambiente, realizam a oviposição e ocorre a eclosão das larvas. As larvas se fixam em um hospedeiro, iniciando a fase parasitária. As larvas realizam as ecdises para ninfas e, posteriormente, para adultos. As fêmeas ingurgitadas vão para o ambiente. O ciclo se reinicia.

Fonte: modificado de Bautista-Garfias *et al.* (2023).

A infestação de bovinos por *R. microplus* causa redução na produção de leite (Rodrigues; Leite, 2013) e no ganho de peso vivo (Calvano *et al.*, 2021). Além disso, pode

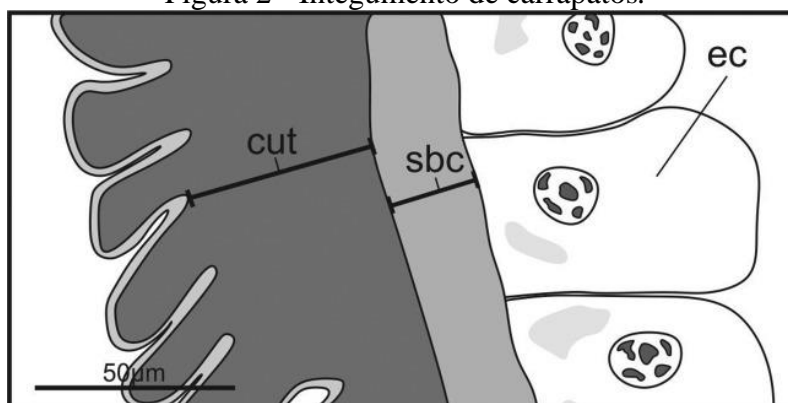
acarretar anemia (Desta, 2016) e alterações hemostáticas sistêmicas decorrentes da inoculação de saliva (Reck *et al.*, 2009). Ademais, as lesões cutâneas causadas pelas picadas predisõem a ocorrência de miíases e afetam a qualidade do couro (Saleem *et al.*, 2019). Nesse sentido, *R. microplus* é o ectoparasito que gera maior impacto econômico à pecuária brasileira (Grisi *et al.*, 2014). Os prejuízos anuais decorrentes desse parasitismo foram estimados em cerca de R\$9,0 bilhões em 2019 (Andreotti *et al.*, 2019).

Além disso, são importantes transmissores de agentes patogênicos, como os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, e a bactéria *Anaplasma marginale*, causadores da babesiose e anaplasmose bovinas, que, em conjunto, formam o complexo tristeza parasitária bovina (Vieira *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021). Ambas as infecções são causadas por agentes intraeritrocitários obrigatórios, apresentando sintomatologia semelhante (Silva *et al.*, 2021). Essa doença é caracterizada por hemólise e anemia, e pode acometer animais de todas as idades, sendo importante causa de mortes em bovinos. Além disso, causa perdas econômicas consideráveis (Henker *et al.*, 2020), relacionadas a diminuição de produtividade, infertilidade temporária e custos com tratamento, prevenção e controle (Silva *et al.*, 2021).

### **2.1.2 Morfologia do integumento de carrapatos**

O sucesso biológico dos carrapatos está diretamente relacionado ao seu integumento, estrutura que reveste externamente o corpo, confere proteção contra impactos mecânicos, evita a perda excessiva de água (Sonenshine; Roe, 2014) e forma uma barreira protetora contra a entrada de agentes patogênicos (Ment *et al.*, 2013). Morfologicamente, o integumento (Figura 2) é constituído por uma camada única de células (epiderme), que secreta uma cutícula, além de uma camada subcuticular (Camargo-Mathias, 2018; Sonenshine; Roe, 2014).

Figura 2 - Integumento de carrapatos.



Representação esquemática do integumento de carrapatos: cut - cutícula; sbc - subcutícula; ec - célula epitelial.

Fonte: Remedio *et al.* (2014).

A cutícula forma o exoesqueleto e é a parte do integumento trocada durante a ecdise em larvas e ninfas (Coons; Alberti, 1999). Essa estrutura divide-se em duas camadas básicas: epicutícula e procutícula. A epicutícula é mais externa, fina e altamente pregueada, sendo que a distensão das pregas permite a completa expansão do órgão durante o ingurgitamento (Hackman, 1982; Sonenshine; Roe, 2014). Essa camada é constituída principalmente por lipídios (Ment *et al.*, 2010). A procutícula, por sua vez, é mais interna e espessa (Hackman, 1982; Sonenshine; Roe, 2014), subdividindo-se ainda em: endocutícula (porção interna, localizada próxima à camada epitelial) e exocutícula (porção externa, adjacente à epicutícula) (Agwunobi *et al.*, 2020). A cutícula apresenta, em sua constituição, microfibrilas de  $\alpha$ -quitina, incorporadas em uma matriz proteica (Hackman, 1982; Sonenshine; Roe, 2014). As microfibrilas são compostas por cerca de 20 moléculas de quitina ( $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina), alinhadas de forma antiparalela (Cohen, 2010). A proporção entre essas moléculas e as de proteína é variável de acordo com a espécie do carrapato, o estágio de alimentação (Kaufman; Flynn, 2018) e a região do corpo (Sonenshine; Roe, 2014).

A epiderme, por sua vez, é formada por um epitélio simples de células cúbicas, com núcleos arredondados. Essa camada de células se apoia em um tecido conjuntivo (Remedio; Nunes; Camargo-Mathias, 2015) e pode estar separada da cutícula pela camada subcuticular, composta por precursores não polimerizados do complexo quitina-proteína (Coons; Alberti, 1999).

O integumento é um órgão de grande importância para carrapatos, tendo em vista que é o primeiro local de contato desses ectoparasitos com os acaricidas de aplicação tópica (Remedio *et al.*, 2014). Por isso, alguns estudos vêm sendo realizados nos últimos anos, baseados em análises morfológicas para identificar possíveis alterações no integumento desses animais

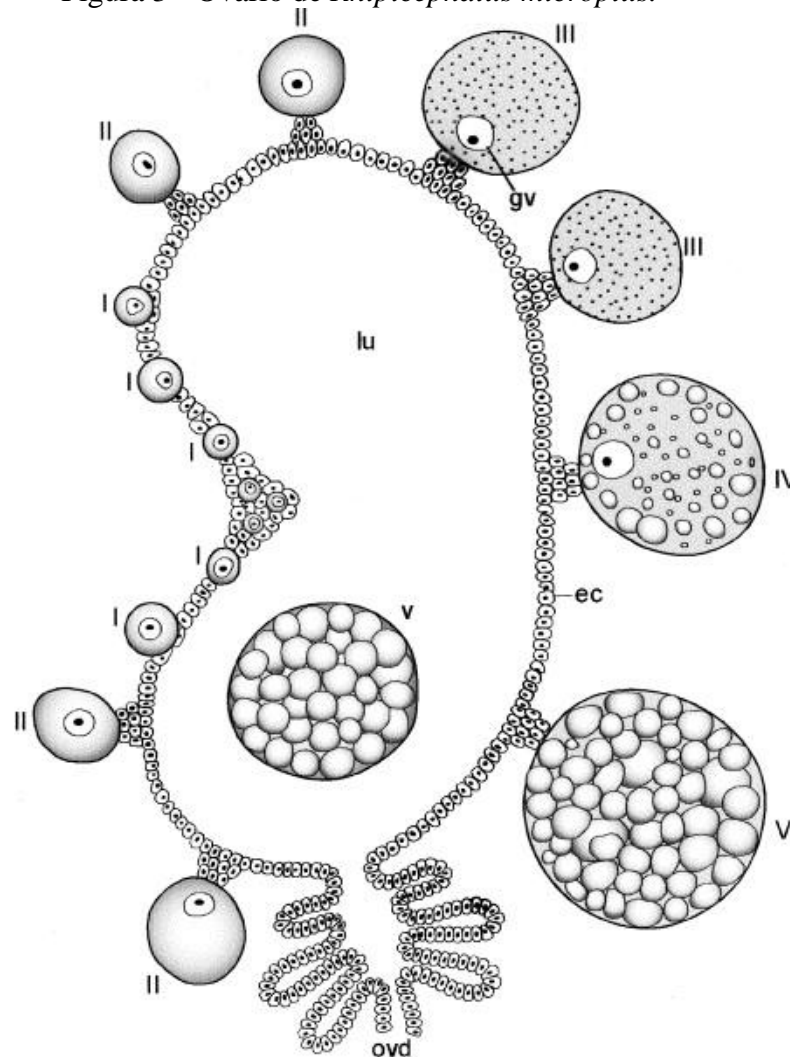
(Abreu *et al.*, 2020; Lima-de-Souza, 2022; Remedio *et al.*, 2014; Remedio; Nunes; Camargo-Mathias, 2015; Souza *et al.*, 2017).

### **2.1.3 Morfologia do ovário de carrapatos**

O sistema reprodutor feminino de carrapatos consiste em um único ovário em formato de “U” localizado na região posterior do corpo, dois ovidutos, um útero, um tubo de conexão muscular, uma vagina, glândulas acessórias tubulares pareadas e uma abertura genital (Sonenshine, 1994).

Segundo a descrição morfológica, histológica e ultraestrutural do ovário de *R. microplus*, esse órgão apresenta uma estrutura tubular contínua, em formato de ferradura. Sua parede é constituída por pequenas células epiteliais com núcleos arredondados, que delimitam o lúmen. As células da linhagem germinativa (ovócitos) permanecem fixas à parede do ovário por meio do pedicelo, estrutura formada a partir da proliferação das próprias células epiteliais. Os ovócitos são produzidos de forma assíncrona, por isso apresentam cinco estágios de desenvolvimento (I a V) (Figura 3), sendo que os menos desenvolvidos ocupam a região distal e, os mais desenvolvidos, a região proximal do órgão. Quando maduros (ovócitos V) são liberados para o lúmen (Saito *et al.*, 2005), por meio de uma pressão crescente contra a parede do órgão e, depois, para o ambiente externo (Denardi *et al.*, 2004).

Figura 3 - Ovário de *Rhipicephalus microplus*.



Representação esquemática da ovogênese em corte transversal de ovário: I - ovócito I; II - ovócito II; III - ovócito III; IV - ovócito IV; V - ovócito V; ec - epitélio ovariano; lu - lúmen; ovd - oviduto; gv - vesícula germinativa.

Fonte: Saito *et al.* (2005).

Os ovócitos I são as menores células da linhagem germinativa, sendo caracterizados pelo formato arredondado e vesícula germinativa (núcleo) localizada em posição central, com nucléolo evidente. Apresentam ainda conteúdo citoplasmático homogêneo, delimitado por uma fina membrana plasmática. Enquanto isso, os ovócitos II apresentam finas granulações no citoplasma. Os ovócitos III, por sua vez, são consideravelmente maiores que os estágios anteriores, apresentam o citoplasma com uma granulação mais grosseira e a vesícula germinativa está localizada próxima ao polo basal da célula. Além disso, nesse estágio, inicia-se a deposição do córion, estrutura que reveste externamente os ovócitos (Saito *et al.*, 2005) e confere proteção contra estímulos mecânicos, dessecação e predação, além de permitir as trocas gasosas, quando o ovo é liberado para o ambiente (Rezende *et al.*, 2016). Nos ovócitos IV, o citoplasma é ocupado por grânulos de vitelo (constituídos de glicoproteínas), sendo maiores na

região central e menores na periferia celular. Por fim, os ovócitos V são caracterizados por um córion espesso, completamente formado, e o citoplasma é inteiramente preenchido por grandes grânulos de vitelo (Saito *et al.*, 2005). Devido a ocorrência dos grânulos de grande tamanho nos ovócitos mais desenvolvidos (IV e V), a vesícula germinativa raramente é observada (Oliveira *et al.*, 2005). Durante a vitelogênese, o aumento de tamanho dos ovócitos se deve à incorporação de substâncias essenciais, como carboidratos, lipídios e proteínas (Saito *et al.*, 2005).

Os carrapatos apresentam grande capacidade reprodutiva. Com isso, o sistema reprodutor funciona como um alvo para o desenvolvimento de produtos acaricidas (Sreelekha *et al.*, 2017). Isso porque alterações nesse sistema podem levar à redução no número de indivíduos viáveis na geração subsequente, auxiliando no controle desses ectoparasitos (Nwanade; Yu; Liu, 2020). Nesse sentido, diversos estudos baseados em análises morfológicas vêm sendo realizados no intuito de demonstrar alterações observadas no ovário de carrapatos (Anholeto *et al.*, 2018; Dolenga *et al.*, 2024; Konig *et al.*, 2019, 2020; Matos *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2021, 2023; Souza *et al.*, 2019).

## 2.2 Controle de carrapatos

O principal método de controle de carrapatos consiste no uso de acaricidas sintéticos (Ferreira *et al.*, 2024; Klafke *et al.*, 2017; Waldman *et al.*, 2023), como os organofosforados, carbamatos, formamidas, piretroides, lactonas macrocíclicas e fenilpirazóis (Agwunobi; Yu; Liu, 2021). Ademais, existem outras formas de controle como a vacinação, o uso de extratos vegetais (Beys-da-Silva *et al.*, 2020) e o controle biológico (Alonso-Díaz *et al.*, 2022).

Mundialmente, os acaricidas sintéticos são amplamente empregados no controle de carrapatos em bovinos. Entretanto, seu uso frequente e indiscriminado gera alguns problemas, como efeitos nocivos em espécies não-alvo, o encarecimento dos custos de produção e o acúmulo de resíduos tóxicos em produtos de origem animal (Teskaye; Abate, 2023) e no meio ambiente (Camargo *et al.*, 2014; Shanmuganath *et al.*, 2021).

Além disso, seu uso incorreto pode favorecer a seleção de populações de carrapatos resistentes (Evans *et al.*, 2024; Sousa *et al.*, 2022; Valsoni *et al.*, 2020). A resistência pode ser definida como uma característica hereditária específica em uma população, selecionada após a exposição ao acaricida. Com isso, há um aumento considerável no número de carrapatos que sobrevivem após o contato com uma determinada concentração dessa substância (Rodriguez-Vivas; Jonsson; Bhushan, 2018). A resistência pode ser alcançada através de mutações, que resultam em alterações morfológicas no sítio-alvo do acaricida; pela atividade metabólica, que

leva à desintoxicação do organismo; e pela redução na penetração de acaricidas, após modificações no exoesqueleto (Obaid *et al.*, 2022).

### 2.2.1 Piretroides sintéticos

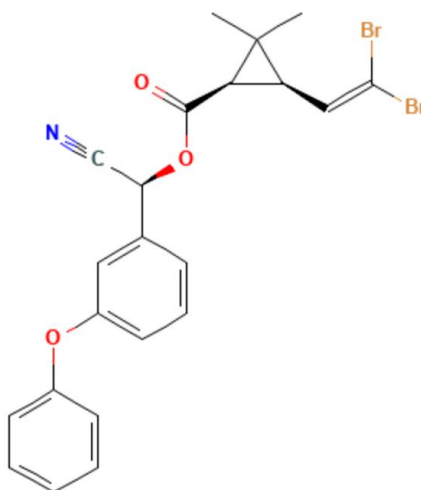
Os piretroides sintéticos são acaricidas derivados das piretrinas, ésteres naturais extraídos das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum coccineum* (Chrustek *et al.*, 2018; Gajendiran; Abraham, 2018). Inicialmente, as piretrinas foram empregadas como inseticidas, mas sua grande instabilidade à luz restringiu seu uso no controle de pragas (Chen; Wang, 1996). Com isso, iniciou-se o desenvolvimento dos piretroides sintéticos, a partir de mudanças estruturais nas piretrinas, com o intuito de aumentar a estabilidade química e conservar a atividade contra artrópodes e a baixa toxicidade para mamíferos (Soderlund *et al.*, 2002).

Os piretroides sintéticos são divididos em dois grupos, tipos I e II, de acordo com sua estrutura química e sua toxicidade aguda para roedores (Saillenfait; Ndiaye; Sabaté, 2015). Estruturalmente, os piretroides do tipo I se caracterizam pela ausência do grupo ciano na sua porção fenoxibenzil. Enquanto os do tipo II, como a deltametrina, apresentam esse grupo na sua constituição (Singh *et al.*, 2022). Em relação à toxicidade para animais de laboratório, os piretroides do tipo I levam a efeitos menos graves e reversíveis, como irritação na pele e nos olhos, enquanto os do tipo II apresentam maior toxicidade oral aguda, sendo neurotóxicos e, por vezes, fatais (Thatheyus; Selvam, 2013).

Ambos os grupos atuam nos canais de sódio dependentes de voltagem do sistema nervoso de artrópodes (Davies *et al.*, 2007). Os piretroides do tipo I prolongam o influxo de sódio, gerando descargas repetitivas. Enquanto os do tipo II promovem a despolarização da membrana plasmática, além de se ligarem aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), o que resulta em hiperexcitabilidade (Valentine, 1990).

Os piretroides sintéticos são amplamente empregados no controle de carrapatos (Chrustek *et al.*, 2018), sendo a deltametrina ( $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ ) (Figura 4) um dos mais utilizados (Dzemo *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2022). Sua eficácia está intimamente relacionada à capacidade de interromper a transmissão normal de impulsos nervosos, resultando em paralisia e eventual morte do carrapato (Davies *et al.*, 2007). Entretanto, seu uso indiscriminado favorece o desenvolvimento de resistência, principalmente relacionada a mutações nos canais de sódio e à desintoxicação metabólica (Kumar; Klafke; Miller, 2020).

Figura 4 - Deltametrina.



Representação da estrutura química da deltametrina.  
Fonte: NIH (2025).

Outros efeitos adversos foram descritos para os piretroides sintéticos, como a presença de resíduos em alimentos e no meio ambiente (Saillenfait; Ndiaye; Sabaté, 2015) e a alta toxicidade para peixes e anfíbios (Zhu *et al.*, 2020). Quanto à toxicidade para humanos, após a exposição acidental aguda, podem ocorrer parestesia e irritação respiratória, cutânea e ocular (Saillenfait; Ndiaye; Sabaté, 2015). Enquanto a exposição crônica leva a alterações no plasma sanguíneo, produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (Singh *et al.*, 2022) e alterações na fertilidade masculina e no desenvolvimento pré-natal (Saillenfait; Ndiaye; Sabaté, 2015).

Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas de controle para mitigar os impactos negativos do uso exacerbado de acaricidas sintéticos para controle das infestações por *R. microplus* (Beys-da-Silva *et al.*, 2020; Castro-Saines; Lagunes-Quintanilla; Hernández-Ortiz, 2024).

### 2.2.2 Controle alternativo

O desenvolvimento de resistência, a persistência ambiental e a toxicidade dos acaricidas sintéticos para mamíferos são fatores que comprometem o seu uso no controle de carrapatos (Agwunobi; Yu; Liu, 2021). Por isso, busca-se o desenvolvimento de estratégias que possam ser sustentáveis, seguras e eficazes, como a vacinação (Bhowmick; Han, 2020), o uso de produtos de origem vegetal (Alonso-Díaz; Fernández-Salas, 2021) e o controle biológico (Beys-da-Silva *et al.*, 2020).

O controle biológico é definido como o uso de agentes vivos para combater, direta ou indiretamente, organismos prejudiciais (Stenberg *et al.*, 2021). Entre esses agentes, destacam-se os fungos entomopatogênicos: organismos eucariontes, heterotróficos, uni ou multicelulares, que se reproduzem de forma assexuada, sexuada ou ambas (Mora; Castilho; Fraga, 2017). Na natureza, esses fungos causam doenças em insetos e outros invertebrados (Rajput *et al.*, 2024). São descritos mais de cem gêneros e aproximadamente 750 espécies (Kidanu; Hagos, 2020), sendo *Metarhizium anisopliae* uma das mais estudadas, especialmente para o controle de *R. microplus* (Alonso-Díaz; Fernández-Salas, 2021).

A ação dos fungos entomopatogênicos se inicia com o reconhecimento de um hospedeiro suscetível. Então, os conídios se aderem e germinam na cutícula, iniciando a formação de hifas e apressórios e a secreção enzimática (Ebani; Mancianti, 2021). Entre as enzimas secretadas estão lipases (EC 3.1.1.3), proteases (EC 3.4) e quitinases (EC 3.2.1.14), que atuam sobre substratos presentes nas diferentes camadas cuticulares (Beys-da-Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2005). A pressão mecânica exercida pelos apressórios e a secreção de enzimas possibilitam a passagem dos fungos pela cutícula (Ebani; Mancianti, 2021). O desenvolvimento intenso do fungo culmina no esgotamento de nutrientes da hemolinfa (Feng; Poprawski; Khachatourians, 1994) que, juntamente com a secreção de toxinas (Peng *et al.*, 2022), levam o hospedeiro à morte, sendo o cadáver colonizado pelo micélio. Posteriormente, ocorre a emergência das hifas e a produção de novos conídios, o que possibilita o reinício do ciclo de infecção (Ebani; Mancianti, 2021).

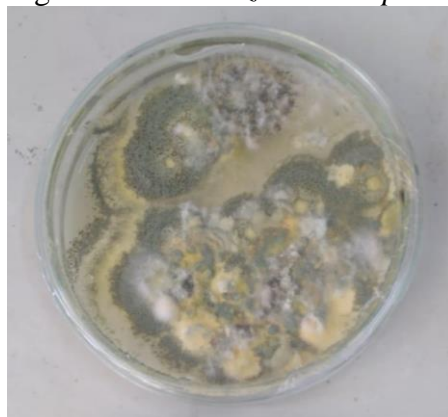
As toxinas são importantes fatores de virulência dos fungos entomopatogênicos (Wang; Wang, 2017). *Metarhizium* spp. produz uma grande variedade desses compostos, como destruxinas, citocalasinas e swainsonina (Zimmermann, 2007). As destruxinas são peptídeos cíclicos (Berestetskiy; Hu, 2021), com propriedades inseticidas, antivirais e citotóxicas, sendo os metabólitos secundários mais abundantemente produzidos durante a fermentação fúngica (Schrank; Vainstein, 2010). Sua ação envolve a abertura dos canais de  $Ca^{2+}$ , resultando em despolarização da membrana plasmática, o que leva à paralisia e morte do hospedeiro (Hsiao; Ko, 2001). Além dos danos ao sistema muscular, as destruxinas comprometem a resposta imunológica e causam danos aos túbulos de Malpighi, afetando a excreção (Peng *et al.*, 2022). As citocalasinas, por sua vez, são constituídas por um anel isoindol hidrogenado unido a um anel microcíclico. Esses metabólitos se ligam aos filamentos de actina e inibem sua polimerização, interferindo em diferentes processos celulares. Enquanto a swainsonina é um alcaloide indolizidínico que atua na inibição de manosidases (Zimmermann, 2007), enzimas

importantes no processamento biológico de alguns polissacarídeos (Rovira *et al.*, 2020). Essa inibição afeta o processamento de glicoproteínas no hospedeiro (Zimmermann, 2007).

