

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

**EFEITO DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Steinernema glaseri*  
(STEINER, 1929) (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE) ISOLADO SANTA ROSA  
SOBRE OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE NINFAS INGURGITADAS DE  
*Amblyomma cajennense* (FABRÍCIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

**Ricardo Nunes Cardoso**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais.

Fevereiro de 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

**EFEITO DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Steinernema glaseri*  
(STEINER, 1929) (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE) ISOLADO SANTA ROSA  
SOBRE OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE NINFAS INGURGITADAS DE  
*Amblyomma cajennense* (FABRÍCIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

**Ricardo Nunes Cardoso**

Orientador: John Furlong

Co-orientadora: Márcia Cristina de Azevedo Prata

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2007

**EFEITO DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGENICO *Steinernema glaseri*  
(STEINER, 1929) (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE) ISOLADO SANTA ROSA  
SOBRE OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE NINFAS INGURGITADAS DE  
*Amblyomma cajennense* (FABRÍCIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

**Ricardo Nunes Cardoso**

Orientador: Dr. John Furlong

Co-orientadora: Márcia Cristina de Azevedo Prata

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Aprovada em 28 de fevereiro de 2007.

---

Dr. John Furlong  
EMBRAPA Gado de Leite

---

Dr. Alexander Machado Auad  
EMBRAPA Gado de Leite

---

Prof. Dr. Fábio Prezoto  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Cardoso, Ricardo Nunes

Efeito do nematóide entomopatogênico *Steinernema glaseri* (STEINER, 1929) (Rhabditida: Steinernematidae) isolado santa rosa sobre os parâmetros biológicos de ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (FABRÍCIUS, 1787) (Acari: Ixodidae) / Ricardo Nunes Cardoso; orientador: Dr. John Furlong. - - 2007.  
36 f. il.

Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ecologia animal. 2. Carrapatos – Crescimento e desenvolvimento.  
3. Muda. I. Furlong, John. II. Título.

CDU 591.5

Dedico este trabalho ao meu filho Arthur, a minha amada Mariana, e aos amigos que me acompanharam durante esta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador John Furlong pelos bons momentos de convivência e ensinamentos, além dos constantes auxílios na elaboração deste trabalho.

A Doutora Márcia Cristina de Azevedo Prata, minha co-orientadora pela constante ajuda, fundamental na realização deste trabalho.

Ao Doutor Alexander Machado Auad por ter aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Aline, Caio, Eder, Edilena, Elder, Leonardo e Matheus, que também foram pessoas importantes com as quais contei para a realização deste trabalho, assim como aos amigos da pós-graduação com os quais passei importantes momentos de aprendizagem durante estes dois últimos anos.

Aos Doutores Cláudia Dolinski e Luis Garrigós Leite por cederem os nematóides utilizados neste trabalho.

Aos demais amigos e familiares que estiveram sempre ao meu lado acreditando nas minhas escolhas e me incentivando a cada dia.

Aos meus avós Antônio, Gilberto, Maria Cecília e Maria Bertha, pela maravilhosa formação que tive, sempre me mostrando os caminhos corretos.

Ao meu pai Gilberto, minha mãe Sandra, assim como aos meus irmãos que sempre estiveram próximos, me dando amor, lições de vida, exemplos, caráter e objetivos que hoje consigo alcançar.

Ao meu grande amigo Henrique Fabiano do Nascimento, uma das pessoas que mais me incentivou a dar mais este passo e com quem sempre pude contar, desde o dia em que juntos iniciamos nossa graduação.

Ao meu filho Arthur e a minha esposa Mariana, que me deram forças e motivos para completar esta jornada.

“A diferença fundamental entre o homem comum e o guerreiro, é que o guerreiro encara tudo como desafio, enquanto o homem comum encara tudo como bênção ou maldição.”

Carlos Castañeda.



## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	x
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	xi
<b>RESUMO.....</b>	xii
<b>ABSTRACT.....</b>	xiv
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>2- REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	4
2.1 Controle químico de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	4
2.2 Controle biológico de Carrapatos.....	5
2.3 Nematóides entomopatogênicos.....	5
2.4 Nematóides Entomopatogênicos como agente de controle biológico de carrapatos.....	6
2.5 Controle biológico de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	8
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	10
3.1. Obtenção do material.....	10
3.1.1. Obtenção dos Carrapatos.....	10
3.1.2. Obtenção e produção <i>in vivo</i> de <i>Steinernema glaseri</i> isolado Santa Rosa em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> . ....	12
3.1.3. Obtenção e criação de lagartas de <i>Galleria mellonella</i> .....	12
3.2. Exposição de <i>Amblyomma cajennense</i> aos nematóides entomopatogênicos..	12
3.3. Análise estatística.....	14
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	16
4.1 Período de Pré-ecdise.....	16
4.2 Período de ecdise.....	19
4.3 Período de muda.....	21
4.4 Percentual de ecdise e percentual de mortalidade.....	23
<b>5- CONCLUSÕES.....</b>	27
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	28

## LISTA DE TABELAS

	<b>Páginas</b>
TABELA 1. Períodos de pré-ecdise, em dias, de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de <i>Amblyomma cajennense</i> infectados com diferentes dosagens de <i>Steinernema glaseri</i> mantidos em estufa climatizada com $UR \geq 80\%$ e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	17
TABELA 2. Períodos de ecdise, em dias, de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de <i>Amblyomma cajennense</i> infectados com diferentes dosagens de <i>Steinernema glaseri</i> mantidos em estufa climatizada com $UR \geq 80\%$ e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	20
TABELA 3. Períodos de muda, em dias, de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de <i>Amblyomma cajennense</i> infectados com diferentes dosagens de <i>Steinernema glaseri</i> mantidos em estufa climatizada com $UR \geq 80\%$ e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	22
TABELA 4. Percentual de ecdise de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de <i>Amblyomma cajennense</i> infectados com diferentes dosagens de <i>Steinernema glaseri</i> mantidos em estufa climatizada com $UR \geq 80\%$ e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	24

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
FIGURA 1. Coelho doméstico com saco de pano nas orelhas para alimentação das metaninfas e obtenção das ninfas ingurgitadas.....	11
FIGURA 2. Detalhe dos tratamentos com exposição de <i>Amblyomma cajennense</i> aos nematóides entomopatogênicos nas concentrações de 0,156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 e 10000 NEP/ UE.....	15
FIGURA 3. Detalhe dos tratamentos com as ninfas ingurgitadas de <i>A. cajennense</i> lavadas com água destilada, mantidas em placas de Petri sem areia ou nematóides.....	15

## RESUMO

*Amblyomma cajennense* (Fabrícus, 1787) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito típico de equídeos, amplamente distribuído nas Américas do Sul e Central. O uso indiscriminado dos carrapaticidas tem levado as populações destes artrópodes a um grave quadro de resistência aos produtos fitossanitários. Além disso, o uso exclusivo de carrapaticida é pouco viável a longo prazo e em termos econômicos tornando-se necessário o emprego de métodos alternativos de controle. Os nematóides entomopatogênicos tem sido apontados como agentes promissores no controle de carrapatos, entretanto como é pequeno o número de estudos a esse respeito objetivou-se avaliar o potencial de *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) isolado Santa Rosa como agente de controle biológico do carrapato *Amblyomma cajennense*. O experimento foi realizado no Laboratório de Parasitologia, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, no período de outubro de 2005 e janeiro de 2006. Avaliou-se o potencial de *S. glaseri* nas concentrações de 0, 156, 325, 675, 1250, 2500, 5000 e 10000 juvenis infectantes (JI) por unidade experimental (UE). Cada um desses tratamentos foi composto por 10 unidades experimentais que foram montadas com placas de Petri contendo areia autoclavada, 4ml de água destilada e 10 ninfas, num total de 100 espécimes por tratamento. As placas de Petri foram fechadas com parafilme e mantidas em estufa climatizada do tipo B.O.D ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $\text{U.R}>80\%$ ) por 72 horas. Após este período as ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* foram lavadas com água destilada e transferidas para placas de Petri limpas observadas a cada  $24\pm 1$  hora durante 20 dias, a fim de se observar as alterações nos parâmetros biológicos, tais como: Período de ecdise (PE), Período de pré-ecdise (PPE), Percentual de ecdise (%Ec) e Período de muda (PM). Cada parâmetro foi analisado em relação aos adultos, englobando machos e fêmeas e também para cada um dos sexos isoladamente por unidade experimental. Para

