

15 de septiembre, 2025

**Señores AGROBECA:**

**ASUNTO:** Avances del Proyecto de Graduación: Sinakan Tomas Saquic

En el presente adjunto, encuentre los avances del Proyecto de Graduación de Sinakan Tomas Saquic. Para cualquier información adicional, estaré atenta de su comunicación.

Saludos Cordiales,

*Nicole Vayssier*

**Nicole Vayssier**

Representante de Zamorano en Guatemala  
Dirección de Desarrollo Institucional

**Honduras**  
Valle de Yeguaire km 30  
Carretera de Tegucigalpa a Danlí  
Francisco Morazán, Honduras, C.A.

T: +504 2287-2180 ext. 2001 / 2004  
[www.zamorano.edu](http://www.zamorano.edu)

**United States**  
1701 Pennsylvania Ave. NW  
Suite 300  
Washington, DC 20006

T. (202) 461-2242  
[wdc@zamorano.edu](mailto:wdc@zamorano.edu)

**Educación para sustentar la vida.**

**Universidad Zamorano**  
**Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Ingeniería Agronómica**



Proyecto Especial de Graduación

**Uso de *Beauveria bassiana* B.Y *Metarhizium anisopliae* M. como  
biopesticidas para el control de garrapatas (*Rhipicephalus microplus* C.)  
en época seca en la unidad de ganado de leche de Zamorano, Honduras**

Estudiante

Sinakan Tomás Saquic Mejía (25282)

Asesores

Ing. Rogelio Trabanino, M. Sc.

Marielena Moncada, Ph. D.

Honduras, septiembre de 2025

**Autoridades**

**KEITH L. ADREWS**

Rector a. i.

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**CELIA O. TREJO RAMOS**

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

**JULIO NAVARRO**

Secretarío General

## Agradecimientos

(Opcional)

## Contenido

Resumen .....	6
Introducción.....	8
Materiales y Métodos .....	12
Resultados .....	17
Conclusiones .....	22
Recomendaciones .....	23
Referencias .....	24
Anexos .....	28

### Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1</b> Porcentaje de mortalidad semanal de garrapatas <i>R. microplus</i> , para determinar la eficiencia de los agentes biológicos <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae/B. bassiana</i> y el tratamiento control Amitraz 12.5% en vacas secas de la Universidad Zamorano .....	19
<b>Cuadro 2</b> Estimación de Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95) de <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> , tratamiento combinado de <i>M. anisopliae/B. bassiana</i> y control químico (Amitraz 12.5%) sobre garrapatas adultas obtenidos por medio del análisis Probit .....	21
<b>Cuadro 3</b> Porcentaje de infección en adultos de <i>R. microplus</i> colectados de vacas secas bajo tratamientos de control biológico, Universidad Zamorano, Honduras .....	19

### Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Representación de Tiempo Letal 50 y 99, obtenida en la prueba de estimación para <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> , mezcla entre <i>M. anisopliae/B. bassiana</i> y Amitraz 12.5% sobre <i>R. microplus</i> .....	30
--	----

### Índice de Anexos

Anexo 1 Garrapatas Colonizadas Con <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> .....	28
Anexo 2 Aplicación de tratamientos. ....	28
Anexo 3 Muestreo de garrapatas.....	29
Anexo 4 Garrapatas en inserción de cola e isquiones.....	29

## Resumen

El presente proyecto especial de graduación analiza la eficacia de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como una alternativa biológica para el control de garrapatas (*R. microplus*) en el ganado lechero de Zamorano, Honduras. Se evaluó la eficacia de seis tratamientos con distintas concentraciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, así como una mezcla de ambos hongos entomopatógenos, frente a un control químico, bajo un diseño completamente al azar con mediciones repetidas durante cuatro semanas. Las variables medidas fueron: porcentaje de mortalidad, porcentaje de infección y tiempo letal 50 y 95. Los resultados mostraron que el tratamiento químico presentó el porcentaje de mortalidad de garrapatas significativamente más alto 79.75% y tiempos letales de  $TL_{50} = 62.9$  h;  $TL_{95} = 136.8$  h. Mientras que, el tratamiento *M. anisopliae* en dosis de  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml alcanzó un porcentaje de mortalidad de 47.55%, con  $TL_{50}$  de 68.9 h;  $TL_{95}$  de 121.6 h y porcentaje de infección in vitro del 97.5%, a la vez, tratamiento *B. bassiana* en dosis de  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml mostró un porcentaje de mortalidad de 50.13%, con tiempos letales más prolongados  $TL_{50}$  de 148.0 h ;  $TL_{95}$  216 h y porcentaje de infección de 95%, se posicionaron significativamente como los tratamientos con mayor porcentaje de control en comparación a las concentraciones bajas de ambos organismos y estos a la vez fueron estadísticamente iguales a la mezcla de ambos hongos que alcanzó una mortalidad de 5.40%, una infección de 80% y un  $TL_{95}$  141.35h.

*Palabras clave: Esporas, infección, mortalidad, tiempo letal.*

## Abstract

This special graduation project analyzes the efficacy of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as a biological alternative for the control of ticks (*R. microplus*) in dairy cattle in Zamorano, Honduras. The efficacy of six treatments with different concentrations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as well as a mixture of both entomopathogenic fungi, was evaluated against a chemical control, under a completely randomized design with repeated measurements over four weeks. The measured variables were: percentage of mortality, percentage of infection, and lethal times 50 and 95. The results showed that the chemical treatment presented a significantly higher tick mortality percentage of 79.75% and lethal times of  $TL_{50} = 62.9$  h;  $TL_{95} = 136.8$  h. Meanwhile, the *M. anisopliae* treatment at a dose of  $1.6 \times 10^{10}$  spores/ml achieved a mortality percentage of 47.55%, with  $TL_{50}$  of 68.9 h;  $TL_{95}$  of 121.6 h, and an in vitro infection percentage of 97.5%. At the same time, the *B. bassiana* treatment at a dose of  $2.2 \times 10^{10}$  spores/ml showed a mortality percentage of 50.13%, with longer lethal times  $TL_{50}$  of 148.0 h;  $TL_{95}$  of 216 h, and an infection percentage of 95%. These treatments were significantly positioned as those with the highest control percentage compared to the low concentrations of both organisms, and these, in turn, were statistically equal to the mixture of both fungi, which achieved a mortality of 5.40%, an infection of 80%, and a  $TL_{95}$  of 141.35 h.