O controle biológico com fungos entomopatogênicos é uma alternativa promissora e pode ser incluída em estratégias de manejo integrado para o controle de carrapatos. Entretanto, há limitações para o uso em grande escala e a sua viabilidade a campo pode não ser adequada (Cafarchia *et al.*, 2022). Além disso, sua ação é lenta (Baron; Rigobelo; Zied, 2019) e a secreção de enzimas pode variar de acordo com a linhagem do fungo, comprometendo a eficácia no controle desses ectoparasitos (Polar *et al.*, 2008).

### **2.2.3 *Metarhizium anisopliae***

*Metarhizium* compreende um gênero de fungos filamentosos classificados no reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Clavicipitaceae (Shang; Song; Wang, 2024). A espécie *Metarhizium anisopliae* apresenta grande distribuição na natureza, sendo comumente encontrada em solos, raízes de plantas, rizosferas e carcaças de artrópodes, atuando de forma endofítica ou saprofítica (Leger, 2008). Suas colônias apresentam coloração branca e amarelada, durante a fase inicial de produção de conídios (4 a 7 dias), tornando-se verde à medida que ocorre a maturação desses esporos (8 a 9 dias) (Figura 5) (Bischoff; Rehner; Humber, 2009). Suas hifas são septadas e os conidióforos ramificados, com fiálides alongadas, individuais ou agrupadas, na sua extremidade. Além disso, os conídios são cilíndricos ou ovalados, e dispostos em cadeias (Driver; Milner; Trueman, 2000).

Figura 5 - *Metarhizium anisopliae*.

Colônias de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura ágar batata dextrose (BDA).

Fonte: Da autora (2024).

*M. anisopliae* é um dos fungos patogênicos para artrópodes mais utilizado em programas de controle biológico em todo o mundo (Leger, 2008), com cepas comercialmente disponíveis para o controle de diversas pragas (Samish; Ginsberg; Glazer, 2004). Estudos em laboratório e em campo demonstraram a eficácia de *M. anisopliae* sobre os diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (Camargo *et al.*, 2014; Muniz *et al.*, 2020; Ojeda-Chi *et al.*, 2010). Fernández-Salas *et al.* (2017), por exemplo, encontraram mortalidade superior a 90% em fêmeas ingurgitadas, até 20 dias após a exposição a 21 cepas diferentes do fungo ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL), em estudo *in vitro*. Enquanto isso, Azmi *et al.* (2024) observaram mortalidade variável entre 36,67% e 83,33% das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, 14 dias após o tratamento com seis isolados diferentes de *M. anisopliae* ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL).

Velázquez-Sarmiento *et al.* (2024) demonstraram o efeito acaricida de diferentes cepas de *M. anisopliae* sensu lato ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL) contra *R. microplus*. Nesse estudo, foi observada mortalidade de 66,17-100% das larvas, 20 dias após o tratamento. Ademais, mortalidade de 100% das fêmeas ingurgitadas foi alcançada 18 dias após a exposição ao fungo. Além disso, houve um bom efeito na redução de oviposição (16,45-56,38%) e um efeito moderado na redução de eclosão dos ovos (5,24-32,68%). Alcalá-Gómez *et al.* (2017), por sua vez, encontraram mortalidade de 100% de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, 15 dias após a exposição a uma suspensão de  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL de *M. anisopliae* (Ma 136), além de redução de 73% na oviposição e na eclosão dos ovos.

A cepa de *M. anisopliae* s.l. (ARSEF 3643) mostrou-se patogênica para larvas de *R. microplus* em condições de semicampo, no interior da Bahia. Fêmeas ingurgitadas foram colocadas em vasos cultivados com *Urochloa brizantha* e pulverizadas com formulações aquosas e oleosas do fungo ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL). Após 42 dias, período necessário para a

eclosão das larvas e endurecimento da cutícula, foi observada eficácia de 43,8% e 58,4% para as duas formulações, respectivamente. Também foi relatada a persistência do fungo no solo por 52 dias após o tratamento (Pereira *et al.*, 2022).

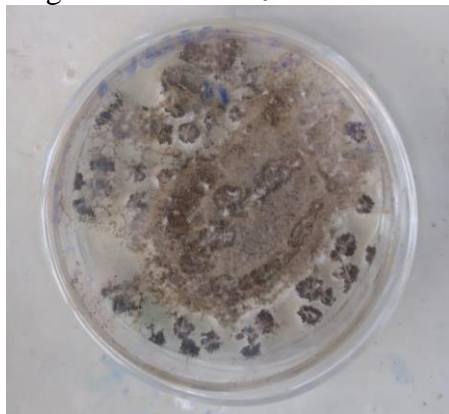
O efeito acaricida de *M. anisopliae* (IBCB 425) também foi demonstrado em condições de campo. No interior de São Paulo, duas áreas de pastagens foram pulverizadas mensalmente, durante um ano, com suspensões fúngicas ( $5 \times 10^{13}$  conídios/ha), associadas ao óleo mineral. A eficácia média anual encontrada contra *R. microplus* foi de 36% e 48%, nas duas áreas (Santos *et al.*, 2022). Além disso, duas formulações oleosas de *M. anisopliae* ( $5,0 \times 10^7$  conídios/mL), MaO1 (contendo óleo mineral) e MaO2 (com óleo mineral e óleo de silicone), apresentaram eficácia *in vitro* de 60% e 99%, respectivamente, contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Em condições de campo, após a pulverização de bovinos infestados, eficácias de 55% e 66% foram observadas 21 dias após o tratamento, sendo relatada redução da infestação por até 28 dias após a pulverização (Barbieri *et al.*, 2023).

Camargo *et al.* (2016) avaliaram os efeitos de uma formulação oleosa contendo um produto comercial (Metarril<sup>®</sup> SP Organic), desenvolvido com os isolados ESALQ 1037 e ESALQ E9 de *M. anisopliae* ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL), contra *R. microplus*, em condições de campo. Foram realizadas duas pulverizações em bovinos, com intervalo de 3 dias, e a eficácia média observada foi de 75,09%, 24 dias após a primeira aplicação. A adição de óleos às suspensões fúngicas foi responsável pela maior adesão dos conídios à cutícula e conferiu proteção contra condições ambientais desfavoráveis.

Webster *et al.* (2015) demonstraram a eficácia de uma suspensão ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL) de *M. anisopliae* (TIS-B503), associada à cipermetrina e ao clorpirifós. Para isso, bovinos infestados com larvas de *R. microplus* foram pulverizados a cada 21 ou 28 dias, durante 182 dias. A mediana da eficácia encontrada ao final do estudo foi de 97,9%, demonstrando que a combinação pode aumentar a eficiência do tratamento.

#### **2.2.4 *Metarhizium robertsii***

*Metarhizium robertsii* é um fungo patogênico para artrópodes, amplamente encontrado em solos, rizosferas e raízes de plantas, atuando como endófito ou (Sasan; Bidochka, 2012) saprófito (Shang; Song; Wang, 2024). Suas colônias apresentam formato arredondado, com coloração branca, verde ou marrom (Figura 6). As hifas possuem septos (Geremew; Shiberu; Leta, 2024) e os conidióforos são ramificados, com fiálides alongadas e cilíndricas. Os conídios, por sua vez, são esféricos ou elipsoides (Villamizar *et al.*, 2021).

Figura 6 - *Metarhizium robertsii*.

Colônias de *Metarhizium robertsii* em meio de cultura ágar batata dextrose (BDA).  
Fonte: Da autora (2024).

Alguns estudos descreveram a ação acaricida de *M. robertsii* contra *R. microplus*. Paulo *et al.* (2018), por exemplo, analisaram a virulência de suspensões ( $1,0 \times 10^7$  e  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL) de *M. robertsii* (ARSEF 2575) sobre fêmeas ingurgitadas, em testes *in vitro*. Os resultados demonstraram controle de 19,64% e 30% dos carrapatos expostos às duas concentrações, respectivamente. Ademais, algumas fêmeas foram inoculadas com o fungo ( $1,0 \times 10^7$  conídios/mL) para análise histológica do ovário, sendo observada a colonização do órgão por *M. robertsii*, caracterizada pela presença de hifas nos cortes histológicos. Fiorotti *et al.* (2019) analisaram o efeito de diferentes concentrações de *M. robertsii* (ARSEF 2575) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* inoculadas com o fungo. Após 48 h, 48% das fêmeas infectadas com  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL morreram, enquanto 83,3% de mortalidade foi observada no grupo exposto a  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL.

Também foi avaliada a eficácia de formulações granulares ( $5,0 \times 10^7$  conídios/mL) contendo microescleródios (MS) e blastósporos (BS) de *M. robertsii* (IP 146) em condições de semicampo, no estado do Rio de Janeiro. Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram colocadas em vasos cultivados com *Urochloa decumbens* cv. Basilisk, oito dias após a adição dos grânulos (ambos nas concentrações de 25 e 50 kg/ha). Os melhores resultados foram encontrados nos grupos BS (25 kg/ha) e MS (50 kg/ha), com 38,4% e 64,4% de mortalidade larval, respectivamente. Entretanto, após uma segunda aplicação fúngica (218 dias após a primeira), a eficácia foi menor, variando entre 1,7% e 23,9%. Ademais, foi relatada a persistência do fungo no solo por 336 dias após a primeira aplicação (Marciano *et al.*, 2021).

De maneira geral, os níveis de mortalidade de carrapatos em ensaios a campo, utilizando fungos entomopatogênicos, são menores do que em estudos *in vitro* (Samish; Ginsberg; Glazer,

2004). Isso sugere que a ação de alguns fatores ambientais, como altas temperaturas, radiação ultravioleta e dessecação (Fernandes; Bittencourt; Roberts, 2012), além de fatores relacionados à pele dos hospedeiros, como temperatura, secreções e microbiota, possam interferir no processo infeccioso (Polar *et al.*, 2005). Ainda assim, *Metarhizium* spp. permanece como uma alternativa aos acaricidas sintéticos, por ser seguro para mamíferos e para o meio ambiente (Brunner-Mendoza *et al.*, 2019). Entretanto, é necessário o aprimoramento de métodos de cultivo, armazenamento, formulação e aplicação em grande escala (Castro-Saines; Lagunes-Quintanilla; Hernández-Ortiz, 2024).

### 2.2.5 Enzimas

Os fungos entomopatogênicos produzem uma variedade de biomoléculas, também encontradas em seus extratos, incluindo toxinas, proteínas, vitaminas (Santos *et al.*, 2021) e enzimas líticas, como lipases, proteases e quitinases (Mejía *et al.*, 2024). A patogenicidade desses fungos está intimamente relacionada à capacidade de secreção dessas enzimas, essenciais para a degradação da cutícula de seus hospedeiros (Moharram; Abdel-Galil; Hafez, 2021; Sánchez-Pérez *et al.*, 2014).

Por definição, as enzimas são, em sua maioria, proteínas globulares que atuam como catalisadoras (Silverman, 2000), acelerando reações bioquímicas. As enzimas apresentam grande afinidade pelo seu substrato, molécula na qual se ligam através do sítio ativo. Com isso, forma-se o complexo enzima-substrato que, então, é convertido em produto, sem que a enzima seja consumida durante a reação (Pundir, 2015).

Em um processo infeccioso, as lipases são as primeiras enzimas a serem secretadas pelo fungo (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014; Mondal *et al.*, 2016). Sua ação envolve a catálise das reações de hidrólise das ligações éster de lipídios, liberando glicerol e ácidos graxos (Jaeger; Eggert, 2002). Isso possibilita a passagem do fungo pela epicutícula e a liberação de nutrientes (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). Além disso, provocam o aumento das interações hidrofóbicas (Santi *et al.*, 2010) pela liberação de ácidos graxos livres, o que resulta em maior adesão dos esporos à cutícula do hospedeiro (Göttlich *et al.*, 1995). Posteriormente, o fungo inicia a produção de proteases (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). As proteases são responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações peptídicas (Jakubke; Kuhl; Könnecke, 1985) das proteínas da procutícula. Sua ação culmina na liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos (Sharma *et al.*, 2006) e exposição das microfibrilas de quitina (Litwin; Nowak; Rózska, 2020). Por fim, ocorre a secreção de quitinases, que atuam nas reações de hidrólise dos polímeros de quitina

(Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). Essas enzimas são divididas em duas classes, de acordo com seus padrões de clivagem: endoquitinases e exoquitinases (Horn *et al.*, 2006). As endoquitinases catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -(1,4) (Duo-Chuan, 2006) em qualquer ponto dentro do polímero. Enquanto as exoquitinases atuam na clivagem da extremidade não redutora da quitina, levando à liberação de dímeros de N-acetilglucosamina (Schrank; Vainstein, 2010). A ação das quitinases causa a degradação completa da quitina (Duo-Chuan, 2006).

Alguns estudos demonstraram a ação de extratos fúngicos contendo enzimas sobre carrapatos. Extratos com quitinases e proteases produzidas por fungos encontrados em solos (*Aspergillus* sp., *Mucor* sp. e *Trichoderma* sp.), por exemplo, apresentaram ação ovicida contra *Hyalomma dromedarii*. Neste estudo, foi observado 100% de inibição no desenvolvimento de ovos do carrapato, após o tratamento com extratos de *Mucor* sp. e *Trichoderma* sp., contendo quitinases, e de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*, contendo proteases (Habeeb; Ashry; Saad, 2017). Enquanto isso, extratos contendo quitinases produzidas pelos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* causaram 80% e 90% de mortalidade, respectivamente, em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Hassan *et al.*, 2015).

Perinotto *et al.* (2014) demonstraram a importância das enzimas secretadas por *M. anisopliae* s.l. durante a infecção em *R. microplus*. Fêmeas ingurgitadas foram imersas em suspensões contendo conídios ( $1,0 \times 10^6$  conídios/mL) de diferentes isolados fúngicos. Os isolados que apresentaram melhor controle de carrapatos também foram os que apresentaram os maiores níveis de atividade das enzimas lipases, proteases e quitinases. Em estudo semelhante, Pelizza *et al.* (2012) avaliaram o efeito de 26 isolados de fungos entomopatogênicos contra ninfas do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. A maior mortalidade observada (90,91% causada por *Beauveria bassiana* - LPSC1067) também coincidiu com os maiores níveis de atividade enzimática.

Mejía *et al.* (2024) avaliaram a atividade inseticida de extratos enzimáticos produzidos a partir da fermentação de *M. robertsii* (Mt015) contra larvas da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). Os extratos, com atividade de quitinases e proteases, foram aplicados em associação com um biopesticida à base de conídios de *B. bassiana* (Bv064 -  $1,0 \times 10^6$  conídios/mL). Após a inoculação de larvas de segundo estágio, foi observado aumento de 66,7% na eficácia da associação, em comparação à aplicação de conídios isoladamente.

O extrato concentrado de *M. robertsii* (MT008) causou 95,9% de mortalidade em adultos da mosca-da-fruta (*Anastrepha obliqua*), 48 horas após a ingestão. Entretanto, neste estudo, a atividade inseticida foi conferida à ação das destruxinas. Isso porque os efeitos de três desses metabólitos (destruxinas A, A2 e B) também foram avaliados, de maneira semelhante,

sendo observada mortalidade de 100%, 60% e 81,3% de adultos da mosca, respectivamente (Lozano-Tovar *et al.*, 2023).

O uso de biomoléculas como biopesticidas é uma alternativa a produtos químicos tradicionais (Schmaltz *et al.*, 2023). Nesse sentido, as enzimas apresentam algumas vantagens, como o fato de serem altamente específicas, o que gera menos efeitos adversos em organismos não-alvo. Além disso, são biodegradáveis, o que implica em uma menor geração de resíduos (Nordisk, 1995). Entretanto, seu uso no controle de artrópodes ainda é pouco explorado (Mejía *et al.*, 2024).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, aplicados de forma isolada ou acrescida do acaricida sintético deltametrina, sobre a mortalidade e a morfologia do integumento e do ovário de *Rhipicephalus microplus*.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Determinar, por meio de análise morfométrica do integumento, as espessuras da cutícula e da subcutícula das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, expostas aos extratos ativos e desnaturados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*.
2. Determinar, por meio de análise morfométrica do ovário, a área dos ovócitos e de seus núcleos, em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostas aos extratos ativos e desnaturados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*.
3. Quantificar as possíveis alterações histológicas observadas no integumento e no ovário de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, após a exposição aos extratos ativos e desnaturados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*, por meio de um protocolo de análise semiquantitativa, baseado no fator de importância e na extensão das alterações tissulares.
4. Avaliar os efeitos da deltametrina, aplicada de forma isolada ou após a exposição aos extratos ativos e desnaturados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*, sobre a mortalidade e a morfologia do integumento e do ovário de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, por meio de análises morfométrica e semiquantitativa em microscópio de luz convencional.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos extratos de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*

Os extratos de ambos os fungos foram preparados no Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As cepas de *M. anisopliae* (IP119) e *M. robertsii* (IP146) foram obtidas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG). Essas cepas foram mantidas no laboratório em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) e incubadas em estufa do tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio), a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Inicialmente, foi preparado o meio de cultura para a inoculação dos fungos, conforme metodologia adaptada de Santoro *et al.* (2005). Para isso, foram adicionados 40 g de arroz pré-cozido e 20 mL de soro de leite em seis tubos Erlenmeyer, vedados com algodão. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando três frascos para cada cepa, e o meio de cultura foi autoclavado antes da inoculação dos fungos. Em uma capela microbiológica, foi adicionada uma amostra (cerca de  $1\text{cm}^2$ ) do meio BDA contendo o fungo em cada um dos tubos. O material foi mantido em estufa BOD ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por oito dias.

Após esse período, cada amostra foi homogeneizada com 40 mL de água destilada estéril. Para isso, foram mantidas sob agitação por um período de duas horas. Em seguida, foram filtradas com o auxílio de papel filtro Whatman nº 4. O produto obtido foi chamado extrato ativo. Parte desse extrato, de ambos os fungos, foi aquecida em banho-maria, a  $100^\circ\text{C}$ , por duas horas, para a desnaturação das enzimas pelo calor. Com isso, apenas os componentes não enzimáticos ficaram presentes nos extratos, que passaram a ser chamados extratos desnaturados.

### 4.2 Ensaios de atividade enzimática

Para determinar a atividade de proteases e quitinases dos extratos ativos, foi realizada a centrifugação de amostras de cada filtrado, a  $10000 \times g$ , por 15 minutos. O sobrenadante obtido para cada uma das cepas foi utilizado nos ensaios subsequentes.

#### 4.2.1 Atividade total de proteases

A atividade das proteases foi mensurada conforme Soares *et al.* (2013), com modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os volumes utilizados foram: 100 µL do extrato ativo, 400 µL de tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 e 500 µL de caseína 1% pH 8,0. A reação foi incubada por 60 minutos, a 37°C, em banho-maria. Em seguida, foi interrompida com a adição de 1mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. O meio de reação foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para mensuração da absorbância em espectrofotômetro, a 280 nm. Foi construída uma curva-padrão de tirosina, relacionando absorbâncias medidas com concentrações conhecidas do aminoácido. Uma unidade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µg de tirosina por minuto, nas condições do ensaio.

#### **4.2.2 Atividade total de quitinases**

A atividade das quitinases foi medida pela quantificação de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise da quitina, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959). Para o ensaio foram utilizados: 100 µL do extrato ativo, 400 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 500 µL de quitina coloidal. Os reagentes foram incubados a 37°C, em banho-maria, durante 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1000 µL do reagente de DNS. O meio de reação foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos, para a obtenção do sobrenadante. A quantidade de açúcares redutores liberada foi estimada pela leitura da absorbância, em espectrofotômetro, a 540 nm. Foi construída uma curva-padrão de N-acetilglucosamina, para a quantificação da atividade enzimática. Uma unidade de quitinase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µg de N-acetilglucosamina por minuto, nas condições do ensaio.

#### **4.3 Carrapatos *Rhipicephalus microplus***

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas manualmente em um rebanho naturalmente infestado no município de Viçosa (20°45'14" S e 42°52'54" W), Minas Gerais. O rebanho não havia recebido tratamento acaricida nos 30 dias anteriores à coleta. Os exemplares foram colocados em uma peneira, lavados em água corrente e secos em papel absorvente macio. Em seguida, foram submetidos ao Teste de Imersão de Adultos (TIA), descrito por Drummond *et al.* (1973).

#### 4.4 Teste de Imersão de Adultos

O TIA foi realizado no Laboratório de Microscopia da UFLA, conforme metodologia de Drummond *et al.* (1973), com adaptações. A metodologia foi adaptada quanto ao tempo de imersão e à quantidade de produto testada. Para esse teste, cem carrapatos foram pesados, individualmente, em balança analítica e distribuídos de forma homogênea ( $p > 0,05$ ) em dez grupos, com 10 exemplares cada. O teste consistiu na imersão das fêmeas ingurgitadas de cada grupo em béqueres (com capacidade de 50 mL), contendo 7 mL das respectivas soluções.