análise dos dados foi utilizado o Software Graphpad InStat Versão 2.05 com Análise de Variância, Teste de Tukey-Kramer, Kruskal-Wallis e Dunn's ( $p \leq 0.05$ ). No tratamento com 5000 JI/UE ocorreu redução significativa no PPE total, assim como PM, em relação ao controle e considerando-se apenas os machos, o PM também sofreu redução significativa. No tratamento com 10000 JI/UE houve um aumento significativo do PPE total e o PE total foi reduzido significativamente neste tratamento, em relação ao controle. O período de ecdise dos machos apresentou um aumento significativo em quatro dos oito tratamentos (tratamentos com 156, 612, 2500 e 5000 JI). A mortalidade, assim como a redução do percentual de ecdise só foi significativa no tratamento com 10000 JI /UE. Mesmo sem abertura genital nas ninfas de *A. cajennense*, *S. glaseri* foi capaz de exercer ação deletéria em concentrações superiores a 5000 JI /UE. As doses de 5000 e 10000 JI /UE foram deletérias a determinados processos da fase não parasitária de *A. cajennense*. Entretanto novos estudos são necessários, ainda *in vitro*, com doses superiores a 10000 JI /EU, a fim de se confirmar o potencial entomopatogênico de *A. cajennense* sobre populações de *S. glaseri*.

Palavras-chaves: carrapatos, adultos, muda, ecdise, controle biológico.

## ABSTRACT

*Amblyomma cajennense* (Fabrícus, 1787) (Acari: Ixodidae) is an ectoparasitic kind of horse, widely distributed in south and central America. The indiscriminate use of acaricidal has taken this animals population to a critical resistance situation to drugs and the exclusive use of acaricidal is just viable in practical and economical terms became necessary the job of alternative control method. The nematodes entomopathogenic has been indicated as successful agents to control ticks, however is short the number of the studies about that, the target is analyse the potential of *Steinernema glaseri* strain Santa Rosa as biological agent control of *A. cajennense*. The experiment was made in the EMBRAPA GADO DE LEITE, Parasitology Laboratory – Juiz de Fora (MG), between October of 2005 and January of 2006. Has been tested different concentrations of *S. glaseri* (0, 156, 325, 650, 1250, 2500, 5000 e 10000 infectives juveniles (IJ) per tested unity (UT). Each one of this treatment was composed per 10 tested unities crated with Petri dish sterilized, 4 ml of destil water and 10 nymphs in a total of 100 types for treatment. The Petri dish was closed with parafilm and kepted in a humid chamber kind of BOD ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $\text{RH} > 80\%$ ) per 72 hours. After that period the engorged nymphs of *A. cajennense* was washed with destil water and removed to a Petri dish without sand or IJ and observed by each  $24\pm 1$  hour during 20 days, with the objective to observe wich alterations in biological parameters such as: ecdysis period (EP), pre-ecdysis period (PEP), ecdysis percentual (%Ec), and moulting period (MP). Each parameter was analysed about adults connections, comprising male and female and for each one of the sex separating by tested unities as will. The statistic data treatment was made with Variance Analyse, Tukey-Kramer Test, Kruskal-Wallis and Dunn's ( $p \leq 0.05$ ) On the treatment with 5000 IJ/UT happens the significant reduction of PEP totally, such as MP, in connections with control and

considering only the males. The MP had suffer the significant reduction too. On the treatment with 10000 IJ/UT had a significant increase of PEP totally and the EP totally was reduced highly expressive in this treatment by connection with control. The male ecdysis period had present a significant increase in four of the seven treatments (treatments with 156, 612, 2500 and 5000 IJ). The mortality such as the percentual reduction of ecdysis just was significant on the treatment with 10000 IJ/UT. Until without genital hole of *A. cajennense* nymphs, *S. glaseri* was able to make the deleterious action in concentration up 5000 IJ/UT. The treatment of 5000 and 10000IJ/UT was deleterious by determined process of no parasitary phase of *A. cajennense*. However new studyies are necessary, *in vitro* yet, with superior doses than 10000 IJ/UT, due to confirm the entomopathogenic potential of *A. cajennense* under de *S. glaseri* population.