*Keywords: Infection, lethal time, mortality, spores.*

## Introducción

Las garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) representan uno de los ectoparásitos de mayor importancia económica en la ganadería, afectando severamente tanto la producción de leche como carne (Food and Agriculture Organization [FAO], 2024). En el contexto de Centroamérica existe una falta de estudios nacionales específicos cuantificados sobre su impacto económico, se han identificado reducción de peso y pérdidas de producción lechera en fincas de zonas como Catacamas, Olancho, Honduras, donde las infestaciones afectan directamente el rendimiento (Lepez-Lopez y Brizo- Murillo, 2022). A nivel mundial, estudios en países como Brasil permiten inferir el impacto económico, donde se han estimado pérdidas globales por garrapatas bovinas de alrededor de 968 millones de USD anuales, con hasta el 40% atribuible a la disminución de producción láctea (Rodrigues y Leite, 2013).

Jonsson (2006) explica que cada garrapata hembra completamente alimentada puede provocar una pérdida de peso promedio de 1.37g en ganado *Bos taurus* L. mientras que en cruces con *Bos indicus* L. 1.18g. En vacas Hostein-Friesian durante un experimento se observó que las vacas infestadas produjeron 8,9ml menos de leche por día y tuvieron aproximadamente 1 g menos de ganancia de peso corporal diario en comparación con la ganancia diaria de peso de vacas libres de garrapatas (Jonsson et al., 1998). Estudios de Jiao et al. (2021) muestran que *R. microplus* puede ser vector de *Anaplasma marginale*, *Coxiella burnetii*, agentes patógenos que pueden causar enfermedades caracterizadas por anemia, problemas reproductivos, fiebre y debilidad.

Peréz et al. (2023) señalan que el control convencional de *R. microplus* en la ganadería depende fuertemente del uso de acaricidas sintéticos aplicados de forma repetida y rutinaria, lo que ha promovido el desarrollo de resistencia múltiple en poblaciones de garrapatas. A su vez Rodríguez y colaboradores (2017) obtuvieron resistencia del 67% para Amitraz, 50% para alfa-cipermetrina y del 25 al 42% para ivermectina en doce poblaciones analizadas en Ecuador.

En estudios recientes, diversos autores han documentado la resistencia en *R. microplus* a través de varios mecanismos, Obaid et al (2022) reportan que se conocen tres formas principales de resistencia a los acaricidas; Por un lado, Rodríguez-Vivas et al. (2015) explican el aumento de la detoxificación metabólica, mediado por familias enzimáticas como citocromos P-450, glutatión S-transferasas y carboxilesterasas, permiten al ácaro metabolizar o secuestrar los acaricidas antes de que ejerzan su efecto tóxico. Por su parte, Coles y Dryden (2014) mencionan “resistencia a la modificación del sitio objetivo” que se desarrolla a través de cambios conformacionales en el sitio objetivo del acaricida en enzimas neuronales y receptores, lo que conduce a una interacción deteriorada entre el fármaco y el objetivo. Mientras que, Guerrero et al (2012) describen la resistencia a la penetración reducida, en la que disminuye el acceso de los acaricidas al entorno corporal interno debido a modificaciones en el exoesqueleto.

Sumada a esta problemática por resistencia a los acaricidas Vega et al. (2022) detectaron residuos de amitraz, cipermetrina y clorpirifós en muestras de leche entera de vacas lecheras en Costa Rica, en algunos casos superando el límite máximo permitido comprometiendo la inocuidad del producto lácteo. Para evitar estos efectos Jonsson y Hope (2007) mencionan que el uso continuo de una familia química no se extienda por más de 6 a 9 meses consecutivos, en el caso de Amitraz el fabricante recomienda hacer aplicaciones en función al nivel de infestación con intervalos de aplicación no menor a 7 días. Cuando se emplea de manera excesiva, además de riesgos de resistencia, Nanjundappa et al. (2021) reportan efectos adversos en los animales, como estrés metabólico, disminución en la producción de leche, alteraciones en el consumo de alimento, irritación cutánea y presencia de residuos en tejidos comestibles y leche.

Estos hallazgos refuerzan la necesidad de implementar alternativas sostenibles. Muniz et al. (2021) mencionan que *Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más estudiados para el control de garrapatas. Por otro lado, Beys-Da-Silva et al. (2019) destaca el alto potencial de *Metarhizium anisopliae* como agente controlador de artrópodos de forma individual o en asociación

con otros productos como acaricidas químicos. St Leger (2008) menciona que el hongo entomopatógeno está ampliamente disperso en la naturaleza, encontrándose en el suelo, la rizosfera, raíces de plantas y los cadáveres de artrópodos infectando en condiciones saprofitas.

Ortiz-Urquiza y Keyhani (2016) explican que los conidios de estos hongos entomopatógenos infectan a las garrapatas a través de su cutícula o aberturas naturales, la colonización de este agente inicia con la adhesión de los conidios en el cutícula del huésped, la producción del tubo germinativo, la diferenciación en apresorio, la penetración a través de la cutícula por presión mecánica en conjunto con acción enzimática de lipasas, proteasas y quitinasas, permitiendo el crecimiento dentro del tegumento y el hemocele del huésped. Una vez dentro, Rajput et al. (2024) mencionan que, los hongos entomopatógenos producen estructuras fúngicas como; racimos de micelios y blastosporas que producen toxinas en el cuerpo de la garrapata en el caso de *B. bassiana* se producen Beauvericin, Beauverolide. Mientras que, en *M. anisopliae* se produce la toxina Dextruxina más metabolitos secundarios como los ácidos cítrico y oxálico. Según Wang et al. (2004), estas toxinas causan la destrucción de los procesos celulares, las trompas de Malpighi, los tejidos musculares, así como el intestino medio y una parálisis flácida en el cuerpo de la garrapata, que conduce a la muerte.