O grupo controle (C) foi imerso em água destilada. Quatro grupos foram tratados apenas com os extratos fúngicos, sendo: extrato ativo de *M. anisopliae* (TMA1), extrato desnaturado de *M. anisopliae* (TMA2), extrato ativo de *M. robertsii* (TMR1) e extrato desnaturado de *M. robertsii* (TMR2). Outros quatro grupos passaram pelo tratamento com os mesmos extratos anteriores, acrescido de uma imersão em deltametrina (Butox®, MSD Saúde Animal). Nesses grupos, a deltametrina foi utilizada em metade da dose recomendada pelo fabricante: extrato ativo de *M. anisopliae* mais deltametrina (0,5 mL/L) (TMA3), extrato desnaturado de *M. anisopliae* mais deltametrina (0,5 mL/L) (TMA4), extrato ativo de *M. robertsii* mais deltametrina (0,5 mL/L) (TMR3) e extrato desnaturado de *M. robertsii* mais deltametrina (0,5 mL/L) (TMR4). Por fim, o grupo deltametrina (D) foi tratado apenas com o acaricida sintético em metade da dose recomendada (0,5 mL/L) pelo fabricante.

A imersão dos carrapatos em cada solução foi realizada em dois momentos distintos. Em um primeiro momento, os carrapatos dos seguintes grupos foram imersos durante quinze minutos: C, TMA1, TMA2, TMA3, TMA4, TMR1, TMR2, TMR3 e TMR4. À exceção do grupo controle, imerso em água destilada, os outros grupos foram imersos apenas nos seus respectivos extratos fúngicos. Em um segundo momento, os carrapatos dos grupos TMA3, TMA4, TMR3, TMR4 e D foram imersos em deltametrina, durante cinco minutos, nas suas respectivas concentrações. O intervalo entre a aplicação dos extratos fúngicos e a deltametrina para os grupos TMA3, TMA4, TMR3 e TMR4 foi de uma hora (Tabela 1).

Tabela 1 - Delineamento experimental para o Teste de Imersão de Adultos.

<b>Grupos</b>	<b>Primeira imersão (15 min)</b>	<b>Segunda imersão (5 min)</b>	<b>Intervalo entre imersões</b>
Água destilada (C)	Água destilada	-	-
Extrato ativo de <i>Metarhizium anisopliae</i> (TMA1)	Extrato	-	-
Extrato desnaturado de <i>M. anisopliae</i> (TMA2)	Extrato	-	-
Extrato ativo de <i>M. anisopliae</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMA3)	Extrato	Deltametrina	1 h
Extrato desnaturado de <i>M. anisopliae</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMA4)	Extrato	Deltametrina	1 h
Extrato ativo de <i>Metarhizium robertsii</i> (TMR1)	Extrato	-	-
Extrato desnaturado de <i>M. robertsii</i> (TMR2)	Extrato	-	-
Extrato ativo de <i>M. robertsii</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMR3)	Extrato	Deltametrina	1 h
Extrato desnaturado de <i>M. robertsii</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMR4)	Extrato	Deltametrina	1 h
Deltametrina (0,5 mL/L) (D)	-	Deltametrina	-

Fonte: Da autora (2025).

Logo após a realização dos tratamentos, os carrapatos foram colocados em placas de Petri e mantidos em estufa BOD ( $27,5 \pm 1$  °C), sendo observados diariamente por um período de sete dias, para avaliação de mortalidade. Foram considerados mortos os carrapatos que não apresentaram movimento após estímulo com pinça ou dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Oliveira *et al.*, 2020), além de apresentarem cutícula rígida e enegrecida (Reis *et al.*, 2023). Após o período de observação, foram selecionados, aleatoriamente, cinco carrapatos vivos de cada grupo para dissecação e coleta do integumento e do ovário para análise histopatológica.

#### **4.5 Análises histológicas e histoquímicas**

Os carrapatos selecionados foram colocados em placas de Petri contendo solução salina tamponada (NaCl 0,13M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,017M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02M; pH 7,2). Em seguida, sob um estereomicroscópio (Opticam OPZTS), foram dissecados para a coleta do integumento e do ovário. As amostras coletadas foram fixadas em solução de paraformaldeído, na concentração de 4%, por um período mínimo de 72 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%), durante 20 minutos cada. Em seguida, as amostras foram embebidas em uma solução contendo quantidades iguais de álcool 95% e historesina (Leica), por 24 horas. Por fim, foram depositadas em histomoldes e incluídas em historesina.

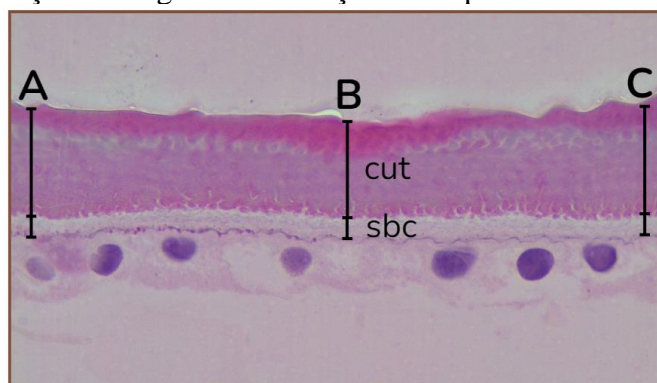
Posteriormente, 40 cortes histológicos (4 µm de espessura) de cada amostra foram seccionados em um micrótomo (Lupetec MRP2015) e divididos em cinco lâminas de vidro com oito cortes cada. Após esse procedimento, três lâminas de cada amostra foram submetidas à coloração com hematoxilina-eosina (Junqueira; Junqueira, 1983). Além disso, uma lâmina de cada amostra foi corada com a técnica de ácido periódico de Schiff (PAS) (Junqueira; Junqueira, 1983), para detecção de carboidratos, e uma lâmina de cada foi submetida à coloração com azul de bromofenol (Pearse, 1985), para a detecção de proteínas totais. Em seguida, as lâminas foram secas e cobertas com Entellan® e lamínula, para análise dos cortes histológicos em microscópio óptico (Olympus CX22LED). Ademais, foram obtidas imagens dos cortes utilizando um microscópio (Leica DM500) equipado com uma câmera (Leica ICC50W).

#### **4.6 Análises morfométricas e semiquantitativas**

As análises morfométricas do integumento e do ovário foram realizadas no software

ImageJ (NIH). Para isso, foram utilizadas as lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Na análise do integumento, foram mensuradas as espessuras da região acelular, formada por cutícula e subcutícula (adaptado de Oliveira *et al.*, 2020; Remedio *et al.*, 2014). Inicialmente, foram obtidas cinco imagens do integumento de cada um dos indivíduos. Em cada uma das imagens, foi realizada a mensuração das espessuras da cutícula e da subcutícula em três regiões distintas: uma região próxima à extremidade direita (A), outra ao centro da imagem (B) e uma próxima à extremidade esquerda (C) (Figura 7). O valor de espessura (e) para cada imagem foi calculado por meio da média das regiões mensuradas:  $e = (A+B+C)/3$ . Com isso, as espessuras da cutícula e da subcutícula de cada um dos indivíduos foi obtida a partir da média das cinco imagens analisadas.

Figura 7 - Representação das regiões de medição das espessuras da cutícula e da subcutícula.



Regiões de mensuração das espessuras da cutícula e da subcutícula: A - região próxima à extremidade direita; B - região ao centro; e C - região próxima à extremidade esquerda. Legendas: (cut) cutícula, (sbc) subcutícula. Barra: 50  $\mu$ m.

Fonte: Da autora (2024).

Na análise do ovário, foram mensurados as áreas dos ovócitos e de seus núcleos. Inicialmente, foi realizada a classificação dos ovócitos conforme o estágio de desenvolvimento (I a V), segundo Saito *et al.* (2005). Em seguida, foram avaliados dez ovócitos de cada estágio por animal. Para os ovócitos em estágios iniciais (I a III) foram selecionadas apenas as células com núcleo evidente. Para os ovócitos mais maduros (IV e V), a seleção se deu de forma aleatória, já que o núcleo raramente é observado nesses estágios. Por esse mesmo motivo, não foi realizada a mensuração das áreas dos núcleos dessas células (Barbosa *et al.*, 2016). Posteriormente, foi obtida a razão núcleo/ovócito (R), através da fórmula  $R = \text{área do núcleo} / \text{área do ovócito}$ . Adicionalmente, foi realizada a contagem de ovócitos em cada um dos seus estágios de desenvolvimento. Para isso, foi escolhido um corte histológico em cada uma das lâminas, sendo que os cortes selecionados foram obtidos em regiões diferentes do ovário. O

número estimado de células de cada estágio foi obtido pelo somatório do número de ovócitos em cada lâmina.

A análise semiquantitativa foi realizada conforme metodologia de König *et al.* (2019, 2020), com adaptações. As alterações morfológicas observadas nos ovários de carrapatos tratados com diferentes produtos acaricidas foram classificadas por König *et al.* (2019, 2020) em diferentes graus de importância ( $w$ ), variando de 1 a 3. O grau (1) indica importância mínima, (2) importância média e (3) importância alta, segundo a sua relevância para o desenvolvimento e sobrevivência da célula. Além disso, foi realizada a avaliação da extensão de cada alteração morfológica observada nas amostras dos tecidos, que foi dividida em escores ( $\alpha$ ), variando de 0 a 5. O escore zero indica que as características foram semelhantes ao grupo controle e, o escore 5, indica que mais de 80% das células do tecido foram afetadas. Em seguida, foi obtido o índice de cada alteração, por meio da multiplicação do fator de importância pelo seu escore de extensão, conforme a fórmula:  $INDEX_{alt} = w \times \alpha$ . Também foi obtido um índice individual, que contabilizou todas as alterações observadas em um único indivíduo, por meio do somatório de cada índice de alteração:  $INDEX_{ind} = \Sigma(INDEX_{alt})$ . Os valores dos índices foram utilizados nos testes estatísticos.

#### **4.7 Análise estatística**

Os dados relativos às massas dos carrapatos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, então, submetidos à Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para essa análise foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 7.00). Os demais dados foram submetidos à ANOVA Fatorial, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Para essas análises foi utilizado o software Statistica.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade total de proteases

A atividade total de proteases nas amostras dos extratos ativos de *Metarhizium anisopliae* foi de  $18,68 \pm 1,29$  U, enquanto as amostras de *Metarhizium robertsii* apresentaram atividade de  $32,28 \pm 7,96$  U.

### 5.2 Atividade total de quitinases

Nas amostras dos extratos ativos de *M. anisopliae* foi observada atividade próxima à  $0,35 \pm 0,02$  U, enquanto a atividade das amostras de *M. Robertsii* foi de  $0,27 \pm 0,08$  U.

### 5.3 Mortalidade de *Rhipicephalus microplus*

As massas dos carrapatos submetidos ao Teste de Imersão de Adultos não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ). Não foi observada mortalidade nos grupos controle (C), extrato desnaturado de *M. anisopliae* (TMA2) e deltametrina 0,5 mL/L (D) (Tabela 2).

Tabela 2 - Média  $\pm$  desvio padrão da massa corporal das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e percentual de carrapatos mortos sete dias após o Teste de Imersão de Adultos.

Grupos	Carrapatos		
	Total	Massa (mg)*	Mortos (%)
Água destilada (C)	10	163 $\pm$ 8,94	0
Extrato ativo de <i>Metarhizium anisopliae</i> (TMA1)	10	157 $\pm$ 16,62	40
Extrato desnaturado de <i>M. anisopliae</i> (TMA2)	10	163 $\pm$ 8,21	0
Extrato ativo de <i>M. anisopliae</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMA3)	10	164 $\pm$ 6,98	40
Extrato desnaturado de <i>M. anisopliae</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMA4)	10	167 $\pm$ 8,39	20
Extrato ativo de <i>Metarhizium robertsii</i> (TMR1)	10	165 $\pm$ 6,43	30
Extrato desnaturado de <i>M. robertsii</i> (TMR2)	10	165 $\pm$ 7,02	40
Extrato ativo de <i>M. robertsii</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMR3)	10	165 $\pm$ 3,77	20
Extrato desnaturado de <i>M. robertsii</i> + deltametrina (0,5 mL/L) (TMR4)	10	165 $\pm$ 6,57	20
Deltametrina (0,5 mL/L) (D)	10	160 $\pm$ 8,77	0

\*Médias de massa corporal não diferiram estatisticamente entre si (ANOVA *one way*;  $p > 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

## 5.4 Análise histopatológica do integumento

### 5.4.1 Grupo Controle

O integumento apresentou-se constituído por uma cutícula acelular e por uma subcutícula, ambas secretadas por uma epiderme formada por células com citoplasma levemente basofílico organizadas em um epitélio simples cúbico e que, ocasionalmente, exibiram regiões não coradas adjacentes ao núcleo (Figuras 8-A e 8-B). Os núcleos eram grandes, arredondados, centrais e corados pela hematoxilina, com nucléolo evidente. A subcutícula também demonstrou leve basofilia, sendo possível observar pequenos grânulos eosinofílicos, localizados próximos ao seu limite com o epitélio. Em relação à cutícula (Figura 8-A), foi possível observar suas duas camadas básicas: a procutícula, camada interna, mais espessa e acidófila; e a epicutícula, camada externa, fina e levemente amarelada, não sendo possível sua visualização em alguns cortes histológicos. Na procutícula, foi possível distinguir a endocutícula e a exocutícula (Figura 8-B). A endocutícula, camada mais interna e adjacente à subcutícula, apresentou aspecto lamelar, com regiões não coradas, correspondentes aos canais de poros. Essas estruturas exibiram ramificações e anastomoses e encontravam-se distribuídas de forma homogênea. A exocutícula, por sua vez, apresentou-se densamente corada pela eosina.

### 5.4.2 Tratamento com *M. anisopliae*

No grupo TMA1, tratado com o extrato ativo de *M. anisopliae*, quatro indivíduos apresentaram cutícula com morfologia alterada, caracterizada por áreas irregulares em até 40% de sua extensão (Figura 9-B). Em alguns indivíduos, foram observadas regiões com ausência de subcutícula em até metade do tecido analisado. Além disso, dois carrapatos apresentaram discreta redução na sua basofilia. Em relação à epiderme, a estratificação epitelial foi observada em todos os indivíduos, alcançando até metade da extensão do epitélio em uma das amostras. Nesse carrapato, além da estratificação acentuada, caracterizada pela formação de múltiplas camadas de células epiteliais achatadas, com núcleos amorfos ou picnóticos, também foi observada a ausência parcial de subcutícula (Figura 9-A). Ademais, a maioria dos indivíduos apresentou pontos de desorganização da epiderme e a vacuolização citoplasmática foi identificada em cerca de 10% das células. Quanto às alterações nucleares, alguns indivíduos exibiram algumas células com núcleos amorfos, e todos os animais apresentaram núcleos

picnóticos em proporções que variaram de 10% a 80% das células analisadas. Uma pequena porcentagem de células também exibiu núcleos fragmentados em um dos carrapatos.

Em alguns animais expostos ao extrato desnaturado de *M. anisopliae* (TMA2), foram observadas alterações na morfologia da cutícula (Figura 9-C) e o desaparecimento de suas subdivisões, em até 15% do tecido analisado. Em três indivíduos, a subcutícula estava ausente em até metade de sua extensão, enquanto um animal apresentou discreta redução na basofilia. Na epiderme de alguns carrapatos, observou-se estratificação discreta (Figuras 9-C e 9-D), com formação de até quatro camadas celulares em uma pequena área do tecido. Além disso, a vacuolização citoplasmática esteve presente em até 40% das células epiteliais de alguns carrapatos. Na maioria dos animais, núcleos picnóticos foram observados em cerca de um terço das células, enquanto núcleos dilatados ou amorfos ocorreram em alguns indivíduos, mas em baixa frequência.

Todos os indivíduos expostos ao extrato ativo de *M. anisopliae* seguido de deltametrina (TMA3) apresentaram cutícula com morfologia alterada (Figura 9-E), em diferentes graus de extensão. Em dois carrapatos, também foi observado o desaparecimento de suas subdivisões, em cerca de metade da amostra analisada. Alguns animais apresentaram pequenas áreas de ausência de subcutícula, enquanto um discreto aumento na basofilia foi observado em dois carrapatos. Na epiderme da maioria dos animais, cerca de 25% do integumento apresentava regiões de estratificação e desorganização epitelial (Figura 9-E), enquanto uma pequena proporção de células exibiu vacuolização citoplasmática. Núcleos picnóticos (Figura 9-F) ocorreram em 10% a 65% das células epiteliais de todos os carrapatos, enquanto núcleos dilatados ou amorfos foram observados em baixa frequência e em apenas alguns animais.

No grupo TMA4, em que os animais foram tratados com o extrato desnaturado de *M. anisopliae* seguido de deltametrina, a maioria dos carrapatos apresentou alterações na morfologia da cutícula e desaparecimento de suas subdivisões (Figura 9-G). Em relação à subcutícula, sua ausência foi observada em cerca de 20% a 40% da extensão do integumento de alguns animais, enquanto três indivíduos apresentaram discreto aumento na basofilia. Apenas um animal apresentou estratificação e desorganização epitelial, restrita a uma pequena área do tecido. A vacuolização citoplasmática também ocorreu em baixa frequência em apenas dois carrapatos. Além disso, todos os animais apresentaram núcleos picnóticos (Figura 9-H), afetando até metade das células epiteliais, enquanto núcleos dilatados ou amorfos foram observados em três animais, embora com baixa recorrência.

### 5.4.3 Tratamento com *M. robertsii*

No grupo TMR1, tratado com o extrato ativo de *M. robertsii*, três carrapatos apresentaram alterações na morfologia da cutícula, em até 40% de sua extensão. Em dois indivíduos, foram observadas pequenas áreas com ausência de subcutícula, e um carrapato apresentou discreta redução na basofilia. A estratificação da camada epitelial ocorreu na maioria dos indivíduos, enquanto alguns animais apresentaram desorganização da epiderme (Figura 10-A). Essas alterações acometeram até um terço do epitélio. Em um animal, foram observadas células epiteliais achatadas, embora pouco recorrentes. Quanto às alterações nucleares, núcleos picnóticos (Figuras 10-A e 10-B) foram observados em um indivíduo, enquanto alguns animais apresentaram núcleos dilatados ou amorfos (Figura 10-B), mas em uma pequena porcentagem de células.

Três carrapatos expostos ao extrato desnaturado de *M. robertsii* (TMR2) apresentaram alterações na morfologia da cutícula (Figura 10-D). Em um indivíduo, foi observado o desaparecimento de cerca de 20% da subcutícula, além de discreto aumento na basofilia. A maioria dos carrapatos apresentou desorganização e estratificação epitelial (Figuras 10-C e 10-D) em até um terço do tecido, com formação de até seis camadas celulares. A vacuolização citoplasmática foi observada em baixa frequência em apenas um indivíduo. Ademais, alguns carrapatos apresentaram núcleos dilatados ou amorfos (Figuras 10-C e 10-D), embora pouco recorrentes, enquanto a maioria dos animais apresentou núcleos picnóticos (Figura 10-C), atingindo até 40% das células epiteliais.

No grupo TMR3, em que os animais foram expostos ao extrato ativo de *M. robertsii* seguido de deltametrina, alguns indivíduos apresentaram alterações na morfologia da cutícula (Figura 10-F). A maioria dos carrapatos exibiu discreto aumento na basofilia e desaparecimento de uma pequena porção da subcutícula (Figura 10-E). Na epiderme de dois animais, foi observada estratificação (Figura 10-E) em uma pequena região do epitélio. Além disso, em alguns carrapatos, a desorganização epitelial foi observada em cerca de um terço do tecido analisado. Quanto às alterações nucleares, em dois carrapatos núcleos picnóticos (Figura 10-F) foram observados em até 40% das células, enquanto alguns indivíduos apresentaram núcleos dilatados ou amorfos (Figura 10-E), mas em baixa frequência.

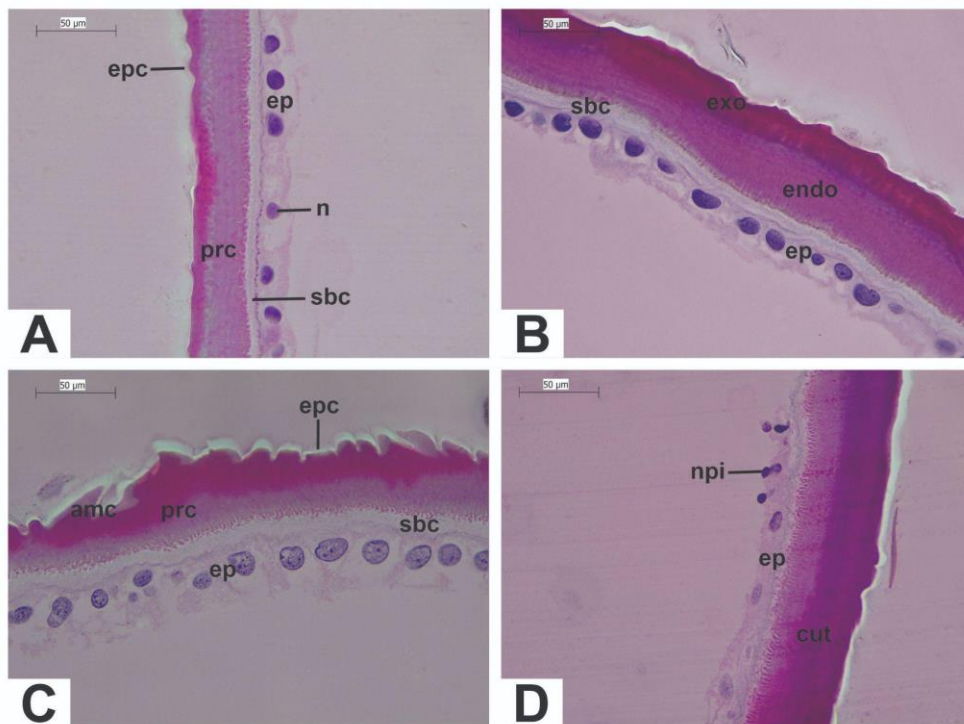
No grupo tratado com o extrato desnaturado de *M. robertsii* seguido de deltametrina (TMR4), três indivíduos apresentaram cutícula com morfologia alterada (Figura 10-H). Em alguns carrapatos, observou-se ausência de cerca de 20% da subcutícula, enquanto um animal apresentou discreto aumento na basofilia. Em dois indivíduos, foi observada estratificação

epitelial (Figura 10-G), com formação de até três camadas de células, enquanto alguns carrapatos apresentaram desorganização do epitélio. Três animais apresentaram vacuolização citoplasmática (Figura 10-G), em diferentes graus de extensão. Quanto às alterações nucleares, na maioria dos carrapatos foram observados núcleos picnóticos, afetando até 20% das células epiteliais, enquanto núcleos dilatados ou amorfos ocorreram em dois indivíduos, embora pouco recorrentes.