Key-words: ticks, adults, mouthing, ecdysis, biological control.

## 1. INTRODUÇÃO

As ixodidoses acometem os animais domésticos, silvestres e o homem em quase todo o mundo e os prejuízos que causam são grandes. Aproximadamente 20 espécies de carrapatos estão associadas à doenças bacterianas, virais ou parasitológicas como anaplasmoses, babesioses, dermatofagoses dentre outras, as quais induzem a morte do animal ou a diminuição na produção pecuária (MAULÉON *et al.*, 1993). Dentre estes se destaca o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabrícus, 1787), conhecido popularmente como carrapato estrela ou rodoleiro, típico de eqüídeos, podendo parasitar outros mamíferos como bovinos, capivaras, cães e até o homem (FLECHTMANN, 1985). Este ectoparasito é um carrapato heteroxeno pertencente ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, família Ixodidae e subfamília Amblyomminae (LINTHICUM , 1991).

Além dos danos diretos determinados pelo parasitismo, a espécie é responsável pela transmissão de patógenos causadores da erliquiose (MASSARD, 1984) e da febre maculosa (MONTEIRO *et al.*, 1931) dentre outras doenças, o que torna fundamental o conhecimento aprofundado de estratégias racionais e eficazes para o seu controle.

O Brasil, em decorrência de suas condições climáticas, é uma região potencialmente favorável ao desenvolvimento de alta infestação por ixodídeos, onde áreas de pastagens apresentam elevada incidência dos estádios não parasitários de *A. cajennense*, durante todo o ano (SERRA-FREIRE, 1982). A espécie é encontrada amplamente distribuída na América Central, América do Sul ao longo da Costa Atlântica e Golfo do México, atingindo o Sul dos Estados Unidos (BITTENCOURT, 1997).

Por mais de um século o controle químico pelo uso de acaricidas é a principal forma de controle dos carrapatos. Entretanto, o uso indiscriminado dos carrapaticidas tem levado as



populações destes ectoparasitos a um grave quadro de resistência, de ordem genética, em relação aos produtos fitossanitários (FURLONG, 1993). Essa resistência tem se desenvolvido cada vez mais rápido, causando uma redução preocupante à vida útil dos produtos para quatro a cinco anos em média (HONER & GOMES, 1990).

Sendo assim, o uso exclusivo de carrapaticida é pouco viável a médio e longo prazo em termos econômicos e ambientais (CAPALBO & DE NARDO, 2000), tornando-se necessário o emprego de métodos alternativos em sistemas de manejo integrado (BARROS & EVANS, 1989).

Dentre os métodos alternativos de controle de carrapatos empregados pode-se encontrar o controle biológico com nematóides entomopatogênicos (NEP), que são agentes promissores devido a sua alta eficiência no controle de diferentes espécies de insetos pragas, principalmente daqueles que passam pelo menos uma fase do seu ciclo de vida no solo (DOULCET *et al.*, 1999). ADAMS & NGUYEN (2002) citam que os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* contêm as mais importantes espécies de nematóides entomopatogênicos e embora já existam relatos na literatura sobre esses organismos como potenciais controladores biológicos de algumas espécies de carrapatos, a maioria deles não enfoca a espécie aqui estudada e também os testes até então realizados, em sua grande maioria foram feitos com fêmeas ingurgitadas, tais como, *A. cajennense* (Fabricius, 1787), *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), *Ixodes scapularis* (Say, 1821), *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901), *Boophilus annulatus* (Say, 1821), *A. maculatum* (Koch, 1844), *A. americanum* (Linne, 1758), *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).

Mesmo já havendo vários trabalhos nesta linha de pesquisa, os estudos sobre o controle biológico de *A. cajennense* utilizando NEP ainda são escassos e aqueles realizados foram feitos com fêmeas ingurgitadas e não analisam a influência dos NEP sobre cada um dos parâmetros biológicos existentes. Logo, estudos mais detalhados sobre cada estágio do ciclo biológico destes carrapatos, assim como aqueles envolvendo outras espécies de ixodídeos e outras espécies de NEP se fazem necessários a fim de se conhecer quais são os mais eficientes no controle de cada um deles.