Alcalá-Gómez et al. (2024) han demostrado que cepas nativas de *B. bassiana* (BbLn2021-1 y BbSF2021-1) pueden causar mortalidades de hasta el 96%-100% en hembras de *R. microplus* adulto y reduciendo significativamente el índice reproductivo, indicando su alto potencial como alternativa biológica efectiva sin dejar residuos químicos en la leche ni impactos ambientales residuales, mientras que Sun et al. (2013) obtuvieron resultados de tiempo letal (TL50 y 90) de 7.14 y 9.33 días utilizando concentración de  $10^9$  conidios/ml, este parámetro (TL) se define como el período para que el agente de control provoque la mortalidad del 50 y 90% de una población por efecto de virulencia y velocidad de acción del patógeno.

Por su parte, Barbieri y colaboradores (2023) evaluaron formulaciones oleosas de *M. anisopliae* en campo aplicadas con "spray race" en bovinos y reportaron reducciones de 55% a 66%

entre los días 21 y 28 post-tratamiento, confirmando su viabilidad operativa frente a poblaciones resistentes a acaricidas. Mientras que Abbasi (2025) obtuvo el total de la mortalidad de garrapatas in vitro a los 14 días con valores de tiempo letal 50 (TL50) de  $5.8 \pm 0.4$  días para *M. anisopliae* y  $6.9 \pm 0.5$  días para *B. bassiana*, destacando una virulencia ligeramente mayor para *M. anisopliae*.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la eficacia de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, aplicados en diferentes concentraciones, así como una combinación de ambos hongos, para el control de *Rhipicephalus microplus* en la unidad de ganado lechero de Zamorano durante la época seca, mediante la determinación de su efecto sobre la mortalidad, infección y los tiempos letales 50 y 95 en garrapatas adultas.

## Materiales y Métodos

Se realizaron 2 ensayos, el primero realizado en campo (parte I) con una fase en laboratorio (parte II) y el segundo ensayo exclusivamente en laboratorio.

**Ensayo I, parte I. Determinación de la efectividad en campo de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y una combinación de ambos hongos entomopatógenos frente al control químico con Amitraz sobre *R. microplus*.**

El ensayo se realizó en la unidad de ganado lechero de la Universidad Zamorano, en el km 30 de la carretera que conduce a Danlí, en las coordenadas 14° latitud norte y 87° longitud oeste, con una precipitación de 1100mm por año, una temperatura promedio de 25° C y una altitud de 800 m.s.n.m. durante el 18 de marzo al 15 de abril de 2025.

Se seleccionaron 24 vacas secas de la unidad de ganado de leche con el mayor grado de infestación de garrapatas, fueron separadas en 6 grupo de 4 vacas para conformar cada uno de los tratamientos, incluido el control, estas vacas fueron identificadas por collares de colores específicos para cada tratamiento.

Muestreo: Para cada animal se muestreó: Parte ventral de barril, ubre, corvejón, inserción entre cola e isquiones y cuello. Se cuantificó la cantidad de garrapatas en las áreas mencionadas utilizando un cuadrado de 20 por 20 cm y se contabilizó el total de garrapatas por cada área muestreada.

La aplicación de los tratamientos se realizó una vez por semana durante cuatro semanas, mientras que el control químico se aplicó a intervalos de 15 días. Las aplicaciones se efectuaron al finalizar el ordeño matutino, después de las 8:00 a.m., aprovechando las instalaciones de la sala de ordeño para separar las vacas secas correspondientes a cada tratamiento. La aplicación se llevó a cabo con bombas de mochila de 16 L, utilizando 4 L por animal y adicionando 1mL/L de adherente natural (INEX-A®). Posterior a la aplicación, se recolectaron garrapatas de las vacas secas de cada tratamiento, las cuales fueron almacenadas por separado en bolsas Ziploc rotuladas y trasladadas al laboratorio

para evaluar el porcentaje de infección. Finalmente, las vacas secas fueron devueltas al campo para continuar en pastoreo.

Los tratamientos evaluados fueron:

T1: METAZAM® con frecuencia de aplicación de 1 vez por semana, a una concentración de  $7.2 \times 10^9$  esporas/ml.

T2: METAZAM® con frecuencia de aplicación de 1 vez por semana, a una concentración de  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml

T3: BAZAM® con frecuencia de aplicación de 1 vez por semana, a una concentración de  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml

T4: BAZAM® con frecuencia de aplicación de 1 vez por semana, a una concentración de  $9.84 \times 10^8$  esporas/ml (Fernandéz Tondelli, 2006)

T5: Mezcla de BAZAM® y METAZAM® con frecuencia de aplicación de 1 vez por semana, a una concentración  $9.84 \times 10^8$  y  $7.2 \times 10^9$  esporas respectivamente.

T6: Químico (Amitraz con frecuencia de aplicación de cada 15 días a una concentración de 1mL de producto por litro de agua).

#### **Variable medida:**

- **Porcentaje de mortalidad**

Se obtuvo el porcentaje de mortalidad de cada uno de los tratamientos mediante la ecuación descrita en la metodología de Nunes y colaboradores (2019), que se muestra a continuación.

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{N^{\circ} \text{ de garrapatas final}}{N^{\circ} \text{ de garrapatas inicial}} \times 100$$

#### **Diseño Estadístico:**

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), usando un modelo lineal general (GLM) y una separación de medias DUNCAN, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para la variable

medida: porcentaje de mortalidad. El nivel de significancia utilizado fue <0.05. Para el análisis se implementó el software Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®).