#### **5.4.4 Grupo Deltametrina**

Nesse grupo, a maioria dos carrapatos apresentou alterações em cerca de 10% da morfologia da cutícula (Figura 8-C). Além disso, em dois indivíduos, foi observado o desaparecimento de suas subdivisões, embora em uma pequena extensão do tecido. Em alguns animais, ocorreram pequenas regiões com ausência de subcutícula, e um carrapato apresentou discreta redução na basofilia. A epiderme exibiu características semelhantes às do grupo controle, exceto em dois animais, onde cerca de 10% das células apresentaram vacuolização citoplasmática. Ademais, alguns indivíduos apresentaram núcleos dilatados ou amorfos, enquanto núcleos picnóticos (Figura 8-D) ocorreram em um único animal. Entretanto, essas alterações nucleares ocorreram em baixa frequência.

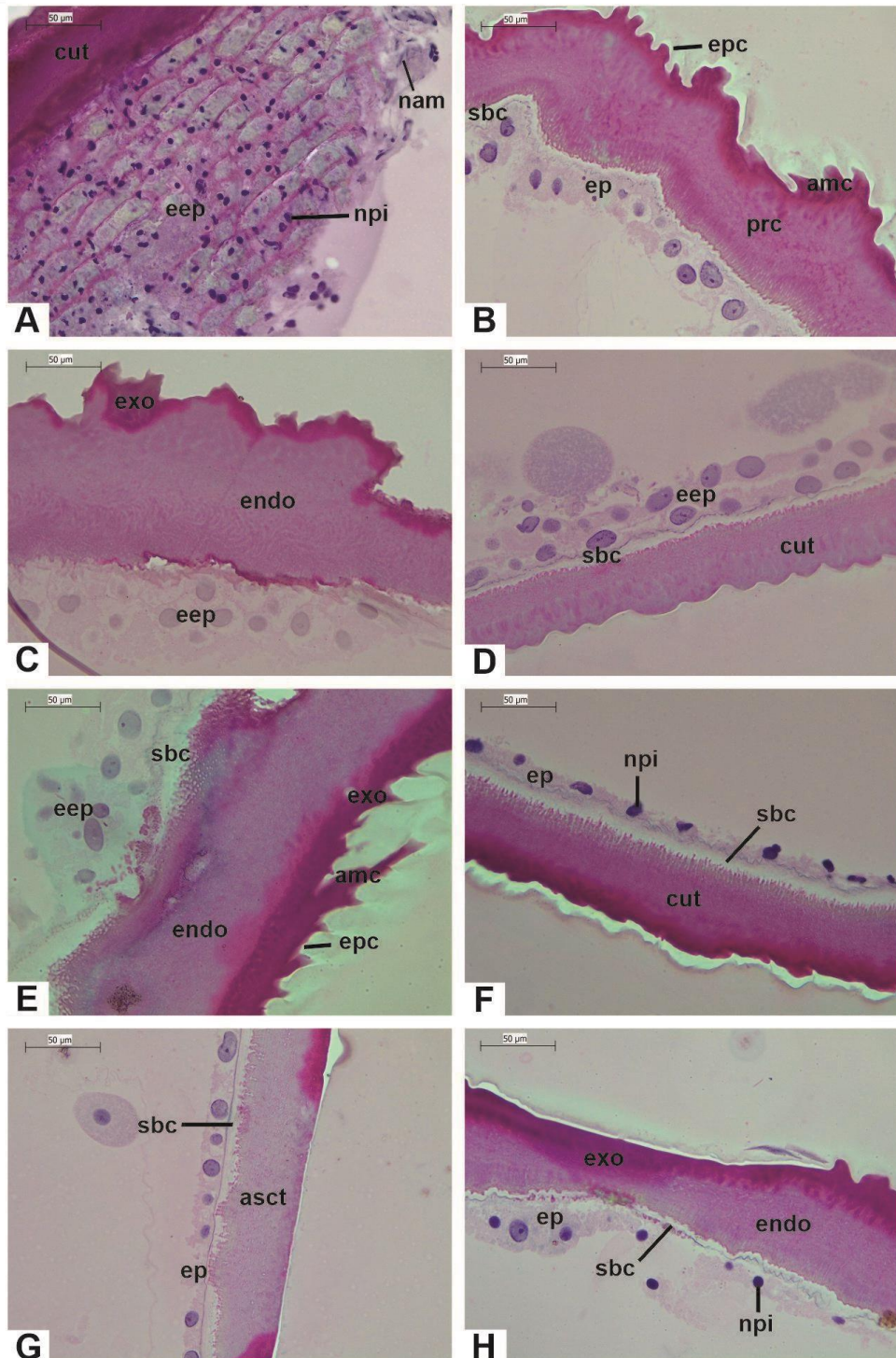
Figura 8 - Secções histológicas do integumento de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas à água destilada e à deltametrina, coradas com hematoxilina-eosina.



(A-B) Grupo Controle, (C-D) Grupo Deltametrina. Legendas: (amc) alteração na morfologia da cutícula, (cut) cutícula, (endo) endocutícula, (ep) epiderme, (epc) epicutícula, (exo) exocutícula, (n) núcleo, (npi) núcleo picnótico, (prc) procutícula, (sbc) subcutícula. Barras: (A-D) 50 µm.

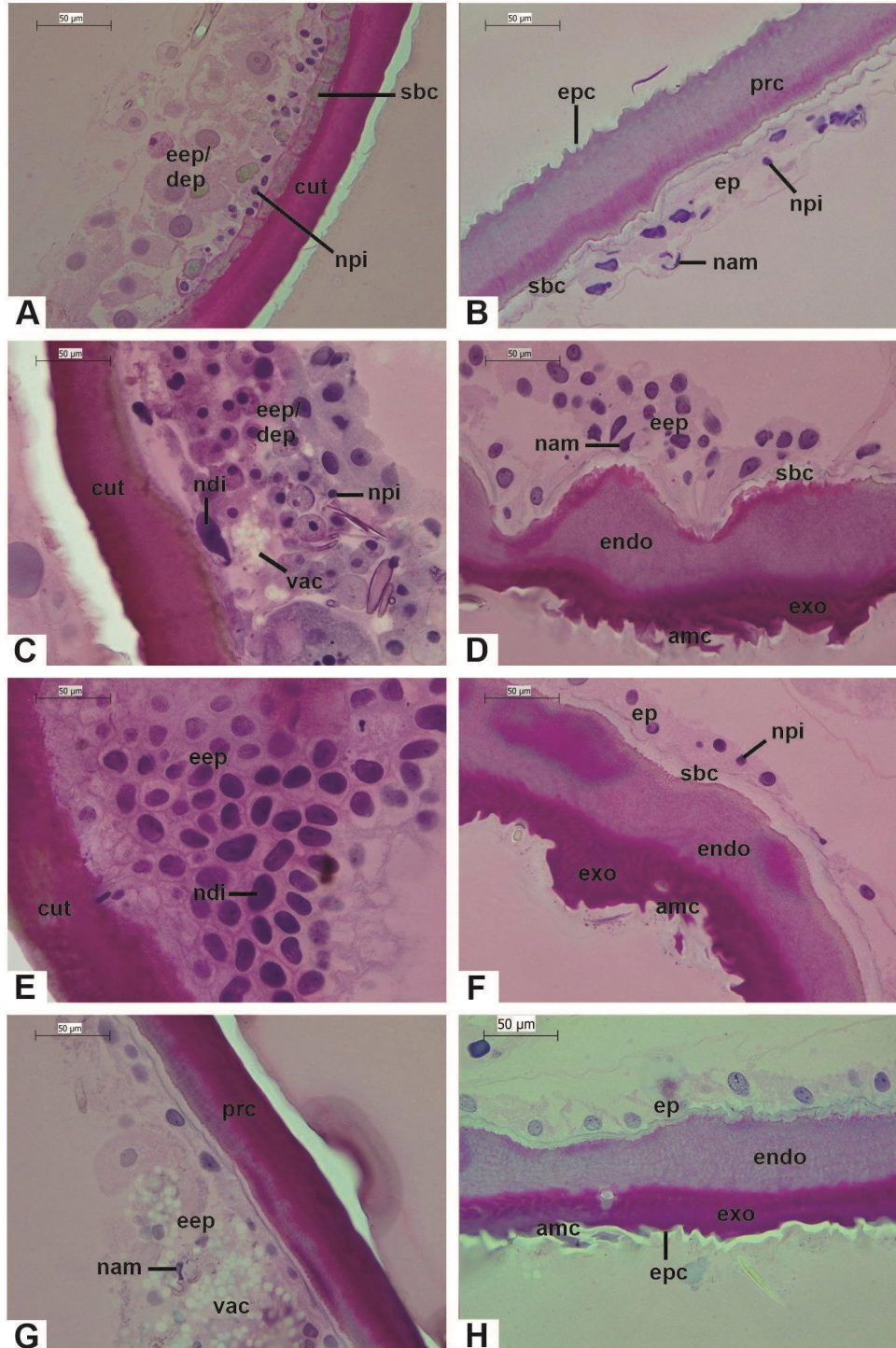
Fonte: Da autora (2025).

Figura 9 - Seções histológicas do integumento de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae*, associados ou não à deltametrina, coradas com hematoxilina e eosina.



(A-B) Grupo TMA1, (C-D) Grupo TMA2, (E-F) Grupo TMA3, (G-H) Grupo TMA4. Legendas: (amc) alteração na morfologia da cutícula, (asct) ausência das subdivisões cuticulares, (cut) cutícula, (eep) estratificação epitelial, (endo) endocutícula, (ep) epiderme, (epc) epicutícula, (exo) exocutícula, (nam) núcleo amorfo, (npi) núcleo picnótico, (prc) procutícula, (sbc) subcutícula. Barras: (A-H) 50 µm. Fonte: Da autora (2025).

Figura 10 - Seções histológicas do integumento de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium robertsii*, associados ou não à deltametrina, coradas com hematoxilina e eosina.



(A-B) Grupo TMR1, (C-D) Grupo TMR2, (E-F) Grupo TMR3, (G-H) Grupo TMR4. Legendas: (amc) alteração na morfologia da cutícula, (cut) cutícula, (dep) desorganização epitelial, (eep) estratificação epitelial, (endo) endocutícula, (epc) epicutícula, (ep) epiderme, (exo) exocutícula, (nam) núcleo amorfo, (ndi) núcleo dilatado, (npi) núcleo picnótico, (prc) procutícula, (sbc) subcutícula, (vac) vacuolização citoplasmática. Barras: (A-H) 50 µm.

Fonte: Da autora (2025).

### **5.5 Análise semiquantitativa do integumento**

As alterações morfológicas encontradas no integumento dos carrapatos após a exposição aos extratos ativos e desnaturados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*, aplicados de forma isolada ou em associação com a deltametrina, foram listadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Média  $\pm$  desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEX<sub>alt</sub>) observada no integumento de *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.

Alterações morfológicas	Fator de importância (w)	INDEX <sub>alt</sub>									
		C	TMA1	TMA2	TMA3	TMA4	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4	D
Redução na basofilia da subcutícula	1	0,00 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,55	0,20 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,45	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Aumento na basofilia da subcutícula	1	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45	0,60 $\pm$ 0,89	0,60 $\pm$ 0,55	0,40 $\pm$ 0,89	0,20 $\pm$ 0,45	0,80 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45
Cutícula com morfologia alterada	2	0,00 $\pm$ 0,00	2,40 $\pm$ 1,67	0,80 $\pm$ 1,10	5,20 $\pm$ 1,79	2,40 $\pm$ 1,67	1,60 $\pm$ 1,67	1,20 $\pm$ 1,10	1,60 $\pm$ 1,67	0,80 $\pm$ 1,10	2,80 $\pm$ 2,68
Desaparecimento das subdivisões da cutícula	2	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 1,10	1,60 $\pm$ 2,61	0,40 $\pm$ 0,89	0,40 $\pm$ 0,89	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 1,10
Desaparecimento da subcutícula	2	0,00 $\pm$ 0,00	2,40 $\pm$ 2,61	2,40 $\pm$ 2,61	1,20 $\pm$ 1,10	2,40 $\pm$ 2,61	0,80 $\pm$ 1,10	0,40 $\pm$ 0,89	1,60 $\pm$ 0,89	1,20 $\pm$ 1,10	1,20 $\pm$ 1,10
Estratificação da camada epitelial	2	0,00 $\pm$ 0,00	3,60 $\pm$ 1,67	0,80 $\pm$ 1,10	2,80 $\pm$ 1,79	0,40 $\pm$ 0,89	2,00 $\pm$ 1,41	2,00 $\pm$ 1,41	0,80 $\pm$ 1,10	0,80 $\pm$ 1,10	0,00 $\pm$ 0,00
Desorganização epitelial	2	0,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 1,41	1,20 $\pm$ 1,79	2,00 $\pm$ 1,41	0,40 $\pm$ 0,89	1,20 $\pm$ 1,79	2,00 $\pm$ 1,41	2,00 $\pm$ 2,45	1,20 $\pm$ 1,10	0,00 $\pm$ 0,00
Células epiteliais achatadas	2	0,00 $\pm$ 0,00	1,20 $\pm$ 2,68	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,89	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Células epiteliais com vacuolização citoplasmática	2	0,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 2,00	1,60 $\pm$ 0,89	0,80 $\pm$ 1,10	1,20 $\pm$ 1,10	0,40 $\pm$ 0,89	0,40 $\pm$ 0,89	2,00 $\pm$ 2,45	0,80 $\pm$ 1,10
Células epiteliais com núcleo dilatado ou amorfo	3	0,00 $\pm$ 0,00	2,40 $\pm$ 1,34	1,80 $\pm$ 1,64	1,20 $\pm$ 1,64	1,80 $\pm$ 1,64	1,80 $\pm$ 1,64	1,80 $\pm$ 1,64	1,80 $\pm$ 1,64	1,20 $\pm$ 1,64	1,20 $\pm$ 1,64
Células epiteliais com núcleo picnótico	3	0,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 3,67	3,60 $\pm$ 2,51	7,20 $\pm$ 3,42	4,20 $\pm$ 2,68	1,20 $\pm$ 2,68	3,60 $\pm$ 2,51	1,80 $\pm$ 2,68	2,40 $\pm$ 1,34	0,60 $\pm$ 1,34
Células epiteliais com núcleo fragmentado	3	0,00 $\pm$ 0,00	0,60 $\pm$ 1,34	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Fonte: Da autora (2025).

Os índices individuais ( $INDEX_{ind}$ ) estão apresentados na Tabela 4 e na Figura 11. Os grupos C e D não diferiram significativamente entre si ( $p>0,05$ ). Os grupos expostos aos extratos ativos ou desnaturados de *M. anisopliae*, em associação ou não com a deltametrina (TMA1, TMA2, TMA3 e TMA4), bem como o grupo tratado com o extrato desnaturado de *M. robertsii* (TMR2), apresentaram médias dos índices individuais significativamente maiores do que as do grupo C ( $p<0,05$ ). Além disso, as médias dos índices individuais dos grupos expostos aos extratos ativos de *M. anisopliae*, isolado (TMA1) ou associado com a deltametrina (TMA3), foram significativamente maiores quando comparadas às do grupo D.

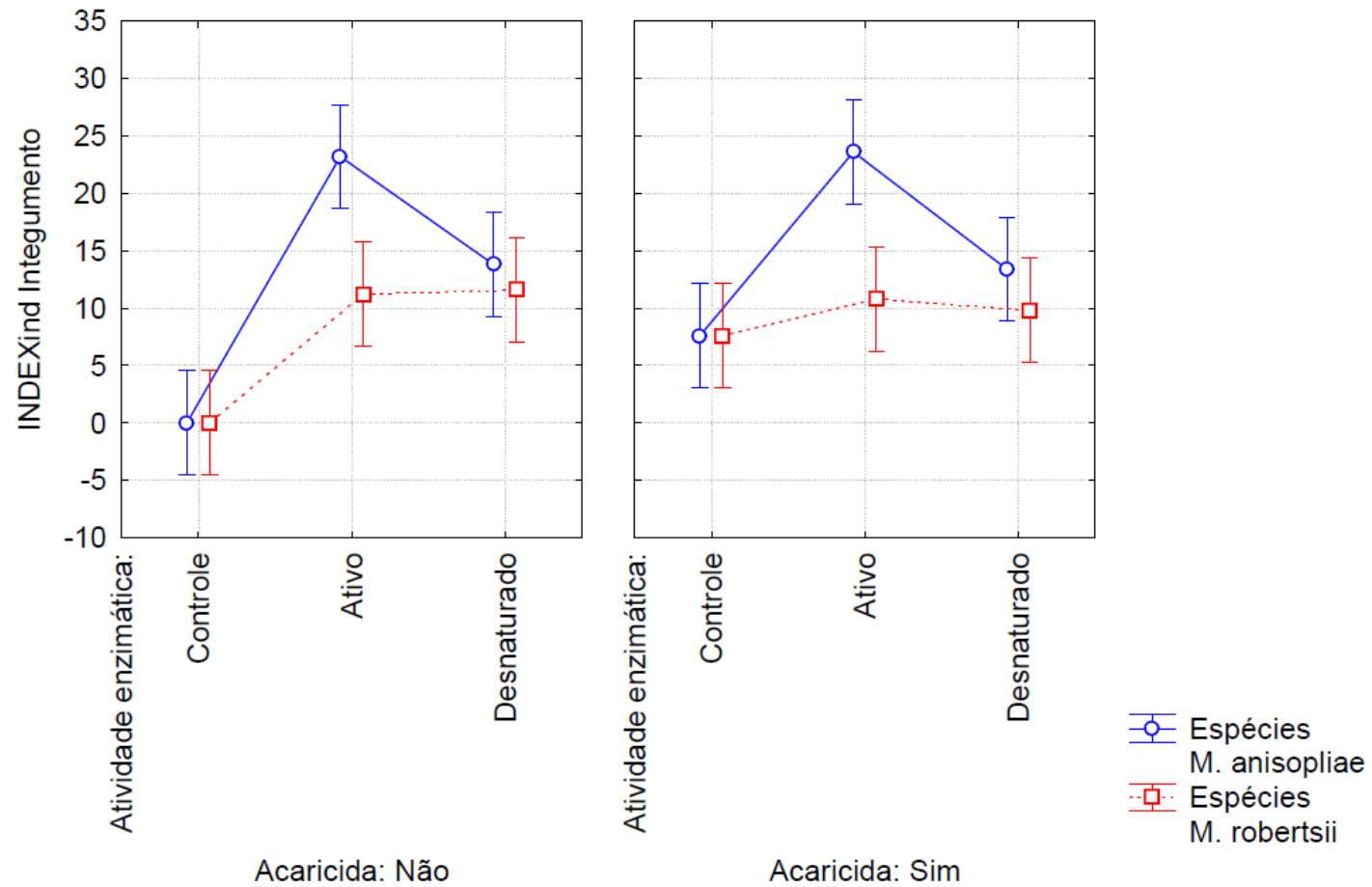
Tabela 4 - Média  $\pm$  desvio padrão dos índices individuais ( $INDEX_{ind}$ ) calculados a partir das alterações encontradas no integumento de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, após a exposição aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.

Indivíduo	$INDEX_{ind}$									D
	C	TMA1	TMA2	TMA3	TMA4	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4	
I	0	22	12	27	15	18	4	8	10	11
II	0	40	14	15	13	7	14	5	9	7
III	0	17	24	28	5	12	8	19	7	9
IV	0	21	7	26	22	10	15	12	16	8
V	0	16	12	22	12	9	17	10	7	3
Média $\pm$ desvio padrão	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	23,20 $\pm$ 9,73 <sup>c</sup>	13,80 $\pm$ 6,26 <sup>b, c, d</sup>	23,60 $\pm$ 5,32 <sup>c</sup>	13,40 $\pm$ 6,11 <sup>b, c, d</sup>	11,20 $\pm$ 4,21 <sup>a, b, d</sup>	11,60 $\pm$ 5,41 <sup>b, d</sup>	10,80 $\pm$ 5,26 <sup>a, b, d</sup>	9,80 $\pm$ 3,70 <sup>a, b, d</sup>	7,60 $\pm$ 2,97 <sup>a, b, d</sup>

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (ANOVA fatorial, *post-hoc* de Bonferroni;  $p>0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

Figura 11 - Média  $\pm$  desvio padrão dos índices individuais ( $INDEX_{ind}$ ) calculados a partir das alterações encontradas no integumento de *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.



Fonte: Da autora (2025).

## 5.6 Análise morfométrica do integumento

Os valores de média e desvio padrão das espessuras da cutícula e da subcutícula dos carrapatos tratados com os extratos de *Metarhizium* spp. e/ou a deltametrina estão apresentados na Tabela 5 e Figura 12. Em relação à cutícula, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p>0,05$ ). Na subcutícula, houve diferença significativa entre os grupos C e D. Além disso, as médias dos grupos expostos aos extratos de *M. robertsii*, isolados (TMR1 e TMR2) ou associados à deltametrina (TMR3 e TMR4), e ao extrato de *M. anisopliae* desnaturado + deltametrina (TMA4), foram significativamente menores quando comparadas às do C ( $p<0,05$ ). Ademais, todos os grupos, à exceção do grupo C, apresentaram médias estatisticamente iguais entre si ( $p>0,05$ ).