O presente trabalho é parte integrante de um projeto de pesquisa desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite, aprovado pelo Conselho Nacional de Pesquisas (CNPQ) e em parceria com a Universidade Federal de Juiz de Fora, com estudos relacionados com a utilização de NEP como agentes de controle biológico de carrapatos, que vem demonstrando ser uma eficiente estratégia no controle destes ectoparasitos.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do nematóide entomopatogênico *Steinernema glaseri* isolado Santa Rosa sobre os parâmetros biológicos de ninfas ingurgitadas de *A. cajennense*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Controle químico de *Amblyomma cajennense*

O controle de ectoparasitos de importância veterinária continua sendo a utilização de produtos químicos de amplo espectro. Entretanto o uso indiscriminado desses parasiticidas, por parte dos produtores e técnicos, pode levar à problemas referentes a intoxicações do homem e dos animais, além de predispor ao desenvolvimento de populações resistentes. (MARTINS & FURLONG, 2001).

As preocupações com a segurança animal, humana e ambiental assim como a necessidade de limitar os resíduos na comida (KOSCHORRECK, KOCH & RONNEHAHRT, 2002) reforçam a necessidade de se buscar novas alternativas no controle de pragas.

PINHEIRO (1987) avaliando o efeito de alguns carrapaticidas piretróides sintéticos sobre a espécie *A. cajennense* relatou que as dosagens sugeridas pelos fabricantes para o controle do carrapato de boi *Boophilus microplus* não surtiram efeito satisfatório, indicando que esse carrapato exige uma dosagem mais elevada de carrapaticidas e intervalos mais curtos entre os banhos estratégicos, para se obter sucesso em seu controle.

Portanto, como as populações de *A. cajennense* são, em geral, mais resistentes aos carrapaticidas do que as de *B. microplus*, quando comparadas às populações não selecionadas destes, o seu controle, através de agentes químicos, pode acarretar um impacto ambiental mais intenso derivado de um maior acúmulo de resíduos destes produtos no ambiente e nos próprios animais tratados (PINHEIRO, 1987).

## 2.2 Controle biológico de Carrapatos

O controle biológico pode ser realizado de diferentes modos, como a utilização de predadores naturais como a garça vaqueira (*Egretta ibis*) DENHOLM *et al.*(2002), a utilização de espécies parasitas, como bactérias, conforme relatado por BRUM (1988), o emprego de fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* testados com sucesso em diferentes espécies de carrapatos como *B. microplus* (FERNANDES *et al.*, 2006; DA COSTA *et al.*, 2002; BITTENCOURT *et al.*, 1999b), *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997), *A. cajennense* (BAHIENSE *et al.*, 2006), *Anocentor nitens* (CARNEIRO *et al.*, 1999; BITTENCOURT *et al.*, 1999a; MONTEIRO, 2000; BITTENCOURT *et al.*, 2000) e *Rhipicephalus appendiculatus* (KAAYA *et al.* 1996).

Além dessas alternativas ao controle químico existem outras como o emprego de NEP, que têm se mostrado eficiente no controle de insetos e também têm sido testados com sucesso como agentes de controle biológico de algumas espécies de carrapatos.

## 2.3 Nematóides Entomopatogênicos

Os nematóides entomopatogênicos são capazes de localizar ativamente, parasitar e matar uma grande variedade de espécies de insetos. Apenas o terceiro estágio juvenil dos nematóides pode sobreviver fora do hospedeiro e mover-se de um para outro. A mortalidade dos insetos pela infecção do nematóide é causada principalmente pela bactéria simbiótica *Xenorhabdus* spp. para Steinernematídeos e *Photorhabdus* spp. para Heterorhabditídeos, com os juvenis infectantes as carregando em seus intestinos e liberando-as na hemocele do hospedeiro. A invasão acontece pelas aberturas naturais, ou em alguns casos, diretamente através da cutícula. A bactéria se multiplica e mata o inseto ou carrapato usualmente dentro de 24 a 72 horas. Os nematóides passam então a se alimentar das bactérias simbióticas mudando para adultos, machos e fêmeas de primeira geração. Depois da reprodução as fêmeas realizam a postura e logo em seguida ocorre a eclosão larval (primeiro estágio juvenil) e as larvas então evoluem até atingir o quarto estágio. O quarto estágio juvenil evolui para adultos machos e fêmeas de segunda geração. Os adultos acasalam e dos ovos produzidos pelas fêmeas de segunda geração eclodem larvas do primeiro estágio juvenil, passando para o segundo estágio. A reprodução dos nematóides continua até que os recursos do cadáver se esgotem, normalmente permitindo a formação de duas a três gerações. Se o suprimento