**Ensayo I, parte II. Determinación de la infección biológica *in vitro* de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre adultos de *R. microplus* recolectados después de aplicación en campo.**

El ensayo se llevó a cabo durante la fase de campo (18 de marzo al 15 de abril de 2025) en el laboratorio de control biológico de la Universidad Zamorano. Se recolectaron manualmente, con ayuda de pinzas, cinco garrapatas adultas de entre 5 a 10mm de longitud (Jones, 2015) por cada vaca seca tratada con un agente biológico, acumulando un total de 20 garrapatas por tratamiento. Durante la recolección, se extrajeron cuidadosamente para evitar dañar el hipostoma y se depositaron en bolsas Ziploc rotuladas según el tratamiento correspondiente. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio, donde se siguió el protocolo modificado de Cardona y Vergara (2006) para evaluar la efectividad de los distintos tratamientos de control biológico, la colecta de garrapatas se realizó en 3 de las 4 semanas aplicadas.

Las garrapatas se agruparon de acuerdo con su tratamiento y se distribuyeron en grupos de 10 garrapatas por caja Petri (8.5 cm de diámetro) cada una con un disco de papel toalla humedecido para mantener la humedad relativa, las placas Petri se incubaron en condiciones ambiente por un periodo de 7 días, con el fin de evaluar el desarrollo de los agentes patógenos después de cada aplicación en campo.

**Variable medida:**

- **Porcentaje de infección de los tratamientos sobre las garrapatas adultas.**

Se cuantificaron las garrapatas con estructuras fúngicas en cada placa Petri para evaluar el porcentaje de infección de *M. anisopliae* y *B. bassiana* mediante la ecuación descrita por Bittencourt et al. (2003).

$$\% \text{ Infección} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Dónde:

A= Total de garrapatas con presencia de conidios

B= Total de garrapatas sin presencia de conidios

**Diseño Estadístico:**

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una separación de medias DUNCAN para la variable: porcentaje de infección, el nivel de significancia utilizado fue  $P < 0.05$ , para este análisis se implementó el software Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®).

**Ensayo II. Determinación de la efectividad biológica in vitro de varias concentraciones de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y una mezcla de ambos hongos entomopatógenos sobre *R. microplus* adultas frente al tratamiento químico.**

El ensayo se realizó en junio de 2025 en el laboratorio de control biológico de la Universidad Zamorano. Se recolectaron 144 garrapatas adultas de entre 5 y 10 mm de longitud (Jones, 2015), obtenidas directamente de animales libres de tratamientos acaricidas pertenecientes a la unidad de ganado lechero de Zamorano. La recolección se efectuó manualmente con ayuda de pinzas, levantando cuidadosamente los ejemplares para no dañar el hipostoma, siguiendo una metodología ligeramente modificada de Nunes et al. (2019). Posteriormente, las garrapatas se depositaron en frascos de vidrio de boca ancha, cubiertos con gasa humedecida, para su transporte al laboratorio.

En el laboratorio, los ejemplares fueron identificados con un estereoscopio, siguiendo la guía taxonómica de Nava et al. (2019) para garrapatas que parasitan bovinos. Una vez confirmada la identificación, se aplicó el protocolo modificado de Cardona y Vergara (2006) para evaluar la efectividad de los distintos tratamientos biológicos.

Los adultos se agruparon de acuerdo con su peso y se distribuyeron en grupos de seis garrapatas que sumaron un peso de 0.44g por caja Petri de 8.5 cm de diámetro, cada una con un disco de papel toalla humedecido para mantener la humedad relativa. Antes de la aplicación de los tratamientos, las garrapatas fueron desinfectadas por inmersión en una solución de hipoclorito de

sodio al 2% durante un minuto, seguida de dos enjuagues de un minuto cada uno en agua estéril. Posteriormente, se colocaron sobre papel absorbente para retirar el exceso de humedad, se pesaron individualmente y se asignaron a cada tratamiento procurando homogeneidad en el peso entre los grupos (0.44g).

Se seleccionaron 144 garrapatas distribuidas en 8 tratamientos, con 3 repeticiones por tratamiento y 6 unidades observacionales (garrapatas) por unidad experimental. Los tratamientos evaluados fueron.

- T1: METAZAM® a una concentración de  $7.2 \times 10^9$  esporas/ml (Espinoza Silva, 2005)
- T2: METAZAM® a una concentración de  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml
- T3: BAZAM® a una concentración de  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml
- T4: BAZAM® a una concentración de  $9.84 \times 10^8$  esporas/ml (Fernández Tondelli, 2006)
- T5: Mezcla de BAZAM® y METAZAM® a concentraciones de  $9.84 \times 10^8$  y  $7.2 \times 10^9$  esporas/ml respectivamente.
- T6: Aplicación de Amitraz 12.5% 1ml/L
- T7: Adherente
- T8: Agua estéril (control absoluto)

Cada tratamiento fue aplicado mediante inmersión de las garrapatas en la solución correspondiente durante 3 minutos. Luego las garrapatas se colocaron en sus respectivas placas Petri con papel toalla humedecida, que fue rehidratado cada 24 horas para mantener condiciones constantes de humedad relativa.

**Variable medida:**

- **Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95)**

Se realizaron observaciones cada 24 horas, registrando la cantidad de garrapatas muertas diariamente hasta alcanzar la mortalidad del total de garrapatas de cada tratamiento, así como el número de masas de huevos ovipositados para su análisis posterior.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento Probit utilizando el software Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®) el cual permitió estimar el porcentaje de mortalidad en función del tiempo.