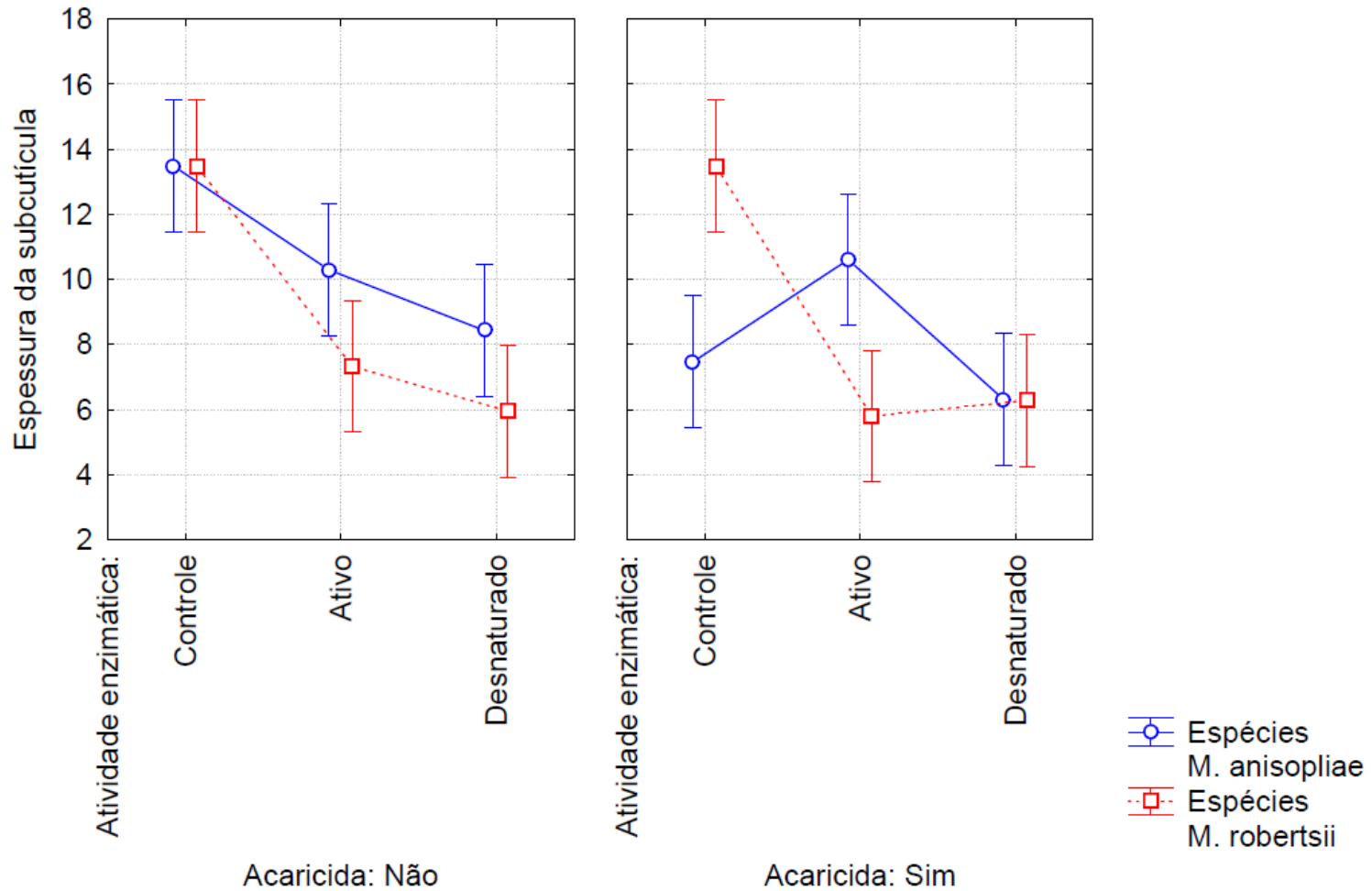
Tabela 5 - Média  $\pm$  desvio padrão das espessuras ( $\mu\text{m}$ ) da cutícula e da subcutícula de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.

	C	TMA1	TMA2	TMA3	TMA4	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4	D
Espessura da cutícula	56,70 $\pm$ 2,69 <sup>a</sup>	50,60 $\pm$ 5,57 <sup>a</sup>	55,93 $\pm$ 7,92 <sup>a</sup>	51,31 $\pm$ 6,64 <sup>a</sup>	56,59 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>	45,84 $\pm$ 4,19 <sup>a</sup>	49,23 $\pm$ 2,86 <sup>a</sup>	47,99 $\pm$ 1,87 <sup>a</sup>	51,62 $\pm$ 5,61 <sup>a</sup>	55,58 $\pm$ 6,90 <sup>a</sup>
Espessura da subcutícula	13,48 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	10,30 $\pm$ 2,90 <sup>a, b</sup>	8,43 $\pm$ 2,32 <sup>a, b</sup>	10,61 $\pm$ 2,49 <sup>a, b</sup>	6,31 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>	7,33 $\pm$ 4,03 <sup>b</sup>	5,95 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>	5,79 $\pm$ 1,47 <sup>b</sup>	6,28 $\pm$ 1,64 <sup>b</sup>	7,46 $\pm$ 2,99 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (ANOVA fatorial, *post-hoc* de Bonferroni;  $p>0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

Figura 12 - Média  $\pm$  desvio padrão da espessura ( $\mu\text{m}$ ) da subcutícula de *Rhipicephalus microplus*, após exposição aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.



Fonte: Da autora (2025).

## 5.7 Análise histopatológica do ovário

### 5.7.1 Grupo Controle

Na parede do ovário, foi observado epitélio de revestimento simples cúbico (Figura 13-A), com células de citoplasma basofílico e núcleo arredondado, localizado em posição central e corado pela hematoxilina. Em algumas células, foram observadas regiões não coradas no citoplasma. As células do pedicelo apresentaram características semelhantes às do epitélio de revestimento, entretanto, com formato alongado. Os ovócitos I foram as menores células observadas, sendo caracterizados pelo formato arredondado ou ovalado e citoplasma basofílico. O núcleo, corado em roxo, estava localizado em posição central, com nucléolo evidente e fortemente corado pela hematoxilina. Os ovócitos II eram maiores e apresentavam características semelhantes aos do estágio anterior, além de finas granulações no citoplasma. Nos ovócitos III, por sua vez, notou-se a ocorrência de grânulos citoplasmáticos eosinofílicos e não uniformes, além de núcleo em posição basal, com nucléolo evidente. Também foi possível observar o início da deposição do córion, caracterizado por uma fina camada basofílica externa à membrana plasmática. Nos ovócitos IV, também ocorreram granulações citoplasmáticas coradas pela eosina, com grânulos maiores ocupando a periferia celular, enquanto os menores se encontravam no centro da célula. As maiores células observadas foram os ovócitos V. Nesse estágio, foi possível observar o córion mais espesso, quando comparado aos estágios anteriores. O citoplasma estava inteiramente preenchido por grandes grânulos de vitelo (Figura 13-B), que se apresentaram homogêneos e fortemente corados pela eosina. Nos ovócitos IV e V, os núcleos raramente foram observados. Algumas células apresentaram alterações incomuns. Grânulos fortemente corados pela hematoxilina foram observados no citoplasma de cerca de 40% dos ovócitos I a III de todos os animais. Nos ovócitos I que apresentavam essa alteração, o núcleo, quando visível, estava deslocado em direção à periferia celular. Além disso, cerca de 10% dos ovócitos I a III exibiram regiões não coradas no citoplasma. Ademais, a vacuolização nucleolar (núcleo em formato de anel) esteve presente em cerca de 10% das células com nucléolo evidente. Por fim, aproximadamente 10% dos ovócitos IV e V apresentaram córion irregular.

### 5.7.2 Tratamento com *M. anisopliae*

Todos os animais do grupo TMA1 apresentaram pequenas alterações no formato dos ovócitos, mas em baixa frequência. A vacuolização citoplasmática (Figuras 14-A e 14-B)

ocorreu em cerca de 20% dos ovócitos mais jovens (I a III) de alguns indivíduos, enquanto grânulos basofílicos (Figura 14-B) foram encontrados no citoplasma de cerca de metade dessas células, em todos os animais do grupo. Alguns carrapatos apresentaram nucléolos vacuolizados (Figura 14-A), mas pouco recorrentes. Todos os indivíduos apresentaram córion espessado (Figuras 14-A e 14-B) em cerca de 20% dos ovócitos mais maduros (IV e V), além de córion irregular em diferentes graus de extensão. Ademais, a maioria dos carrapatos apresentou fusão dos grânulos de vitelo, mas acometendo um pequeno número de ovócitos V.

No grupo TMA2, todos os carrapatos apresentaram ovócitos com formato irregular. Em alguns indivíduos, áreas vacuolizadas (Figura 14-C) foram encontradas no citoplasma dos ovócitos I a III, acometendo até 35% dessas células. Em todos os animais, foram observadas granulações basofílicas, em até metade dos ovócitos mais jovens, além de nucléolos vacuolizados, em cerca de 25% dessas células. Nos ovócitos IV e V da maioria dos carrapatos, ocorreram córion mais espesso, além de córion irregular (Figura 14-C). Ademais, um indivíduo apresentou ruptura e fusão dos grânulos de vitelo (Figura 14-D), mas em baixa frequência.

Em três indivíduos do grupo TMA3, cerca de 10% dos ovócitos apresentaram formato irregular (Figura 14-E). Em alguns animais, a vacuolização citoplasmática (Figuras 14-E e 14-F) ocorreu em cerca de 20% dos ovócitos mais jovens, enquanto todos os carrapatos apresentaram granulações basofílicas (Figura 14-F) em cerca de metade dessas células. Em todos os indivíduos, foram observados nucléolos vacuolizados, em diferentes graus de extensão. Além disso, 10% a 25% dos ovócitos IV e V apresentaram córion espessado (Figura 14-E). Ademais, alguns carrapatos apresentaram córion irregular, enquanto em um indivíduo foi observada fusão dos grânulos de vitelo, mas apenas em alguns ovócitos V.

Todos os animais do grupo TMA4 apresentaram ovócitos com formato irregular, mas em baixa ocorrência. Em alguns animais, também foi observada a vacuolização citoplasmática em até 20% dos ovócitos mais jovens, enquanto granulações basofílicas (Figura 14-G) ocorreram em todos os indivíduos, sendo mais evidentes nos ovócitos I, com cerca de metade das células afetadas. A maioria dos carrapatos também apresentou vacuolização nucleolar, em proporções variadas. Em todos os animais, foi observado córion espessado (Figura 14-G) em cerca de 20% dos ovócitos mais maduros. Ademais, nos ovócitos V de alguns indivíduos, ocorreram córion irregular (Figura 14-H) e fusão dos grânulos de vitelo, mas em baixa frequência.

### **5.7.3 Tratamento com *M. robertsii***

No grupo TMR1, pequenas alterações no formato dos ovócitos foram observadas em todos os animais. Na maioria dos carrapatos, ocorreu vacuolização citoplasmática (Figuras 15-A e 15-B) em cerca de 20% dos ovócitos I a III. Em todos os indivíduos, granulações basofílicas (Figura 15-B) foram visualizadas nesses ovócitos, principalmente nos ovócitos I, afetando cerca de metade dessas células. Além disso, 20% a 40% dos nucléolos exibiram vacuolização, enquanto o espessamento do córion (Figuras 15-A e 15-B) ocorreu em até 20% dos ovócitos IV e V. A maioria dos carrapatos apresentou córion irregular, em proporções variadas. Ademais, foi observada a fusão de grânulos de vitelo, mas apenas em alguns ovócitos V.

A maioria dos animais do grupo TMR2 apresentou ovócitos com formato irregular (Figura 15-C), embora em baixa frequência. Em alguns indivíduos, a vacuolização citoplasmática ocorreu em cerca de 20% dos ovócitos I a III. Em todos os carrapatos, foram observados grânulos basofílicos (Figura 15-C) no citoplasma desses ovócitos, em diferentes proporções, enquanto cerca de 20% dos nucléolos apresentaram vacuolização. Em relação aos ovócitos IV e V, córion irregular foi observado em três indivíduos, enquanto o córion espessado (Figura 15-C) ocorreu em todos os carrapatos, mas em baixa frequência. Ademais, alguns carrapatos apresentaram fusão dos grânulos de vitelo (Figura 15-D) em até 20% dos ovócitos V.

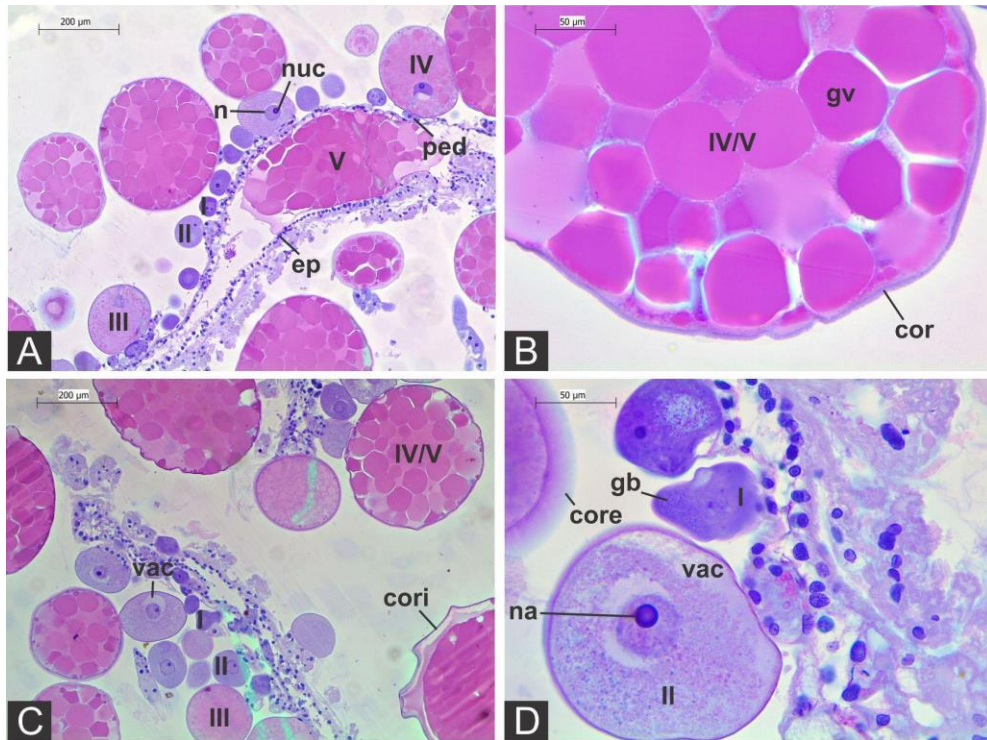
Em todos os animais do grupo TMR3, cerca de 20% dos ovócitos apresentaram formato irregular. A vacuolização citoplasmática (Figura 15-E) nos ovócitos I a III foi observada na maioria dos animais. Todos os carrapatos exibiram vacuolização nucleolar, em diferentes proporções, bem como granulações basofílicas (Figuras 15-E e 15-F), que acometeram cerca de 40% dos ovócitos mais jovens. Além disso, até 30% dos ovócitos IV e V apresentaram córion mais espesso (Figura 15-E). Ademais, na maioria dos animais, foram observadas células com córion irregular, enquanto ruptura e fusão dos grânulos de vitelo (Figura 15-E) ocorreram em uma pequena proporção de ovócitos.

No grupo TMR4, todos os carrapatos exibiram pequenas alterações no formato, embora em baixa frequência. A vacuolização citoplasmática (Figura 15-G) foi observada na maioria dos animais, acometendo até 20% dos ovócitos I a III. Todos os indivíduos exibiram granulações basofílicas (Figura 15-G) no citoplasma em aproximadamente metade dessas células, enquanto cerca de 20% dos nucléolos apresentaram vacuolização. Na maioria dos animais, foram observados córion espessado e/ou irregular (Figura 15-H) nos ovócitos mais maduros, em diferentes proporções. Ademais, em quatro carrapatos, alguns ovócitos V exibiram fusão dos grânulos de vitelo.

#### 5.7.4 Grupo Deltametrina

Em todos os indivíduos desse grupo, cerca de 10% dos ovócitos apresentaram alterações no formato. Na maioria dos carrapatos, observou-se vacuolização citoplasmática (Figuras 13-C e 13-D) em até 20% dos ovócitos mais jovens. Todos os animais exibiram granulações basofílicas (Figura 13-D) no citoplasma, em diferentes proporções, sendo mais evidentes nos ovócitos I e II. Nucléolos vacuolizados também ocorreram em todos os animais; bem como córion espessado (Figura 13-D), observado principalmente nos ovócitos IV e V. Ademais, alguns indivíduos apresentaram córion irregular (Figura 13-C), enquanto a maioria exibiu fusão dos grânulos de vitelo, alterações presentes em 10% a 20% dos ovócitos V.

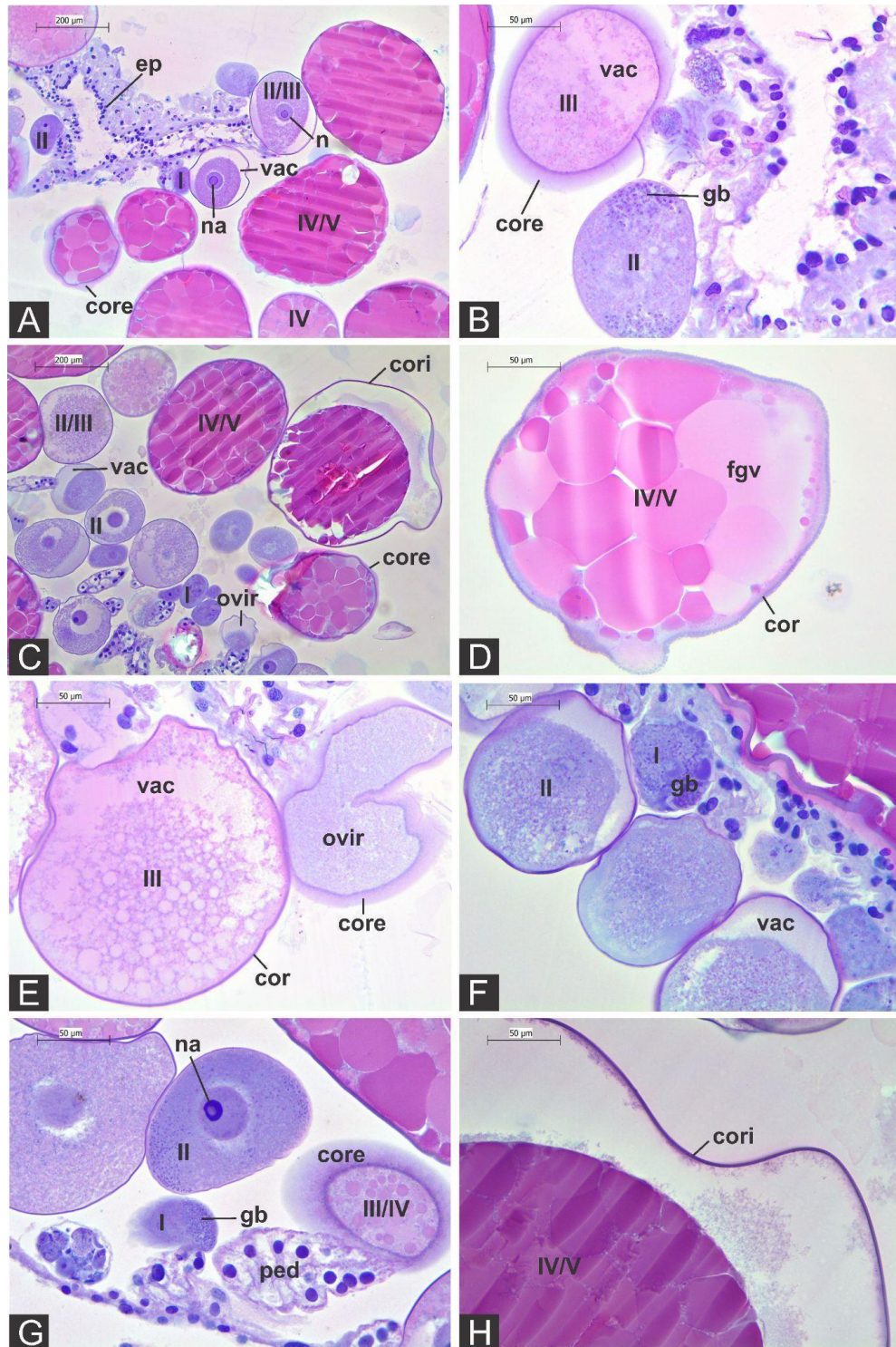
Figura 13 - Seções histológicas do ovário de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos à água destilada e à deltametrina, coradas com hematoxilina e eosina.



(A-B) Grupo Controle, (C-D) Grupo Deltametrina. Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos ovócitos, (cor) córion, (core) córion espessado, (cori) córion irregular, (ep) epitélio de revestimento, (gv) grânulo de vitelo, (gb) grânulos basofílicos, (n) núcleo, (nuc) nucléolo, (na) nucléolo em formato de anel, (ped) pedicelo, (vac) vacuolização citoplasmática. Barras: (A, C) 200 µm, (B, D) 50 µm.

Fonte: Da autora (2025).