alimentar for limitado, os ovos produzidos pelas fêmeas de primeira geração já desenvolvem diretamente juvenis infectantes. Quando os recursos estão exauridos as larvas dos juvenis de segundo estágio cessam a alimentação e incorporam as bactérias na câmara bacteriana, quando finalmente mudam para o estágio de pré-infectantes e infectantes, retendo a cutícula do segundo estágio. Normalmente os juvenis infectantes deixam o cadáver na procura de um novo hospedeiro (SAMISH *et al.*, 2004).

Em temperaturas variando entre 18 e 28°C, o ciclo de vida dentro do corpo do hospedeiro se completa em 6 a 18 dias, dependendo do hospedeiro e da espécie de nematóide. Várias espécies de insetos são susceptíveis aos nematóides, porém o efeito destes na maioria dos insetos benéficos não foi relevante. Além disso, o complexo nematóide-bactéria não tem efeito deletério sobre mamíferos, razão pela qual a Agência Americana de Proteção ao Ambiente (EPA) exclui a necessidade de registros e regulamentação de uso (SAMISH *et al.*, 2000).

#### **2.4 Nematóides Entomopatogênicos como agente de controle biológico de carrapatos**

As famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são conhecidas desde o início do século XX, mas as pesquisas para conhecer a biologia e a importância destes nematóides no controle de insetos só foram iniciadas recentemente, devido à disponibilidade e praticidade dos produtos fitossanitários no combate às pragas. Somente a partir da segunda metade do século XX a busca por novas alternativas ao controle químico começou a se fazer necessária em função da redução na eficiência dos métodos tradicionais empregados, por aumento da resistência das populações de pragas, assim como a busca de estratégias que promovessem um menor impacto ambiental. (GAUGLER & HAN, 2002).

Sendo assim, os NEP se tornaram alvo da exploração de seus usos como agentes de controle biológico de pragas agrícolas (STOCK, 2005). ADAMS & NGUYEN (2002) a partir dos anos 80 iniciaram importantes pesquisas sobre os nematóides entomopatogênicos em busca de espécies com potencial para o controle biológico de pragas. Vários estudos sobre o comportamento e a ecologia destes NEP foram realizados nas últimas décadas, visando promover o seu uso no controle de insetos.

Pesquisas vêm mostrando que os carrapatos são susceptíveis à infecção por NEP. Treze espécies de carrapatos ixodídeos e duas espécies de argasídeos são comprovadamente susceptíveis aos nematóides, sendo os adultos aparentemente mais susceptíveis (SAMISH,

2000). Em outro estudo foi observada a susceptibilidade de cinco espécies de carrapatos aos nematóides entomopatogênicos, sendo os adultos mais susceptíveis que os estágios imaturos (GOODWIN *et al.*, 2000). Isto é consequência da ausência de poro genital nos estágios imaturos do carrapato o que dificulta a penetração dos NEP (ZHIOUA *et al.*, 1995; HILL, 1998; GLAZER *et al.* 2001).

GLAZER *et al.* (2001) analisaram a virulência de isolados de NEP (três heterorhabditídeos e seis esteinernematídeos) à fêmeas ingurgitadas de *Boophilus annulatus* (SAY, 1821) e obtiveram maior eficiência para o controle com heterorhabditídeos.

Nos estudos realizados por VASCONCELOS *et al.* (2004) com duas espécies de NEP, *Steinernema glaseri* (STEINER, 1929) e *Heterorhabditis bacteriophora* (POINAR, 1976), para o controle de *B. microplus*, avaliou a mortalidade das fêmeas, utilizando sete dosagens diferentes de nematóides colocados em areia umedecida com água destilada em placas de Petri. Os autores confirmaram que os nematóides foram eficientes no controle de *B. microplus* com uma alta mortalidade e queda do potencial reprodutivo, registrando uma redução de aproximadamente 90% na massa de ovos, com dosagens de 5000 juvenis infectantes de *S. glaseri* por unidade experimental (UE) cuja mortalidade cresceu linearmente com o aumento nas dosagens de NEP. FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) avaliaram a ação do nematóide *Steinernema carpocapsae* sobre *B. microplus* e concluíram que este nematóide se apresenta como um potencial agente de controle biológico desta espécie de carrapato. Já REIS *et al.* (2005) realizaram um experimento para avaliar a associação do nematóide *S. glaseri* com um carrapaticida químico e relataram que houve compatibilidade entre eles no controle de *B. microplus*.