## Resultados

**Ensayo I. Determinación de la efectividad en campo de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y una combinación de ambos hongos entomopatógenos frente al control químico con Amitraz sobre *R. microplus*.**

### Porcentaje de mortalidad

El análisis del porcentaje de mortalidad de garrapatas (cuadro 1) respecto a la población inicial evidenció diferencias significativas entre tratamientos durante las cuatro semanas de evaluación ( $p < 0.0001$ ) posteriores al muestreo y aplicación de tratamientos en el día 1. Los valores de  $R^2$  obtenidos de la semana 1 a la 4 (entre 0.84–0.92) indican que los modelos explican gran parte del comportamiento de los resultados, y los coeficientes de variación (CV, entre 31–49 %) sobrepasan el valor estándar aceptado, sin embargo, al tratarse de un ensayo en campo, se pueden considerar como valores aceptables.

A los 7 días después de la primera aplicación, el tratamiento químico presentó el mayor porcentaje de mortalidad, significativamente superior al resto de los tratamientos, se observó una acción inmediata sobre el control de *R. microplus*. Este resultado coincide con Schrak y Vainstein (2010) quienes mencionan la rapidez de los acaricidas químicos. En contraste, los tratamientos con hongos entomopatógenos mostraron una respuesta progresiva. En la primera semana, el tratamiento *M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml (concentración mayor) presentó el porcentaje de control más alto significativamente (28.6%) de los tratamientos biológicos, el tratamiento *B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml (concentración mayor) presentó un porcentaje de control de 14.8% el cual fue estadísticamente igual a los tratamientos *M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/ml (concentración menor) y la mezcla entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. El tratamiento *B. bassiana*  $9.84 \times 10^8$  esporas/ml

(concentración menor) presentó el porcentaje de mortalidad más bajo estadísticamente, en comparación al resto de tratamientos.

Quince días después de la primera aplicación, la eficacia de los hongos aumentó, registrando 29.77 % (*M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml), 28.33 % (*M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/ml) y 29.09 % (*B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml) presentando el mismo porcentaje de control estadísticamente, siendo superiores a los tratamientos *B. bassiana*  $9.84 \times 10^8$  esporas/ml y la mezcla entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Veintiún días después de la primera aplicación, la tendencia se mantuvo: estadísticamente el químico lideró con 73.66 % de mortalidad, mientras que *B. bassiana* aumentó a 33.37 %, superando a *M. anisopliae* 21.69 %. Estos valores sugieren que *B. bassiana* puede desarrollar mejor desempeño en un tiempo más prolongado como se muestra en el estudio de Abbasi (2025b).

A los 28 días después de la primera aplicación, los tratamientos con las concentraciones más alta *B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml 50.13 % y *M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml 47.55 % presentaron los mayores porcentajes de mortalidad, con relación a los tratamientos de menor concentración y la mezcla de ambos hongos entomopatógenos. Estos resultados concuerdan a los obtenidos por Barbieri y colaboradores (2023) documentado en ensayos de campo reducciones de 55% a 66% entre los días 21 y 28 postratamiento.

**Cuadro1**

Porcentaje de mortalidad de *Rhipicephalus microplus*, en vacas secas tratadas durante cuatro semanas con *M. anisopliae*, *B. bassiana*, su mezcla y el control químico (Amitraz 12.5%) en la Universidad Zamorano.

Tratamientos	%Mortalidad			
	Días después de la 1ra. Aplicación			
	1	2	3	4
Químico	60.5 <sup>aψ</sup>	70.2 <sup>a</sup>	73.7 <sup>a</sup>	79.8 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i> (2.2 × 10 <sup>10</sup> esporas/ml)	14.8 <sup>c</sup>	29.1 <sup>b</sup>	33.4 <sup>b</sup>	50.1 <sup>b</sup>
<i>B. bassiana</i> (9.84 × 10 <sup>8</sup> esporas/ml)	2.1 <sup>d</sup>	1.5 <sup>c</sup>	10.4 <sup>c</sup>	21.1 <sup>c</sup>
<i>M. anisopliae</i> (1.6 × 10 <sup>10</sup> esporas/ml)	28.6 <sup>b</sup>	29.8 <sup>b</sup>	21.7 <sup>bc</sup>	47.6 <sup>b</sup>
<i>M. anisopliae</i> (7.2 × 10 <sup>9</sup> esporas/ml)	11.2 <sup>cd</sup>	28.4 <sup>b</sup>	12.2 <sup>c</sup>	17.4 <sup>c</sup>
<i>B. bassiana</i> / <i>M. anisopliae</i>	5.8 <sup>cd</sup>	4.5 <sup>c</sup>	8.0 <sup>c</sup>	5.4 <sup>c</sup>
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CV (%)	35.55	31.19	48.69	32.5
R <sup>2</sup>	0.92	0.92	0.84	0.88

ψ: valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan (P≤0.05).

### Porcentaje de infección después de las aplicaciones de los tratamientos sobre las garrapatas adultas.

Los resultados de la prueba para determinar el porcentaje de infección en adultos de *R. microplus* después de la aplicación de los tratamientos en campo se puede observar en el cuadro 2 donde los tratamientos *M. anisopliae* 1.6 × 10<sup>10</sup> y *B. bassiana* 2.2 × 10<sup>10</sup> presentaron los porcentajes de infección más altos y estadísticamente iguales, indicando claramente que las infecciones se manifiestan con un alto porcentaje cuando se utiliza la concentración más alta para ambos organismos, mientras que al utilizar concentraciones bajas se observa porcentajes de infección menores como se observa en los tratamientos *M. anisopliae* 7.2 × 10<sup>9</sup> y *B. bassiana* 9.84 × 10<sup>8</sup>.