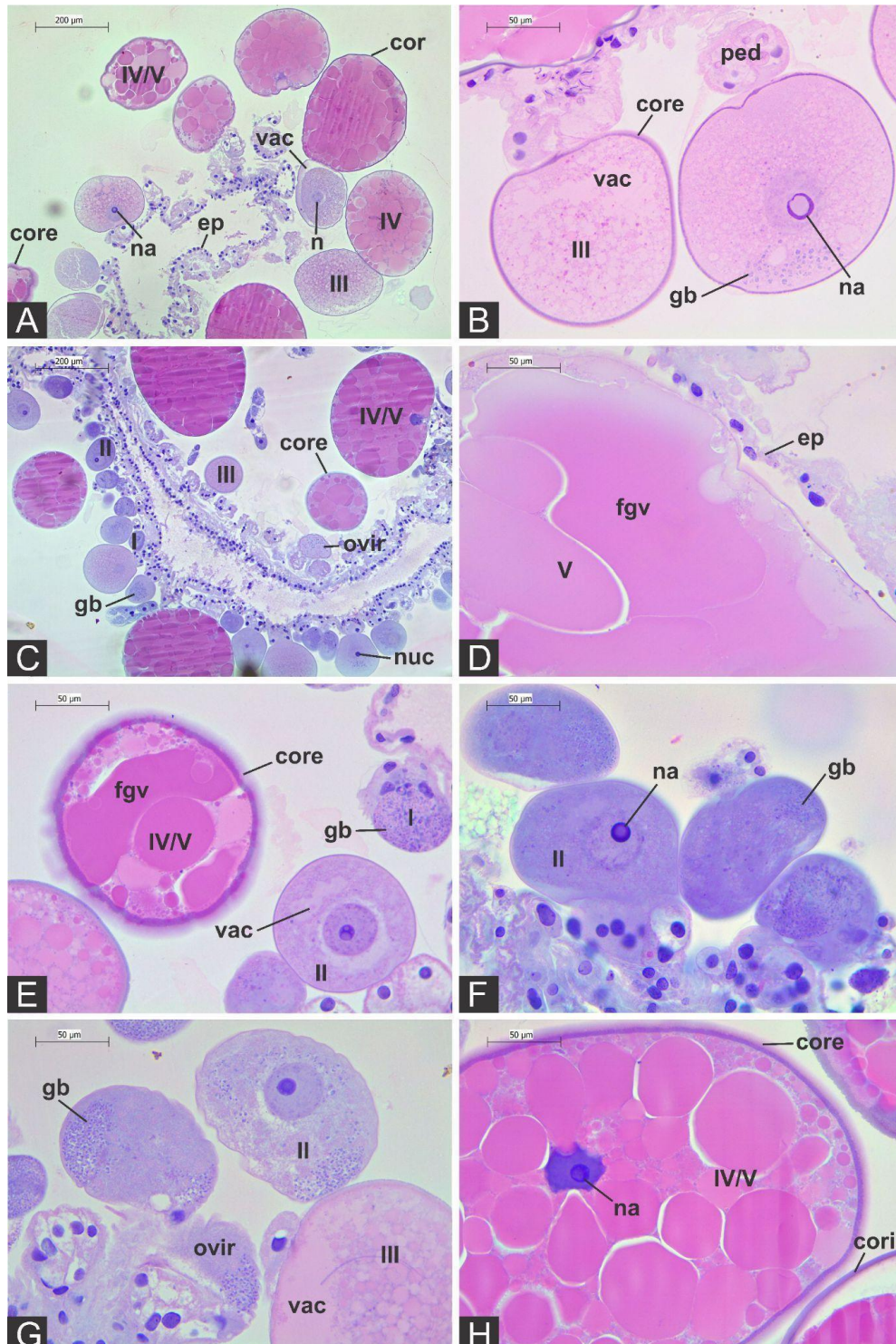
Figura 14 - Seções histológicas do ovário de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae*, associados ou não à deltametrina, coradas com hematoxilina e eosina.



(A-B) Grupo TMA1, (C-D) Grupo TMA2, (E-F) Grupo TMA3, (G-H) Grupo TMA4. Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos ovócitos, (cor) córion, (core) córion espessado, (cori) córion irregular, (ep) epitélio de revestimento, (fgv) fusão dos grânulos de vitelo, (gb) grânulos basofílicos, (n) núcleo, (na) nucléolo em formato de anel, (ovir) ovócito com formato irregular, (ped) pedicelo, (vac) vacuolização citoplasmática. Barras: (A, C) 200 µm, (B, D-H) 50 µm.

Fonte: Da autora (2025).

Figura 15 - Seções histológicas do ovário de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium robertsii*, associados ou não à deltametrina, coradas com hematoxilina e eosina.



(A-B) Grupo TMR1, (C-D) Grupo TMR2, (E-F) Grupo TMR3, (G-H) Grupo TMR4. (I-V) estágios de desenvolvimento dos ovócitos, (cor) córion, (core) córion espessado, (cori) córion irregular, (ep) epitélio de revestimento, (fgv) fusão dos grânulos de vitelo, (gb) grânulos basofílicos, (n) núcleo, (nuc) nucléolo, (na) nucléolo em formato de anel, (ovir) ovócito com formato irregular, (ped) pedicelo, (vac) vacuolização citoplasmática. Barras: (A, C) 200 µm, (B, D-H) 50 µm.

Fonte: Da autora (2025).

### 5.8 Análise semiquantitativa do ovário

As alterações morfológicas observadas no ovário dos carrapatos expostos aos extratos ativos e desnaturados de *M. anisopliae* e *M. robertsii*, associados ou não à deltametrina, estão listadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Média  $\pm$  desvio padrão dos índices de cada alteração ( $INDEX_{alt}$ ) observada no ovário de *Rhipicephalus microplus*, após a exposição aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.

Alterações morfológicas	Fator de importância (w)*	$INDEX_{alt}$									
		C	TMA1	TMA2	TMA3	TMA4	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4	D
Córion espessado	1	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,45	1,20 $\pm$ 0,45	1,60 $\pm$ 0,55	1,20 $\pm$ 0,45	1,00 $\pm$ 0,00	1,40 $\pm$ 0,55	1,40 $\pm$ 0,89	1,20 $\pm$ 0,45
Córion irregular	1	0,00 $\pm$ 0,00	1,80 $\pm$ 1,10	1,00 $\pm$ 0,71	0,40 $\pm$ 0,55	0,60 $\pm$ 0,55	1,40 $\pm$ 1,14	1,00 $\pm$ 1,22	1,00 $\pm$ 0,71	1,20 $\pm$ 0,84	0,40 $\pm$ 0,55
Alterações no conteúdo de proteínas	1	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,45
Alterações no conteúdo de carboidratos	1	0,00 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,55	0,40 $\pm$ 0,55	0,20 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45	0,40 $\pm$ 0,55	0,20 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45	0,20 $\pm$ 0,45	0,00 $\pm$ 0,00
Vacuolização citoplasmática	2	0,00 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 1,10	1,60 $\pm$ 1,67	0,80 $\pm$ 1,10	0,80 $\pm$ 1,10	1,60 $\pm$ 0,89	0,80 $\pm$ 1,10	1,60 $\pm$ 0,89	1,60 $\pm$ 0,89	1,60 $\pm$ 0,89
Formato irregular do ovócito	2	0,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	1,60 $\pm$ 0,89	1,20 $\pm$ 1,10	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	1,60 $\pm$ 0,89	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	1,20 $\pm$ 1,10
Fusão dos grânulos de vitelo	2	0,00 $\pm$ 0,00	1,60 $\pm$ 0,89	0,40 $\pm$ 0,89	0,40 $\pm$ 0,89	1,60 $\pm$ 0,89	0,80 $\pm$ 1,10	1,20 $\pm$ 1,10	1,60 $\pm$ 0,89	1,60 $\pm$ 0,89	1,60 $\pm$ 0,89
Vacuolização do nucléolo	3	0,00 $\pm$ 0,00	1,80 $\pm$ 1,64	4,20 $\pm$ 1,64	5,40 $\pm$ 2,51	3,00 $\pm$ 2,12	4,20 $\pm$ 1,64	3,00 $\pm$ 0,00	4,20 $\pm$ 1,64	3,00 $\pm$ 0,00	3,60 $\pm$ 1,34

\*Segundo König *et al.* (2019, 2020).

Fonte: Da autora (2025).

Os  $INDEX_{ind}$  estão apresentados na Tabela 7 e na Figura 16. Todos os grupos apresentaram as médias dos índices individuais significativamente maiores do que o grupo C ( $p < 0,05$ ). Além disso, não ocorreram diferenças significativas entre os demais grupos ( $p > 0,05$ ).

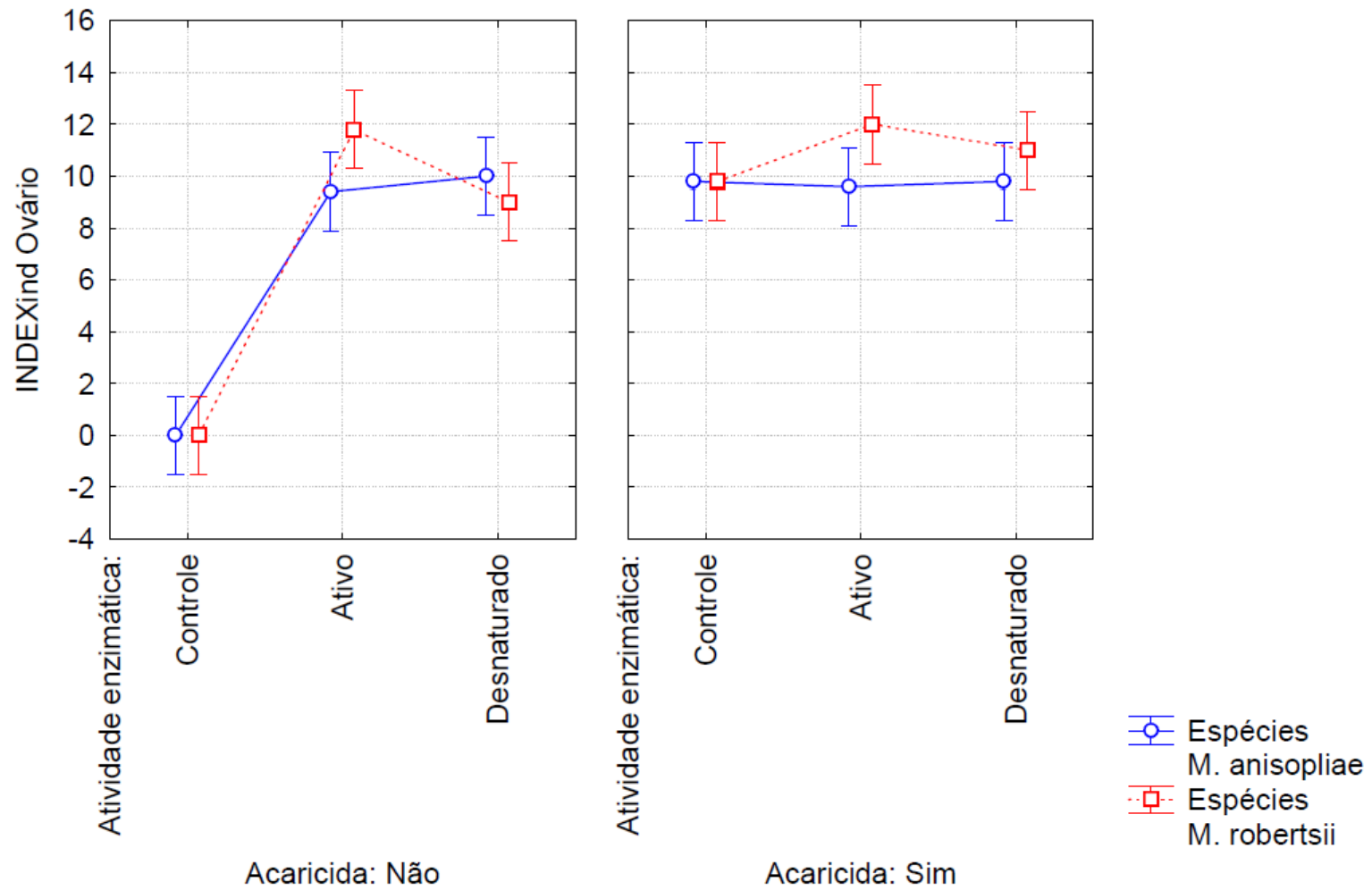
Tabela 7 - Média  $\pm$  desvio padrão dos índices individuais ( $INDEX_{ind}$ ) calculados a partir das alterações observadas no ovário de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, após a exposição aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.

Indivíduo	$INDEX_{ind}$									
	C	TMA1	TMA2	TMA3	TMA4	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4	D
I	0	9	13	9	10	11	9	10	13	10
II	0	7	9	9	10	13	8	12	12	8
III	0	7	7	10	12	15	6	12	12	10
IV	0	13	11	10	8	9	10	13	7	11
V	0	11	10	10	9	11	12	13	11	10
Média $\pm$ desvio padrão	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	9,40 $\pm$ 2,61 <sup>b</sup>	10,00 $\pm$ 2,24 <sup>b</sup>	9,60 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	9,80 $\pm$ 1,48 <sup>b</sup>	11,80 $\pm$ 2,28 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 2,24 <sup>b</sup>	12,00 $\pm$ 1,22 <sup>b</sup>	11,00 $\pm$ 2,35 <sup>b</sup>	9,80 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA fatorial, *post-hoc* de Bonferroni;  $p > 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

Figura 16 - Média  $\pm$  desvio padrão dos índices individuais (INDEX<sub>ind</sub>) obtidos a partir das alterações observadas no ovário de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.



Fonte: Da autora (2025).

### 5.9 Análise morfométrica do ovário

As médias das áreas dos ovócitos em cada estágio de desenvolvimento estão apresentadas na Tabela 8. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos apenas nos ovócitos IV (Figura 17). Nesse estágio, as áreas médias dos ovócitos dos grupos de tratamento, à exceção do TMA2 (extrato desnaturado de *M. anisopliae*) e TMA3 (extrato ativo de *M. anisopliae* + deltametrina) foram significativamente menores do que a área dos ovócitos do grupo C ( $p < 0,05$ ). Enquanto todos os grupos, à exceção do C, apresentaram médias estatisticamente iguais entre si ( $p > 0,05$ ).

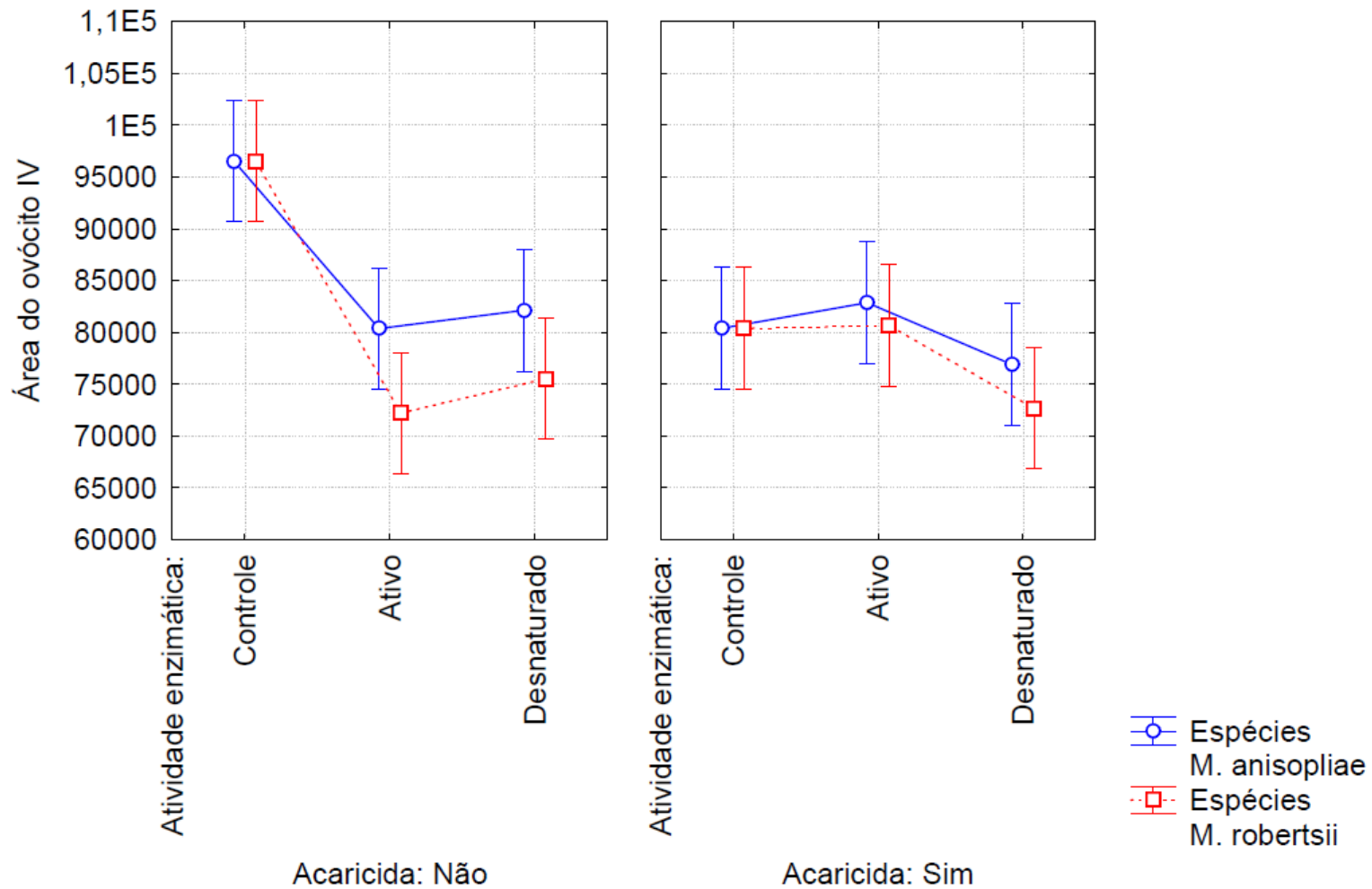
Tabela 8 - Média  $\pm$  desvio padrão das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) dos ovócitos de *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, de forma isolada ou em associação com a deltametrina.

Estágios dos ovócitos	C	TMA1	TMA2	TMA3	TMA4	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4	D
I	4380,16 $\pm$	4063,12 $\pm$	4003,24 $\pm$	4335,57 $\pm$	4178,93 $\pm$	4300,35 $\pm$	4029,37 $\pm$	4181,68 $\pm$	4253,38 $\pm$	4372,66 $\pm$
	416,52 <sup>a</sup>	475,66 <sup>a</sup>	127,92 <sup>a</sup>	685,87 <sup>a</sup>	177,24 <sup>a</sup>	434,27 <sup>a</sup>	211,23 <sup>a</sup>	276,47 <sup>a</sup>	414,44 <sup>a</sup>	433,08 <sup>a</sup>
II	10006,91 $\pm$	10069,58 $\pm$	10137,84 $\pm$	9999,66 $\pm$	10917,06 $\pm$	10682,19 $\pm$	8866,61 $\pm$	8891,02 $\pm$	9987,18 $\pm$	9593,21 $\pm$
	449,85 <sup>a</sup>	1044,49 <sup>a</sup>	872,27 <sup>a</sup>	1418,17 <sup>a</sup>	1294,39 <sup>a</sup>	1441,86 <sup>a</sup>	781,57 <sup>a</sup>	817,05 <sup>a</sup>	885,90 <sup>a</sup>	923,16 <sup>a</sup>
III	36819,19 $\pm$	32731,92 $\pm$	34623,35 $\pm$	30659,60 $\pm$	28679,69 $\pm$	34623,35 $\pm$	30862,54 $\pm$	30726,61 $\pm$	31108,05 $\pm$	33711,76 $\pm$
	4532,56 <sup>a</sup>	4997,05 <sup>a</sup>	3766,05 <sup>a</sup>	4846,43 <sup>a</sup>	4056,20 <sup>a</sup>	3766,05 <sup>a</sup>	3129,93 <sup>a</sup>	1535,36 <sup>a</sup>	5310,56 <sup>a</sup>	1358,36 <sup>a</sup>
IV	96536,91 $\pm$	80381,61 $\pm$	82143,49 $\pm$	82871,41 $\pm$	76901,36 $\pm$	72214,63 $\pm$	75542,79 $\pm$	80685,86 $\pm$	72677,11 $\pm$	80401,05 $\pm$
	2729,31 <sup>a</sup>	5353,09 <sup>b</sup>	4959,76 <sup>a, b</sup>	2995,71 <sup>a, b</sup>	7041,54 <sup>b</sup>	12745,33 <sup>b</sup>	7225,42 <sup>b</sup>	5842,66 <sup>b</sup>	8473,36 <sup>b</sup>	5641,36 <sup>b</sup>
V	134278,90	130314,33 $\pm$	131223,56	127767,87	127650,15 $\pm$	123814,83	128283,58	126841,05	123488,60	128725,83
	$\pm$ 2850,34 <sup>a</sup>	10865,87 <sup>a</sup>	$\pm$ 3588,62 <sup>a</sup>	$\pm$ 5461,53 <sup>a</sup>	19849,45 <sup>a</sup>	$\pm$ 8395,96 <sup>a</sup>	$\pm$ 17378,36 <sup>a</sup>	$\pm$ 3126,24 <sup>a</sup>	$\pm$ 5230,73 <sup>a</sup>	$\pm$ 6462,03 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (ANOVA fatorial, *post-hoc* de Bonferroni;  $p > 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

Figura 17 - Média  $\pm$  desvio padrão das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) dos ovócitos IV de *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* e/ou à deltametrina.



Fonte: Da autora (2025).

Em relação às áreas dos núcleos dos ovócitos nos estágios I a III, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 - Média  $\pm$  desvio padrão das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) do núcleo dos ovócitos de *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, de forma isolada ou em associação com a deltametrina.

<b>Estágios dos ovócitos</b>	<b>C</b>	<b>TMA1</b>	<b>TMA2</b>	<b>TMA3</b>	<b>TMA4</b>	<b>TMR1</b>	<b>TMR2</b>	<b>TMR3</b>	<b>TMR4</b>	<b>D</b>
I	730,64 $\pm$	469,66 $\pm$	753,53 $\pm$	705,44 $\pm$	616,28 $\pm$	665,64 $\pm$	603,86 $\pm$	611,71 $\pm$	679,67 $\pm$	749,32 $\pm$
	107,90 <sup>a</sup>	119,49 <sup>a</sup>	143,98 <sup>a</sup>	142,57 <sup>a</sup>	95,91 <sup>a</sup>	174,72 <sup>a</sup>	70,13 <sup>a</sup>	171,17 <sup>a</sup>	61,77 <sup>a</sup>	161,54 <sup>a</sup>
II	1095,95 $\pm$	1015,89 $\pm$	993,52 $\pm$	973,66 $\pm$	1048,65 $\pm$	1071,15 $\pm$	902,99 $\pm$	1034,17 $\pm$	1099,47 $\pm$	1154,60 $\pm$
	88,22 <sup>a</sup>	214,74 <sup>a</sup>	148,99 <sup>a</sup>	114,30 <sup>a</sup>	126,91 <sup>a</sup>	174,08 <sup>a</sup>	210,42 <sup>a</sup>	189,65 <sup>a</sup>	128,61 <sup>a</sup>	161,52 <sup>a</sup>
III	1434,18 $\pm$	1347,18 $\pm$	1324,67 $\pm$	1300,16 $\pm$	1151,02 $\pm$	1355,35 $\pm$	1147,95 $\pm$	1489,09 $\pm$	1344,30 $\pm$	1464,77 $\pm$
	238,41 <sup>a</sup>	91,23 <sup>a</sup>	264,83 <sup>a</sup>	145,80 <sup>a</sup>	257,11 <sup>a</sup>	136,32 <sup>a</sup>	309,79 <sup>a</sup>	196,09 <sup>a</sup>	219,49 <sup>a</sup>	189,82 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (ANOVA fatorial, *post-hoc* de Bonferroni;  $p > 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

As razões núcleo/ovócito (R), calculadas a partir da divisão da área do núcleo pela área dos ovócitos I a III, estão apresentadas na Tabela 10. Em todos os estágios de desenvolvimento, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p>0,05$ ).