**Cuadro 2**

*Porcentaje de infección en adultos de R. microplus colectados de vacas secas bajo tratamientos de control biológico, Universidad Zamorano, Honduras*

Tratamientos	Infección (%)
<i>B. bassiana</i> ( $2.2 \times 10^{10}$ esporas/ml)	95.00 <sup>aψ</sup>
<i>B. bassiana</i> ( $9.84 \times 10^8$ esporas/ml)	67.50 <sup>c</sup>
<i>M. anisopliae</i> ( $1.6 \times 10^{10}$ esporas/ml)	97.50 <sup>a</sup>
<i>M. anisopliae</i> ( $7.2 \times 10^9$ esporas/ml)	82.50 <sup>b</sup>
<i>Beauveria bassiana</i> / <i>Metarhizium anisopliae</i>	80.00 <sup>b</sup>
Control	0.00 <sup>d</sup>
Probabilidad	0.0041
R2	0.96
CV (%)	4.58

ψ: valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

**Ensayo II. Determinación de la efectividad biológica in vitro de dos concentraciones de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y una mezcla de ambos hongos entomopatógenos sobre *R. microplus* adultas frente al tratamiento químico.**

#### **Estimación de Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95)**

El análisis de los datos obtenidos con el procedimiento Probit con límites de confianza del 95% (LF95) (Cuadro 3) muestra que el tratamiento químico (Amitraz 12.5%) presentó un tiempo letal TL<sub>50</sub> de 62.93 horas (rango 48.05 a 75.13 horas) y el tratamiento *M. anisopliae* ( $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml) con tiempo letal TL<sub>50</sub> de 68.96 horas (rango 58.17 a 78.85 horas), ambos mostraron los menores tiempos letales 50, estadísticamente iguales, evidenciando la rapidez para infectar adultos de *R. microplus* cuando se aplica en concentraciones altas y condiciones apropiadas puede ser una alternativa prometedora para el control de garrapatas como sugiere Murigo, et al. (2016). Los tratamientos *M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/ml y la mezcla de *B. bassiana* con *M. anisopliae* presentaron tiempos letales 50 de 105.53 y 109.22 horas respectivamente fueron estadísticamente iguales, mientras que *B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml con TL<sub>50</sub> de 148.05 horas y *B. bassiana*  $9.84 \times$

$10^8$  esporas/ml con  $TL_{50}$  de 183.16 horas fueron estadísticamente diferentes entre sí y el resto de los tratamientos, evidenciando que su acción es más lenta que la de *M. anisopliae*. Esto coincide con estudios donde *B. bassiana* es reportado como menos agresivo frente a garrapatas adultas debido a diferencias en la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios (Mascarín et al., 2019).

Los resultados obtenidos del tiempo letal 95 ( $TL_{95}$ ) indican que los tratamientos *M. anisopliae* ( $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml), *M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/ml, la mezcla de *B. bassiana* con *M. anisopliae* presentaron los  $TL_{95}$  más bajos y estos fueron estadísticamente iguales al tratamiento químico, el tiempo letal 95 ( $TL_{95}$ ) de los tratamientos con *B. bassiana* fueron estadísticamente más altos que los demás tratamientos, estos resultados se asemejan a los obtenidos por Abbasi (2025c).

### Cuadro 3

*Estimación de Tiempo Letal 50 ( $TL_{50}$ ) y 95 ( $TL_{95}$ ) de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, tratamiento combinado de *M. anisopliae*/*B. bassiana* y control químico (Amitraz 12.5%) sobre garrapatas adultas obtenido por medio del análisis Probit*

Tratamiento	$TL_{50}$ h (LF95%)		$TL_{95}$ h (LF95%)	
Químico	<b>62.94<sup>aψ</sup></b>		<b>136.82<sup>a</sup></b>	
	48.05	75.13	118.39	169.15
<i>M. anisopliae</i> ( $1.6 \times 10^{10}$ esporas/ml)	<b>68.96<sup>a</sup></b>		<b>121.57<sup>a</sup></b>	
	58.17	78.85	106.99	147.22
<i>M. anisopliae</i> ( $7.2 \times 10^9$ esporas/ml)	<b>105.53<sup>b</sup></b>		<b>133.92<sup>a</sup></b>	
	97.97	112.98	124.11	153.20
<i>B. bassiana</i> / <i>M. anisopliae</i>	<b>109.22<sup>b</sup></b>		<b>141.35<sup>a</sup></b>	
	101.34	117.15	130.63	161.71
<i>B. bassiana</i> ( $2.2 \times 10^{10}$ esporas/ml)	<b>148.05<sup>c</sup></b>		<b>216.38<sup>b</sup></b>	
	136.73	159.06	200.21	240.77
<i>B. bassiana</i> ( $9.84 \times 10^8$ esporas/ml)	<b>183.16<sup>d</sup></b>		<b>275.20<sup>c</sup></b>	
	170.14	196.01	255.35	303.98

ψ: valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según el análisis de límites. Probit. LF: límite fiducial de confianza.

## Conclusiones

Los tratamientos con hongos entomopatógenos mostraron un efecto progresivo sobre la mortalidad de *R. microplus*, con un incremento en la eficiencia a lo largo de las semanas posteriores a la aplicación. Las concentraciones altas de *M. anisopliae* ( $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml) y *B. bassiana* ( $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml) alcanzaron los mayores porcentajes de control, registrando 47.55% y 50.13%, respectivamente, a los 28 días postaplicación. Aunque el tratamiento químico presentó la mortalidad acumulada más alta, los hongos entomopatógenos demostraron un potencial de uso a largo plazo para el control de este ectoparásito, con ventajas de sostenibilidad ambiental tomando en cuenta que el uso continuo de una molécula química no debe exceder los 9 meses consecutivos, así como los efectos residuales en carne y leche.

El análisis Probit mostró que *M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  (TL:68.96h) y el tratamiento químico Amitraz 12.5% (TL50: 62.93h) fueron los más rápidos y estadísticamente equivalentes, mientras que *B. bassiana* en sus concentraciones  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml y  $9.84 \times 10^8$  esporas/ml mostraron un tiempo letal más lento (TL50:148.05h y TL50:183.16h) respectivamente. Para el tiempo letal 95, los tratamientos de *M. anisopliae* y la mezcla de ambos hongos entomopatógenos igualaron al químico. Los tratamientos de *B. bassiana* presentaron TL<sub>95</sub> mayores, no obstante, alcanzaron una alta efectividad a largo plazo durante el ensayo en campo a los 28 días.

Las concentraciones altas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* lograron la mayor infectividad en adultos de *R. microplus*, superaron las concentraciones bajas y la mezcla de ambos hongos. Aunque *B. bassiana* actúa más lentamente, su eficiencia a largo plazo iguala a *M. anisopliae* como se observa en la mortalidad acumulada a los 28 días post tratamiento. Esto respalda su aplicabilidad como alternativa ecológica para el control sostenible de *R. microplus*, frente a las limitaciones de los acaricidas químicos, asociadas al desarrollo de resistencia, la residualidad y el impacto ambiental.

### Recomendaciones

Evaluar la eficacia del uso de *Metarhizium anisopliae* aplicado directamente en potreros (bebederos, cercas y zonas de descanso) para reducir la carga de larvas infectantes de *R. microplus*.

Investigar programas de rotación y asociación entre control biológico y químico como estrategias para retrasar la aparición de resistencia en poblaciones garrapatas.

Analizar la influencia de factores ambientales (humedad, radiación solar y temperatura) sobre la persistencia y virulencia de *M. anisopliae* en condiciones de campo.

Evaluar la efectividad de las concentraciones más altas de ambos hongos entomopatógenos combinados durante un periodo de al menos ocho semanas o más, hasta alcanzar un control sostenido de *R. microplus*.

## Referencias

- Espinoza Silva, L. (2005) Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en control biológico de *Boophilus microplus*. Tesis Ing. Agr. Honduras. Zamorano. 16 p
- Fernández Tondelli, J. (2006). Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (*Boophilus microplus*). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 22 p.
- Muñoz Medina, A. (2007) Eficiencia de BAZAM (*Beauveria bassiana*) y Metazam (*Metarhizium anisopliae*) en el control de garrapatas (*Boophilus microplus*) en ganado lechero de Zamorano, Honduras. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 22 p.
- Sepúlveda, A. L., Pulido-Medellín, M. O., Rodríguez-Pacheco, J. E., & García-Corredor, D. J. (2017). Eficiencia in vitro de hongos entomopatógenos y productos químicos sobre *Rhipicephalus microplus*. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 11(2), 67-80.
- García Carrazco, J. A. (2023). *Beauveria bassiana* para control biológico de (*Rhipicephalus microplus*) en ganado bovino (Doctoral dissertation).
- Merchán Delgado, X. (2015). Control biológico con hongos entomopatógenos: una estrategia de aula para promover el cuidado del medio ambiente.
- NUNES, P. R., MAESTRE, R. B., SILVA-ACUÑA, R. A. M. Ó. N., & ROMERO-MARCANO, G. U. I. L. L. E. R. M. O. (2019). Evaluación in vitro de hongos entomopatógenos en el control de la garrapata del ganado bovino. *Saber*, 31, 283-293.
- Abbasi, E. (2025). Potential of Entomopathogenic Fungi for the Biocontrol of Tick Populations. *Foodborne Pathogens And Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2025.0057>
- Alcalá-Gómez, J., Alcalá-Gómez, G., Barriga, K. G. B., De Jesus Vite-Méndez, G., & Reyes-Hernández, M. (2024). *Beauveria bassiana* native strains affect the reproductive index of *Rhipicephalus microplus* ticks. *Experimental And Applied Acarology*, 93(2), 485-496. <https://doi.org/10.1007/s10493-024-00942-3>
- Álvarez, V., Matamoros-Carvajal, T., & Mena-Marín, A. L. (2017). Determinación, in vitro, de la eficacia de los hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de la garrapata común del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Ciencias Veterinarias*, 35(1), 43. <https://doi.org/10.15359/rcv.35-1.3>

- Barbieri, A., Rico, I., Silveira, C., Feltrin, C., Dall'Agnol, B., Schrank, A., Lozina, L., Klafke, G., & Reck, J. (2023). Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. *Ticks And Tick-borne Diseases*, *14*(3), 102147. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102147>
- Beys-Da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J., Vainstein, M. H., Schrank, A., Bittencourt, V. R. P., & Santi, L. (2019a). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, *208*, 107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>
- Beys-Da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J., Vainstein, M. H., Schrank, A., Bittencourt, V. R. P., & Santi, L. (2019b). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, *208*, 107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>
- Davidson, G., Phelps, K., Sunderland, K., Pell, J., Ball, B., Shaw, K., & Chandler, D. (2003). Study of temperature-growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using a nonlinear model of poikilotherm development. *Journal Of Applied Microbiology*, *94*(5), 816-825. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01871.x>
- Jiao, J., Zhang, J., He, P., OuYang, X., Yu, Y., Wen, B., Sun, Y., Yuan, Q., & Xiong, X. (2021). Identification of Tick-Borne Pathogens and Genotyping of *Coxiella burnetii* in *Rhipicephalus microplus* in Yunnan Province, China. *Frontiers In Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736484>
- Jones, R. W. (2015). Extracción manual de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en ganado bovino como estrategia de control. *Nutrición Animal Tropical*, *9*(1), 88. <https://doi.org/10.15517/nat.v9i1.19393>
- Jonsson, N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, *137*(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>
- Jonsson, N., Mayer, D., Matschoss, A., Green, P., & Ansell, J. (1998). Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Veterinary Parasitology*, *78*(1), 65-77. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00118-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00118-6)
- Juache-Villagrana, A. E., Ponce-Garcia, G., De J Gonzalez-Escandon, M., Vazquez-Dominguez, I. F., Castro-Bautista, A. G., Lopez-Monroy, B., Rodriguez-Sanchez, I. P., Ojeda, M. G. A., & Flores, A. E. (2023). Status of Acaricide Resistance and Detecting the Knockdown Resistance Mutation