Tabela 10 - Média  $\pm$  desvio padrão da razão núcleo/ovócito (R) de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, de forma isolada ou em associação com a deltametrina.

<b>Estágios dos ovócitos</b>	<b>C</b>	<b>TMA1</b>	<b>TMA2</b>	<b>TMA3</b>	<b>TMA4</b>	<b>TMR1</b>	<b>TMR2</b>	<b>TMR3</b>	<b>TMR4</b>	<b>D</b>
I	0,16 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
II	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
III	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (ANOVA fatorial, *post-hoc* de Bonferroni;  $p>0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

Em relação ao número estimado de ovócitos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos estágios de desenvolvimento (Tabela 11).

Tabela 11 - Média  $\pm$  desvio padrão do número estimado de ovócitos de *Rhipicephalus microplus*, após exposição aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*, de forma isolada ou em associação com a deltametrina.

<b>Estágios dos ovócitos</b>	<b>C</b>	<b>TMA1</b>	<b>TMA2</b>	<b>TMA3</b>	<b>TMA4</b>	<b>TMR1</b>	<b>TMR2</b>	<b>TMR3</b>	<b>TMR4</b>	<b>D</b>
I	76 $\pm$ 24,66 <sup>a</sup>	123 $\pm$ 26,81 <sup>a</sup>	113 $\pm$ 66,97 <sup>a</sup>	86 $\pm$ 36,46 <sup>a</sup>	51 $\pm$ 29,80 <sup>a</sup>	48 $\pm$ 38,31 <sup>a</sup>	89 $\pm$ 41,51 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 28,21 <sup>a</sup>	131 $\pm$ 35,29 <sup>a</sup>	137 $\pm$ 89,96 <sup>a</sup>
II	48 $\pm$ 29,87 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 27,64 <sup>a</sup>	33 $\pm$ 18,69 <sup>a</sup>	35 $\pm$ 11,28 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 11,10 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 17,52 <sup>a</sup>	48 $\pm$ 23,92 <sup>a</sup>	50 $\pm$ 17,35 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 8,28 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 36,70 <sup>a</sup>
III	51 $\pm$ 25,09 <sup>a</sup>	51 $\pm$ 22,98 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 21,82 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 16,23 <sup>a</sup>	26 $\pm$ 15,74 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 7,30 <sup>a</sup>	33 $\pm$ 14,47 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 12,19 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 25,57 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 17,70 <sup>a</sup>
IV	40 $\pm$ 10,18 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 6,36 <sup>a</sup>	27 $\pm$ 20,68 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 5,10 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 2,92 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 11,76 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 12,74 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 8,84 <sup>a</sup>	29 $\pm$ 19,18 <sup>a</sup>	28 $\pm$ 3,91 <sup>a</sup>
V	78 $\pm$ 27,32 <sup>a</sup>	47 $\pm$ 18,65 <sup>a</sup>	46 $\pm$ 25,08 <sup>a</sup>	61 $\pm$ 16,78 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 25,33 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 26,86 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 23,82 <sup>a</sup>	65 $\pm$ 38,32 <sup>a</sup>	79 $\pm$ 40,42 <sup>a</sup>	93 $\pm$ 28,80 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (ANOVA fatorial, *post-hoc* de Bonferroni;  $p > 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2025).

## 6 DISCUSSÃO

O controle biológico com fungos entomopatogênicos, dentre eles *Metarhizium* spp., é considerado seguro para o meio ambiente e para organismos não-alvo (Cafarchia *et al.*, 2022). Essas espécies produzem compostos biologicamente ativos, como toxinas, substâncias imunossupressoras e enzimas líticas (Wang; Wang, 2017), que podem estar presentes em seus extratos. Os extratos de *M. anisopliae* (EAMa 05/03-Su) e *M. robertsii* (EAMr 09/01-Su), por exemplo, causaram mortalidade de 52% e 48% das larvas da lagarta *Spodoptera littoralis*, respectivamente (Resquín-Romero; Garrido-Jurado; Quesada-Moraga, 2016). O extrato de *M. anisopliae* (CECT 2952), por sua vez, foi responsável por 90% de mortalidade da mosca *Ceratitis capitata*, além de causar alterações na fecundidade e na fertilidade das fêmeas (Castillo *et al.*, 2000). Estes fungos podem, inclusive, ser empregados no manejo integrado de carrapatos (Webster *et al.*, 2015). Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que avaliou a ação de extratos de *M. anisopliae* e *M. robertsii* na morfologia externa e interna de carrapatos *Rhipicephalus microplus*.

No presente estudo, a mortalidade de carrapatos foi semelhante nos grupos tratados com os extratos ativos de *M. anisopliae*, independente da aplicação de deltametrina. No entanto, quando o acaricida sintético foi aplicado após o extrato desnaturado, houve aumento na mortalidade, indicando um possível sinergismo entre seus componentes e a deltametrina. Além disso, os grupos expostos ao extrato ativo apresentaram maior mortalidade em relação aos tratados com o extrato desnaturado, indicando uma possível contribuição enzimática. Em relação a *M. robertsii*, a aplicação de deltametrina após os extratos resultou em menor mortalidade do que a observada para os grupos onde os extratos foram aplicados isoladamente, sugerindo interferência negativa do acaricida sintético na ação dos compostos fúngicos. Ademais, as enzimas secretadas por *M. robertsii* aparentemente não contribuíram para o aumento da mortalidade.

A estrutura do integumento de *R. microplus* do grupo controle apresentou características morfológicas semelhantes às descritas na literatura (Hackman, 1982; Remedio; Nunes; Camargo-Mathias, 2015; Sonenshine; Roe, 2014). Nos carrapatos expostos aos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium* spp., associados ou não à deltametrina, bem como nos expostos apenas ao acaricida sintético, as principais alterações observadas foram: cutícula com morfologia alterada, desaparecimento das subdivisões da cutícula, desaparecimento da subcutícula, estratificação e desorganização epitelial, núcleos dilatados ou amorfos e núcleos picnóticos.

A análise semiquantitativa das amostras de integumento não revelou diferenças significativas entre os grupos controle e deltametrina. Quando comparados ao grupo exclusivamente tratado com deltametrina, os extratos ativos de *M. anisopliae* (com e sem deltametrina) resultaram em índices individuais ( $INDEX_{ind}$ ) estatisticamente maiores. Não foram detectadas, contudo, diferenças entre os grupos tratados com os extratos de *M. anisopliae* isoladamente e aqueles expostos aos extratos e à deltametrina, característica também observada entre os grupos tratados com os extratos de *M. robertsii*, sugerindo que o uso de deltametrina não interferiu na ação dos extratos fúngicos, uma vez que esse piretroide atua principalmente sobre o sistema nervoso central de carrapatos (Camargo-Mathias *et al.*, 2017). Como não foram observadas diferenças entre os extratos ativos e desnaturados de ambos os fungos, as alterações no integumento provavelmente resultaram da ação dos seus compostos não enzimáticos, como destruxinas (Lozano-Tovar *et al.*, 2023), citocalasinas, ovalicina (Leger; Wang, 2020), ácido helvólico (Sun *et al.*, 2022), glicerato, oxalato, ácido oleico, ácido linoleico, aucubina e sorbitol (Xu *et al.*, 2016). Há relatos da ação inseticida de algumas dessas substâncias, como as destruxinas A, A2 e B contra a mosca *Anastrepha obliqua* (Lozano-Tovar *et al.*, 2023); a aucubina contra mosquitos vetores de patógenos (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*) (Vivekanandhan; Swathy; Shivakumar, 2022) e o ácido linoleico contra a lagarta *S. littoralis* (Yousef; El-Lakwah; Sayed, 2013).

Na literatura, estudos com enzimas e sua ação sobre carrapatos são escassos. Entretanto, há alguns relatos em outros artrópodes. As enzimas líticas do fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus* causaram degradação cuticular em larvas da traça *Galleria mellonella*, sendo observadas ruptura da cutícula e queda de cerdas (Lopez-Llorca; Carbonell; Gomez-Vidal, 2002). As proteases e quitinases da bactéria *Bacillus licheniformis* causaram ruptura completa da epicutícula e da procutícula, além de fragmentação das cerdas em adultos do cupim *Reticulitermes speratus* (Moon *et al.*, 2023). Curiosamente, os resultados aqui obtidos indicaram que a ação enzimática foi irrelevante entre os grupos tratados com os extratos de *M. robertsii*. Essa espécie secreta meroterpenoides, como os subglutinóis C e D (Kato *et al.*, 2016), geralmente não identificados em *M. anisopliae*. Segundo Jiang *et al.* (2020), meroterpenoides fúngicos são metabólitos secundários com potencial para inibir a atividade de enzimas, incluindo hidrolases. Considerando que lipases, proteases e quitinases pertencem a essa classe enzimática (Shukla; Bendre; Gaikwad, 2022; Schrank; Vainstein, 2010), sugere-se que os meroterpenoides possam ter interferido negativamente na ação dessas enzimas.

Abreu *et al.* (2020) e Lima-de-Souza *et al.* (2022) relataram estratificação e desorganização epitelial em fêmeas de *R. sanguineus* expostas à água ozonizada e ao carvacrol, respectivamente. Estas alterações também foram observadas em *R. microplus* expostos aos extratos de *Metarhizium* spp. A formação de múltiplas camadas celulares ocorre quando os níveis de toxicidade estão altos e consiste em uma estratégia do organismo para se proteger da ação de compostos tóxicos. A estratificação do epitélio aumenta a barreira física, dificultando a entrada desses agentes (Abreu *et al.*, 2020). Somado a isso, a presença de núcleos dilatados ou picnóticos nas células epiteliais, identificada em todos os grupos de tratamento, pode indicar um processo de morte celular. Montasser e Amin (2010) relataram dilatação nuclear nas células epiteliais de carrapatos *Argas persicus*, após tratamento com o acaricida sintético ivermectina, e a presença de núcleos picnóticos foi observada nos estudos de Abreu *et al.* (2020) e Lima-de-Souza *et al.* (2022), corroborando os dados aqui obtidos.

Substâncias que causam alterações na epiderme podem comprometer a secreção e a deposição dos componentes cuticulares (Coons; Alberti, 1999; Abreu *et al.*, 2020). Nos carrapatos expostos aos extratos de *Metarhizium* spp., alterações na morfologia da cutícula e desaparecimento de suas subdivisões, bem como ausência parcial e redução da espessura da subcutícula de alguns indivíduos, foram frequentemente observados. Modificações na subcutícula também foram relatadas em carrapatos *R. sanguineus* expostos a diferentes concentrações de acetilcarvacrol (Oliveira *et al.*, 2020) e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) (Remedio *et al.*, 2015), corroborando os resultados do presente trabalho. Calligaris *et al.* (2013) e Lima-de-Souza *et al.* (2022), após avaliarem a ação do acaricida sintético fluazuron e do bioativo carvacrol, respectivamente, sobre o integumento de carrapatos *Rhipicephalus* spp., sugeriram que a ação dessas substâncias pode resultar em anormalidades na formação da cutícula e desaparecimento de suas subdivisões.

O ovário dos carrapatos do grupo controle também apresentou características semelhantes às descritas para a espécie (Saito *et al.*, 2005). Na análise semiquantitativa, os grupos tratados com os extratos ativos e desnaturados de ambos os fungos, associados ou não à deltametrina, bem como o grupo exposto apenas ao acaricida sintético, exibiram índices individuais estatisticamente diferentes do grupo controle. As principais alterações morfológicas observadas foram: ovócitos com formato irregular, grânulos basofílicos no citoplasma, vacuolização citoplasmática e nucleolar e irregularidades e espessamento do córion. No presente estudo, a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os extratos ativos e desnaturados de ambos os fungos indica que as alterações observadas no ovário provavelmente resultaram da ação dos componentes não enzimáticos dos extratos,

como as citocalasinas. Estas toxinas foram responsáveis pelo descolamento da lâmina basal, fragmentação nuclear e condensação do citoplasma e da cromatina nas células foliculares do ovário da mariposa *Manduca sexta* (Sauman; Berry, 1993), corroborando os resultados aqui obtidos. Ademais, outros componentes não enzimáticos presentes nos extratos podem ter sido responsáveis pelos efeitos aqui observados.

Diversos estudos relataram a ocorrência de regiões não coradas no citoplasma de ovócitos de *R. microplus* expostos a diferentes acaricidas (Konig *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2021, 2023; Sousa *et al.*, 2013). Segundo Arnosti *et al.* (2011), essa alteração representa um mecanismo celular de defesa, no qual a célula tenta isolar substâncias tóxicas ou porções do citoplasma danificadas por esses compostos, a fim de preservar suas funções metabólicas. No presente estudo, a vacuolização citoplasmática foi uma das alterações morfológicas mais recorrentes, sendo observada nos ovócitos de todos os grupos. Essa alteração esteve presente principalmente nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento, cujas características os tornam mais vulneráveis à ação de substâncias químicas, como a ausência de córion (Remedio *et al.*, 2015) e a maior permeabilidade da membrana (Konig *et al.*, 2019). Ademais, alguns autores sugerem que a vacuolização citoplasmática é um indicativo de comprometimento da permeabilidade celular, resultando em alterações no fluxo de moléculas entre a célula e o meio externo (Konig *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2015). Segundo Secchis *et al.* (2022), alterações na permeabilidade da membrana comprometem a capacidade da célula em manter seu equilíbrio osmótico, o que pode, inclusive, resultar em alterações em seu formato.

O córion, depositado a partir do estágio III (Saito *et al.*, 2005), funciona como uma barreira protetora, dificultando a entrada de substâncias estranhas nas células (Oliveira *et al.*, 2009). Além disso, essa estrutura apresenta microporos, que permitem a entrada de oxigênio para o interior das células (Sampieri *et al.*, 2012). Uma vez que sua integridade é comprometida, o desenvolvimento embrionário pode tornar-se inviável (Arnosti *et al.*, 2011; Sampieri *et al.*, 2012). Nos carrapatos tratados com os extratos de *Metarhizium* spp., irregularidades e espessamento do córion foram observados nos ovócitos mais desenvolvidos, principalmente IV e V. Segundo Konig *et al.* (2019), o espessamento dessa estrutura representa uma tentativa da célula de se proteger contra a entrada de substâncias estranhas. Entretanto, isso pode prejudicar as trocas gasosas, comprometendo a sobrevivência do embrião. Irregularidades no córion também foram observadas por Kumar *et al.* (2019) e Bisht *et al.* (2024), que analisaram a morfologia de ovócitos de *R. microplus* após exposição aos acaricidas sintéticos amitraz e ivermectina, respectivamente.

Os nucléolos vacuolizados são caracterizados por uma massa compacta em formato de anel, envolvendo um vacúolo central (Denardi *et al.*, 2010). Alterações nessas estruturas podem interferir na síntese proteica, uma vez que o nucléolo é o local da biogênese de ribossomos (Scheer; Hock, 1999), além de indicar desorganização e, possivelmente, morte celular (Denardi *et al.*, 2010). De forma semelhante aos dados aqui obtidos, outros estudos também identificaram esta alteração em ovócitos de carrapatos de diferentes espécies (Konig *et al.*, 2019, 2020; Remedio *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2025).

Pequenos grânulos basofílicos foram frequentemente observados no citoplasma de carrapatos de todos os grupos, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento. Esses dados estão de acordo com os relatados por Remedio *et al.* (2014) e Ribeiro *et al.* (2025), que notaram a ocorrência de grânulos semelhantes e, em maior frequência, em ovócitos de carrapatos expostos a diferentes substâncias acaricidas. Segundo esses autores, os grânulos podem corresponder a microrganismos simbióticos presentes no interior dos ovócitos. Adicionalmente, os danos causados aos ovócitos tratados com produtos acaricidas podem comprometer a sua capacidade em controlar o desenvolvimento e a reprodução desses microrganismos, o que explica a maior ocorrência nos indivíduos tratados.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram os efeitos dos extratos ativos e desnaturados de *Metarhizium* spp., associados ou não à deltametrina, bem como do acaricida sintético aplicado isoladamente, sobre a morfologia do integumento e do ovário de *Rhipicephalus microplus*. As análises histopatológicas indicaram que tanto os extratos, quanto o acaricida sintético, em diferentes extensões e sem efeito sinérgico, foram responsáveis por alterações morfológicas no integumento e/ou no ovário. As alterações no integumento podem prejudicar suas funções e favorecer a penetração de compostos acaricidas, comprometendo a sobrevivência dos carrapatos. Além disso, os danos ao ovário podem resultar na redução do número de indivíduos viáveis nas gerações subsequentes, contribuindo para o controle desses ectoparasitos. Futuros estudos poderão avaliar os possíveis efeitos desses extratos em organismos não-alvo e sua estabilidade em condições de campo, além de associações com outros acaricidas sintéticos, a fim de investigar um possível efeito sinérgico.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. R. *et al.* Exposure of ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to ozonated water: integument response. **Ozone: Science & Engineering**, v. 42, n. 6, p. 507-516, 2020.
- ACHI, L. Y. *et al.* Resistance of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* to alphacypermethrin, deltamethrin and amitraz in Côte d'Ivoire. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 910-922, 2022.
- AGWUNOBI, D. O. *et al.* *Cymbopogon citratus* essential oil-induced ultrastructural & morphological changes in the midgut, cuticle & Haller's organ of the tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Systematic and Applied Acarology**, v. 25, n. 11, p. 2047-2062, 2020.
- AGWUNOBI, D. O.; YU, Z.; LIU, J. A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 173, p. 104776, 2021.
- ALCALÁ-GÓMEZ, J. *et al.* Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates and the effects of fungal infection on the reproduction potential of *Rhipicephalus microplus* engorged females. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 8, p. 931-939, 2017.
- ALONSO-DÍAZ, M. A.; FERNÁNDEZ-SALAS, A. Entomopathogenic fungi for tick control in cattle livestock from Mexico. **Frontiers in fungal biology**, v. 2, p. 657694, 2021.
- ALONSO-DÍAZ, M. A. *et al.* Effect of *Metarhizium anisopliae* (Ma14 strain) against *Rhipicephalus microplus* on cattle infested naturally. **Southwestern Entomologist**, v. 47, n. 2, p. 285-290, 2022.
- ANDREOTTI, R. *et al.* **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**, v. 1. EMBRAPA, 2019.
- ANHOLETO, L. A. *et al.* Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy research and technique**, v. 81, n. 11, p. 1347-1357, 2018.
- ARNOSTI, A. *et al.* Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 575-580, 2011.
- AZMI, N. F. A. M. *et al.* Effectiveness of Malaysia-isolated *Metarhizium anisopliae* against *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 44, n. 6, p. 2939-2946, 2024.
- BARBIERI, A. *et al.* Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 3, p. 102147, 2023.

BARBOSA, C. S. *et al.* In vitro activity of 3- $\beta$ -O-tigloylmelianol from *Guarea kunthiana* A. Juss (Meliaceae) on oogenesis and ecdysis of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, 164, p. 5-11, 2016.

BARON, N. C.; RIGOBELLO, E. C.; ZIED, D. C. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. **Chilean journal of agricultural research**, v. 79, n. 2, p. 307-315, 2019.

BAUTISTA-GARFIAS, C. R. *et al.* *Rhipicephalus microplus*: tick classification, morphological identification and life cycle. **A Laboratory Manual on *Rhipicephalus microplus***, p. 13, 2023.

BERESTETSKIY, A.; HU, Q. The chemical ecology approach to reveal fungal metabolites for arthropod pest management. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1379, 2021.

BEYS-DA-SILVA, W. O. *et al.* Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 5, p. 2282-2296, 2014.

BEYS-DA-SILVA, W. O. *et al.* Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, p. 107812, 2020.

BHOWMICK, B.; HAN, Q. Understanding tick biology and its implications in anti-tick and transmission blocking vaccines against tick-borne pathogens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 319, 2020.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.

BISHT, N. *et al.* Comparative effect of ivermectin and amitraz on cellular architecture of ovaries, synganglion and Gené's organ of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 123, n. 8, p. 305, 2024.

BRUNNER-MENDOZA, C. *et al.* A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 83-102, 2019.

CAFARCHIA, C. *et al.* Delivery and effectiveness of entomopathogenic fungi for mosquito and tick control: Current knowledge and research challenges. **Acta Tropica**, v. 234, p. 106627, 2022.

CALLIGARIS, I. B. *et al.* Action of the insect growth regulator fluazuron, the active ingredient of the acaricide Acatak VR, in *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, p. 1177-1185, 2013.

CALVANO, M. P. C. A. *et al.* Bioeconomic simulation of *Rhipicephalus microplus* infestation in different beef cattle production systems in the Brazilian Cerrado. **Agricultural Systems**, v. 194, p. 103247, 2021.

CAMARGO, M. G. *et al.* Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 271-276, 2014.

CAMARGO, M. G. *et al.* *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42, 2016.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. *et al.* Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* sl (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 72, p. 161-169, 2017.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. Editora Unesp: São Paulo, 2018.

CASTILLO, M. *et al.* Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. **Biological control**, v. 19, n. 3, p. 274-282, 2000.

CASTRO-SAINES, E.; LAGUNES-QUINTANILLA, R.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, R. Microbial agents for the control of ticks *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 123, n. 7, p. 275, 2024.

CHEN, Z.; WANG, Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 754, n. 1-2, p. 367-395, 1996.

CHRUSTEK, A. *et al.* Current research on the safety of pyrethroids used as insecticides. **Medicina**, v. 54, n. 4, p. 61, 2018.

COHEN, E. Chapter 2 - Chitin Biochemistry: Synthesis, Hydrolysis and Inhibition. **Advances in Insect Physiology**, v. 38, p. 5-74, 2010.

COONS, L. B.; ALBERTI, G. Acari: ticks. **Microscopic anatomy of invertebrates**, v. 8, p. 267-514, 1999.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 6, p. 101252, 2019.

DAVIES, T. G. E. *et al.* DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB life**, v. 59, n. 3, p. 151-162, 2007.

DENARDI, S. E. *et al.* Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 379-395, 2004.

DENARDI, S. E. *et al.* *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 462-470, 2010.

DESTA, B. G. E. A. H. Review on the impact of ticks on livestock health and productivity. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 6, p. 1-7, 2016.

DHANAPAL, R. *et al.* Entomopathogenic fungal metabolites useful in agriculture and healthcare. In: **Entomopathogenic Fungi: Prospects and Challenges**. Springer Nature Singapore: Singapore, 2024.

DOLENGA, C. J. R. *et al.* Histological changes of oocytes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) treated with copper solutions. **Experimental Parasitology**, v. 265, p. 108812, 2024.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological research**, v. 104, n. 2, p. 134-150, 2000.

DRUMMOND, S. E. *et al.* *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, p. 345-360, 2006.

DZEMO, W. D. *et al.* Acaricide resistance development in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations against amitraz and deltamethrin on Communal Farms of the King Sabata Dalindyebo Municipality, South Africa. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 875, 2023.

EBANI, V. V.; MANCIANTI, F. Entomopathogenic fungi and bacteria in a veterinary perspective. **Biology**, v. 10, n. 6, p. 479, 2021.

ESTRADA-PEÑA, A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 1, p. 53-65, 2015.

EVANS, A. *et al.* Acaricide resistance status of livestock ticks from East and West Africa and in vivo efficacy of acaricides to control them. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 25, p. 100541, 2024.

FENG, M. G.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol science and technology**, v. 4, n. 1, p. 3-34, 1994.

FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 300-305, 2012.

FERNÁNDEZ-SALAS, A. *et al.* 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**, v. 31, n. 1, p. 36-43, 2017.

FERREIRA, P. T. *et al.* Prevalence of and potential risk factors for multiple resistance to acaricides in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks: A survey in the state of Rio Grande Do Sul, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 1-12, 2024.

FIGUEROA, L. B. P. *et al.* Enzyme production by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their application in the control of nematodes

(*Haemonchus* spp. and *Meloidogyne incognita*) in vitro. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 8, p. 100077, 2024.

FIOROTTI, J. *et al.* Ultrastructural and cytotoxic effects of *Metarhizium robertsii* infection on *Rhipicephalus microplus* hemocytes. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 654, 2019.

FUENTE, J. *et al.* Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, 13, p. 6938-6946, 2008.

GAJENDIRAN, A.; ABRAHAM, J. An overview of pyrethroid insecticides. **Frontiers in Biology**, v. 13, p. 79-90, 2018.

GEREMEW, D.; SHIBERU, T.; LETA, A. Isolation, morphological characterization, and screening virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii* fungal isolates on *Galleria mellonella*. **F1000Research**, v. 12, p. 827, 2024.

GÖTTLICH, E. *et al.* Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. **Mycoses**, v. 38, n. 11-12, p. 489-494, 1995.

GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HABEEB, S. M.; ASHRY, H. M.; SAAD, M. M. Ovicidal effect of chitinase and protease enzymes produced by soil fungi on the camel tick *Hyalomma dromedarii* eggs (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, p. 268-273, 2017.

HACKMAN, R. H. Structure and function in tick cuticle. **Annual Review of Entomology**, 27, 75-95, 1982.

HASSAN, A. A. *et al.* Efficacy of chitinolytic enzyme produced by some soil fungi (*Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*) in biological control of cattle ticks. **International Journal of Research Studies in Biosciences**, v. 3, n. 2, p. 7-13, 2015.

HENKER, L. C. *et al.* Bovine abortion, stillbirth and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma* sp. infections in southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 11, n. 4, p. 101443, 2020.

HERRERO, M. *et al.* The roles of livestock in developing countries. **Animal**, v. 7, n. s1, p. 3-18, 2013.

HIGA, L. O. S. *et al.* Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Med. Chem**, v. 5, p. 326-333, 2015.

HORN, S. J. *et al.* Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. **The FEBS journal**, v. 273, n. 3, p. 491-503, 2006.

HSIAO, Y. M.; KO, J. L. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 837-841, 2001.

HU, X. *et al.* Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, p. 16796-16801, 2014.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Rebanho de bovinos (bois e vacas)**. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Acesso em: 19 fev 2025.

ISAKA, M. *et al.* Bioactive substances from insect pathogenic fungi. **Accounts of Chemical Research**, v. 38, n. 10, p. 813-823, 2005.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAKUBKE, H.; KUHLE, P.; KÖNNECKE, A. Basic principles of protease-catalyzed peptide bond formation. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 24, n. 2, p. 85-93, 1985.

JAMIL, M. *et al.* A review: An insight into the potential of biological control of ticks in domestic and wild animals. **Abasyn Journal of Life Sciences**, v. 5, n. 2, p. 51-67, 2022.

JANER, E. C. *et al.* Molecular survey of pyrethroid and fipronil resistance in isolates of *Rhipicephalus microplus* in the north of Uruguay. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 12, n. 5, p. 101747, 2021.

JIANG, M. *et al.* The chemistry and biology of fungal meroterpenoids (2009–2019). **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 1644-1704, 2020.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Santos, 1983.

KATO, H. *et al.* New natural products isolated from *Metarhizium robertsii* ARSEF 23 by chemical screening and identification of the gene cluster through engineered biosynthesis in *Aspergillus nidulans* A1145. **The Journal of Antibiotics**, v. 69, n. 7, p. 561-566, 2016.

KAUFMAN, W. R.; FLYNN, P. C. A comparison of the cuticular properties of the female ticks *Ixodes pacificus* and *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) throughout the feeding period. **Experimental and Applied Acarology**, v. 76, p. 365-380, 2018.

KEIRANS, J. E.; DURDEN, L. A. Tick systematics and identification. **Tick-Borne Diseases of Humans**, p. 123-140, 2005.

KIDANU, S.; HAGOS, L. Research and application of entomopathogenic fungi as pest management option: a review. **Journal of Environment and Earth Science**, v. 10, n. 3, p. 31-39, 2020.

KLAFKE, G. *et al.* Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2017.

KONIG, I. F. M. *et al.* Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 766-774, 2019.

KONIG, I. F. M. *et al.* Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, p. 102780, 2020.

KUMAR, K. G. A. *et al.* Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1085-1095, 2019.

KUMAR, R.; KLAFKE, G. M.; MILLER, R. J. Voltage-gated sodium channel gene mutations and pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 11, n. 3, p. 101404, 2020.

LEDWABA, M. B.; MALATJI, D. P. *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931, a sole extant species of the genus *Nuttalliella* – a scoping review. **Frontiers in Parasitology**, v. 3, p. 1401351, 2024.

LEGER, R. J.; WANG, J. B. *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. **Open Biology**, v. 10, n. 12, p. 200307, 2020.

LEGER, R. J. S. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 3, p. 271-276, 2008.

LIMA-DE-SOUZA, J. R. *et al.* The bioactive compound carvacrol as a potential acaricide: An assessment of its effects on the integument of female *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. **Microscopy research and technique**, v. 85, n. 5, p. 1784-1790, 2022.

LITWIN, A.; NOWAK, M.; RÓŻALSKA, Sylwia. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 1, p. 23-42, 2020.

LIU, Y. *et al.* Subchronic toxicity of oral deltamethrin in laying chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1079580, 2022.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; CARBONELL, T.; GOMEZ-VIDAL, S. Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. **Mycological Progress**, v. 1, n. 3, p. 249-256, 2002.

LOZANO-TOVAR, M. D. *et al.* Study on the insecticidal activity of entomopathogenic fungi for the control of the fruit fly (*Anastrepha obliqua*), the main pest in mango crop in Colombia. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 3, p. 83, 2023.

MACHTINGER, E. T. *et al.* An integrative framework for tick management: the need to connect wildlife science, One Health, and interdisciplinary perspectives. **Current Opinion in Insect Science**, v. 61, p. 101131, 2024.

MANS, B. J. *et al.* *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23675, 2011.

MARCIANO, A. F. *et al.* Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4972, 2021.

MATOS, R. S. *et al.* Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, v. 113, p. 4555-4565, 2014.

MEJÍA, C. *et al.* Assessment of fungal lytic enzymatic extracts produced under submerged fermentation as enhancers of entomopathogens' biological activity. **Current Microbiology**, v. 81, n. 7, p. 217, 2024.

MENT, D. *et al.* *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, n. 2, p. 132-139, 2010.

MENT, D. *et al.* Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 8, p. 956-967, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHARRAM, A. M.; ABDEL-GALIL, F. A.; HAFEZ, W. M. M. On the enzymes' actions of entomopathogenic fungi against certain indigenous and invasive insect pests. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-9, 2021.

MONDAL, S. *et al.* Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2016.

MONTASSER, A. A.; AMIN, A. Effect of ivermectin on the integument and dorsoventral muscles of the tick *Argas (Persicargas) persicus* (Oken)(Ixodoidea: Argasidae). **Parasitology research**, v. 107, p. 975-982, 2010.

MOON, J. *et al.* The anti-termite activity of *Bacillus licheniformis* PR2 against the subterranean termite, *Reticulitermes speratus kyushuensis* Morimoto (Isoptera: Rhinotermitidae). **Forests**, v. 14, n. 5, p. 1000, 2023.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. e0552015, 2017.

MUHANGUZI, D. *et al.* Invasive cattle ticks in East Africa: morphological and molecular confirmation of the presence of *Rhipicephalus microplus* in south-eastern Uganda. **Parasites & vectors**, v. 13, p. 1-9, 2020.

MUNIZ, E. R. *et al.* Efficacy of *Metarhizium anisopliae* conidia in oil-in-water emulsion against the tick *Rhipicephalus microplus* under heat and dry conditions. **BioControl**, v. 65, p. 339-351, 2020.

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

NAVA, S. *et al.* Chapter 1 - tick classification, external tick anatomy with a glossary, and biological cycles. **Ticks of the Southern Cone of America**, p. 1-23, 2017.

NIH (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE). **Deltamethrin**. 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deltamethrin>. Acesso em: 27 ago 2025.

NORDISK, N. Enzymes at work. **Berlitz Translation Services**. Ed. Novo Nordisk Bagsvaerd: Copenhagen, 1995.

NWANADE, C. F.; YU, Z.; LIU, J. Botanical acaricides induced morphophysiological changes of reproductive and salivary glands in tick: A mini-review. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 285-291, 2020.

OBAID, M. K. *et al.* Acaricides resistance in ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 941831, 2022.

OJEDA-CHI, M. M. *et al.* 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.

OLIVEIRA, M. V. S. *et al.* Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 82, p. 265-279, 2020.

OLIVEIRA, P. R. *et al.* Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 146-156, 2005.

OLIVEIRA, P. R. *et al.* Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255-1264, 2009.

OSSA-LÓPEZ, P. A. *et al.* Morphological and molecular confirmation of *Ornithodoros hasei* (Schulze, 1935) (Acari: Argasidae) in Colombia. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 14, n. 3, p. 102142, 2023.

OUEDRAOGO, A. S. *et al.* Efficacy of two commercial synthetic pyrethroids (cypermethrin and deltamethrin) on *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus microplus* strains of the southwestern region of Burkina Faso. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1-7, 2021.

OYEN, K.; POH, K. C. *Rhipicephalus microplus* (Southern cattle tick; Asian blue tick). **Trends in Parasitology**, 2025.

PAULO, J. F. *et al.* *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology research**, v. 117, p. 1847-1856, 2018.

PEARSE, A. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Edinburgh: ChurchillLivingstone, 1985.

PELIZZA, S. A. *et al.* Entomopathogenic fungi from Argentina for the control of *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) nymphs: fungal pathogenicity and enzyme activity. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 10, p. 1119-1129, 2012.

PENG, Z. *et al.* An update of a green pesticide: *Metarhizium anisopliae*. **All Life**, v. 15, n. 1, p. 1141-1159, 2022.

PEREIRA, I. S. *et al.* Effect of *Metarhizium anisopliae* s.l. on *Rhipicephalus microplus* free-living stage and persistence in the soil in the Brazilian Northeast. **Biocontrol Science and Technology**, v. 32, n. 5, p. 648-662, 2022.

PERINOTTO, W. M. S. *et al.* Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 189-196, 2014.

POLAR, P. *et al.* Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 159-167, 2005.

POLAR, P. *et al.* Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p. 119-148, 2008.

PUNDIR, C. S. **Enzyme nanoparticles: preparation, characterisation, properties and applications**. William Andrew, 2015.

RAJPUT, M. *et al.* Entomopathogenic fungi as alternatives to chemical acaricides: Challenges, opportunities and prospects for sustainable tick control. **Insects**, v. 15, n. 12, p. 1017, 2024.

RAYNAL, J. T. *et al.* Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 71-77, 2013.

RECK, J. *et al.* Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 56-62, 2009.

REIS, A. C. *et al.* Cytotoxic effects of *Satureja montana* L. essential oil on oocytes of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 7, p. 1375-1388, 2021.

REIS, A. C. *et al.* Toxic effect of *Callistemon viminalis* essential oil on the ovary of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 90, n. 1, p. 99-117, 2023.

REMEDIO, R. N. *et al.* Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 12, p. 989-998, 2014.

REMEDIO, R. N. *et al.* Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 114, p. 431-444, 2015.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 319-327, 2015.

RESQUÍN-ROMERO, G.; GARRIDO-JURADO, I.; QUESADA-MORAGA, E. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 92, p. 101-110, 2016.

REZENDE, G. L. *et al.* Composite eggshell matrices: chorionic layers and sub-chorionic cuticular envelopes. **Extracellular composite matrices in arthropods**, p. 325-366, 2016.

RIBEIRO, J. C. S. *et al.* Alpha- and beta-pinene alter the morphology of oocytes in *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, p. 110507, 2025.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1570-1572, 2013.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology research**, v. 117, p. 3-29, 2018.

ROVIRA, C. *et al.* Mannosidase mechanism: at the intersection of conformation and catalysis. **Current opinion in structural biology**, v. 62, p. 79-92, 2020.

SAILLENFAIT, A.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. Pyrethroids: exposure and health effects—an update. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 218, n. 3, p. 281-292, 2015.

SAITO, K. C. *et al.* Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 299-311, 2005.

SALEEM, M. Z. *et al.* Histopathological investigation of skin and hides damage of small and large ruminants due to naturally infested ticks. **Tropical Biomedicine**, v. 36, n. 4, p. 1081-1086, 2019.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S389-S403, 2004.

SAMPIERI, B. R. *et al.* Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 5, p. 683-690, 2012.

SÁNCHEZ-PÉREZ, L. C. *et al.* Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. **Advances in Enzyme Research**, v. 2, n. 02, p. 65-76, 2014.

SANTI, L. *et al.* Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 874-880, 2010.

SANTORO, P. H. *et al.* Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 313-319, 2005.

SANTOS, M. L. *et al.* Control of cattle tick in pasture with *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425). **Systematic and Applied Acarology**, v. 27, n. 11, p. 2131-2138, 2022.

SANTOS, T. S. *et al.* Entomopathogenic fungi biomass production and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles for bioinsecticide action. **Applied Sciences**, v. 11, n. 6, p. 2465, 2021.

SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M.I J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American journal of botany**, v. 99, n. 1, p. 101-107, 2012.

SAUMAN, I.; BERRY, S. J. Cytochalasin-D treatment triggers premature apoptosis of insect ovarian follicle and nurse cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 37, n. 3, p. 441-450, 1993.

SCHEER, U.; HOCK, R. Structure and function of the nucleolus. **Current opinion in cell biology**, v. 11, n. 3, p. 385-390, 1999.

SCHMALTZ, S. *et al.* Biomolecules in modern and sustainable agriculture. **3 Biotech**, v. 13, n. 2, p. 70, 2023.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

SECCHIS, M. V. *et al.* Effect of the formulation with fipronil and fluazuron on the reproductive biology and ovaries histopathology of *Rhipicephalus microplus* engorged females. **Parasitology Research**, v. 121, n. 3, p. 839-849, 2022.

SHANG, J.; SONG, S.; WANG, C. *Metarhizium robertsii*. **Trends in Parasitology**, n. 2, p. 192-193, 2024.

SHANMUGANATH, C. *et al.* Development of an efficient antitick natural formulation for the control of acaricide-resistant ticks on livestock. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 3, p. 101655, 2021.

SHARMA, J. *et al.* Partial purification of an alkaline protease from a new strain of *Aspergillus oryzae* AWT 20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-Alginate beads. **Internet J Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 1-14, 2006.

SHIN, T. *et al.* Screening and evaluation of antibacterial metabolites from entomopathogenic fungi. **International Journal of Industrial Entomology and Biomaterials**, v. 26, n. 2, p. 89-94, 2013.

SHUKLA, E.; BENDRE, A. D.; GAIKWAD, S. M. Hydrolases: the most diverse class of enzymes. In: **Hydrolases**. IntechOpen, 2022.

SIFUNA, D. B. *et al.* Acaricides in agriculture: balancing livestock health and environmental well-being in Tans-Nzoia County, Kenya. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 32, p. 8070-8083, 2025.

SILVA, T. F. *et al.* Bovine parasite sadness: Review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e15410111631-e15410111631, 2021.

SILVA, W. O. B. *et al.* Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

SILVERMAN, R. B. **Organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. Elsevier, 2002.

SINGH, S. *et al.* Advances and future prospects of pyrethroids: Toxicity and microbial degradation. **Science of the Total Environment**, v. 829, p. 154561, 2022.

SOARES, F. E. F. *et al.* Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1557-1565, 2013.

SODERLUND, D. M. *et al.* Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3-59, 2002.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**, v. 1. Ed. Oxford University Press, New York. pp. 280–303. 1994.

SONENSHINE, D. E.; ROE, MICHAEL. **Biology of ticks**, v. 2, p. 491, 2014.

SOUSA, A. B. B. *et al.* First description of acaricide resistance in populations of *Rhipicephalus microplus* tick from the lower Amazon, Brazil. **Animals**, v. 12, n. 21, p. 2931, 2022.

SOUSA, L. A. D. *et al.* Ovary histology and quantification of hemolymph proteins of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* treated with *Melia azedarach*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 339-345, 2013.

SOUZA, J. R. L. *et al.* The effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. JUSS) enriched with different concentrations of azadirachtin on the integument of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. **Microscopy Research and technique**, v. 80, n. 8, p. 838-844, 2017.

SOUZA, J. R. L. *et al.* Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66-72, 2019.

SREELEKHA, K. *et al.* Ultrastructural analysis of oocytes of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* during postengorgement period as a tool to evaluate the cytotoxic effects of amitraz and deltamethrin on the germinative cells. **Veterinary parasitology**, v. 247, p. 113-120, 2017.

STENBERG, J. A. *et al.* When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 665-676, 2021.

SUN, Y. *et al.* Production of helvolic acid in *Metarhizium* contributes to fungal infection of insects by bacteriostatic inhibition of the host cuticular microbiomes. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. e02620-22, 2022.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2017.

TESFAYE, T.; ABATE, A. Knowledge, attitude and practices study of acaricide usage and tick control in South Omo Zone pastoral areas, South-Western Ethiopia. **Heliyon**, v. 9, n. 6, 2023.

THATHEYUS, A. J.; SELVAM, A. D. G. Synthetic pyrethroids: toxicity and biodegradation. **Applied Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n. 3, p. 33-36, 2013.

VALENTINE, W. M. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 20, n. 2, p. 375-382, 1990.

VALSONI, L. M. *et al.* Resistance to all chemical groups of acaricides in a single isolate of *Rhipicephalus microplus* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 46, n. 4, p. 276-280, 2020.

VELÁZQUEZ-SARMIENTO, F. *et al.* *Metarhizium anisopliae* sensu lato native to livestock soils causes high mortality on *Rhipicephalus microplus* larvae, adults and affects their reproduction. **The Journal of Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 106-113, 2024.

VIEIRA, L. L. *et al.* Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite epidemiology and control**, v. 6, p. e00114, 2019.

VILLAMIZAR, L. F. *et al.* Characterization of a new strain of *Metarhizium novozealandicum* with potential to be developed as a biopesticide. **Mycology**, v. 12, n. 4, p. 261-278, 2021.

VIVEKANANDHAN, P.; SWATHY, K.; SHIVAKUMAR, M. S. Identification of insecticidal molecule aucubin from *Metarhizium anisopliae* ethyl acetate crude extract against disease mosquito vector. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 5, p. 3303-3318, 2022.

WALDMAN, J. *et al.* Putative target sites in synganglion for novel ixodid tick control strategies. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 14, n. 3, p. 102123, 2023.

WANG, C.; WANG, S. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements. **Annual review of entomology**, v. 62, n. 1, p. 73-90, 2017.

WANG, Q.; XU, L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2367-2377, 2012.

WEBSTER, A. *et al.* Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p. 302-308, 2015.

WU, C. *et al.* Vacuolization in cytoplasm and cell membrane permeability enhancement triggered by micrometer-sized graphene oxide. **ACS nano**, v. 9, n. 8, p. 7913-7924, 2015.

XU, Y. *et al.* Metabolic conservation and diversification of *Metarhizium* species correlate with fungal host-specificity. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2020, 2016.

YOUSEF, H. E. B. A.; EL-LAKWAH, S. F.; SAYED, Y. A. Insecticidal activity of linoleic acid against *Spodoptera littoralis* (Boisd.). **Egyptian Journal of Agricultural Research**, v. 91, n. 2, p. 573-580, 2013.

ZHU, Q. *et al.* Synthesis, insecticidal activity, resistance, photodegradation and toxicity of pyrethroids (A review). **Chemosphere**, v. 254, p. 126779, 2020.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007.