- T2134A in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) from Northeastern Mexico. *Journal Of The American Mosquito Control Association*, 39(2), 122-128. <https://doi.org/10.2987/23-7113>
- Muniz, E. R., Ribeiro-Silva, C. S., Arruda, W., Keyhani, N. O., & Fernandes, É. K. K. (2021). The Msn2 Transcription Factor Regulates Acaricidal Virulence in the Fungal Pathogen *Beauveria bassiana*. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.690731>
- Obaid, M. K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A. Z., Da Silva Vaz, I., Tanaka, T., & Ali, A. (2022). Acaricides Resistance in Ticks: Selection, Diagnosis, Mechanisms, and Mitigation. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.941831>
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. (2016). Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. *Advances In Genetics*, 165-249. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>
- Pérez-Otáñez, X., Vanwambeke, S. O., Orozco-Alvarez, G., Arciniegas-Ortega, S., Ron-Garrido, L., & Rodríguez-Hidalgo, R. (2023). Widespread acaricide resistance and multi-resistance in *Rhipicephalus microplus* in Ecuador and associated environmental and management risk factors. *Ticks And Tick-borne Diseases*, 15(1), 102274. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102274>
- Rajput, M., Sajid, M. S., Rajput, N. A., George, D. R., Usman, M., Zeeshan, M., Iqbal, O., Bhutto, B., Atiq, M., Rizwan, H. M., Daniel, I. K., & Sparagano, O. A. (2024). Entomopathogenic Fungi as Alternatives to Chemical Acaricides: Challenges, Opportunities and Prospects for Sustainable Tick Control. *Insects*, 15(12), 1017. <https://doi.org/10.3390/insects15121017>
- Rodrigues, D., & Leite, R. (2013). Economic impact of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 65(5), 1570-1572. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352013000500039>
- Rodríguez-Hidalgo, R., Pérez-Otáñez, X., Garcés-Carrera, S., Vanwambeke, S. O., Madder, M., & Benítez-Ortiz, W. (2017). The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. *PLoS ONE*, 12(4), e0174652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174652>
- Rosario-Cruz, R., & Domínguez-García, D. I. (2016). Biological and Biochemical Bases of Pesticides Resistance in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/61839>
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). Metarhizium anisopliae enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>

- St Leger, R. J. (2008). Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 98(3), 271-276. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.007>
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Li, Y., Han, X., Ma, C., Yin, H., & Luo, J. (2013). Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology International*, 62(5), 412-415. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.04.008>
- Ubuka, T. (2021). Octopamine. En *Elsevier eBooks* (pp. 1045-1047). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820649-2.00291-6>
- Vega, C. A., Guevara, S. B., Matarrita-Rodríguez, J., Masís-Mora, M., Pérez-Rojas, G., & WingChing-Jones, R. (2022). Residuos de acaricidas en leche entera bovina de Costa Rica. *UNED Research Journal*, 14(1), 3787. <https://doi.org/10.22458/urj.v14i1.3787>
- Wang, C., Skrobek, A., & Butt, T. M. (2004). Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 85(3), 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.008>

## Anexos

### *Anexo 1 Garrapatas Colonizadas Con Beauveria y Metarhizium.*



### *Anexo 2 Aplicación de tratamientos.*



*Anexo 4 Garrapatas en inserción de cola e isquiones.*

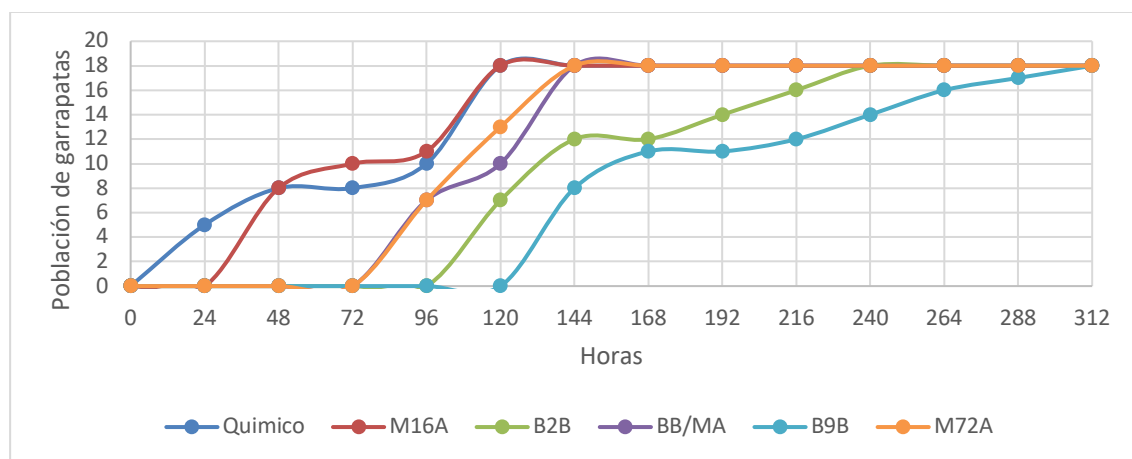


*Anexo 3 Muestreo de garrapatas.*



**Figura 1** Representación de Tiempo Letal 50 y 99, obtenida en la prueba de estimación para *M.*

*anisopliae*, *B. bassiana*, mezcla entre *M. anisopliae*,/*B. bassiana* y Amitraz 12.5% sobre *R. microplus*.



Nota: M16A representa el tratamiento *M. anisopliae* dosis alta ( $1.6 \times 10^{10}$  esporas/ml), M72A es *M. anisopliae* dosis baja ( $7.2 \times 10^9$  esporas/ml), BB/MA es la mezcla (*B. bassiana* mas *M. anisopliae*), B2B es *B. bassiana* dosis alta ( $2.2 \times 10^{10}$  esporas/ml) y B9B es *B. bassiana* dosis baja ( $9.84 \times 10^8$  esporas/ml).