Além destes existem outros estudos que avaliam o potencial de controle biológico de carrapatos tais como ZHIOUA (1995) e GLAZER & SAMISH (1993), entretanto CAPALBO & DE NARDO (2000) discutem a possibilidade de impactos ecológicos provenientes do emprego de agentes para controle biológico, em função de serem organismos vivos que podem se estabelecer no ambiente, multiplicando-se, disseminando-se, infectando e causando doenças em outros organismos, que não as pragas-alvo do controle. Mas, no entanto, para nematóides, BATHON (1996) relata que experimentos com vários vertebrados e invertebrados, mostraram baixo potencial de infecção pelos agentes de controle biológico, em função de suas elevadas especificidades nas relações parasito-hospedeiro, sendo que em condições de laboratório, apenas dosagens muito altas de nematóides foram capazes de matar alguns dos animais testados e tais quantidades são muito superiores às empregadas no controle biológico de pragas. Além disso, os nematóides aplicados para controle são

vulneráveis aos predadores, que em sua grande maioria são generalistas e promoveriam a diminuição na densidade populacional destes agentes, desde que sejam adotados em regiões aonde sejam endêmicos (GAUGLER & HAN, 2002).

KOCAN *et al.* (1998a), relataram que os NEP *Steinernema feltiae* e *Steinernema riobravus* foram eficientes em infectar fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma maculatum*, *A. americanum*, *A. cajennense*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus*. Estes mesmos autores, em outro experimento (KOCAN *et al.*, 1998b) também confirmaram o potencial de cinco espécies de nematóides, *Steinernema glaseri*, *S. riobravus*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) como agentes de controle de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma americanum*, *A. cajennense*, *A. maculatum*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus*.

Existem ainda outros trabalhos que avaliam o potencial de nematóides entomopatogênicos como agentes de controle biológico para o carrapato *Boophilus microplus*, como GLAZER *et al.* (2001); VASCONCELOS *et al.* (2004); FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005).

## 2.5 Controle biológico de *Amblyomma cajennense*

A literatura referente ao controle biológico do carrapato *A. cajennense* é mais restrita do que aquela que enfoca o controle biológico do carrapato *B. microplus*. A maioria dos trabalhos sobre o controle biológico de *A. cajennense* se concentra no uso dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok, cujos resultados são muito promissores, como nos trabalhos de REIS *et al.* (1998); SOUZA *et al.* (1998); SOUZA *et al.* (1999); REIS *et al.* (1999); FERNANDES *et al.* (2004). Além desta última linha de pesquisa existem outras como a de DOHM & LINTHICUM (1993) que obtiveram redução significativa na postura de *A. cajennense* quando infectados pelo vírus causador da encefalomielite eqüina venezuelana. KOCAN *et al.* (1998a), testaram a eficiência de duas espécies de NEP, *Steinernema feltiae* (Filipjev) e *S. riobravus* e observaram elevada susceptibilidade de fêmeas ingurgitadas de várias espécies de carrapatos incluindo *A. cajennense*. KOCAN *et al.* (1998b) avaliaram a letalidade de *S. glaseri* em cinco espécies carrapatos, dentre os quais *A. cajennense*, utilizando fêmeas ingurgitadas. Neste estudo foi registrado um elevado percentual de mortalidade das fêmeas e aquelas que não morreram apresentaram redução significativa no peso da massa de ovos produzida. Entretanto, dentre os

estudos realizados até o presente, nenhum se propôs a analisar as alterações provocadas por *S. glaseri*, em relação aos parâmetros analisados no presente trabalho.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Parasitologia, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG de setembro de 2004 à março de 2005.

#### 3.1. Obtenção do material

##### 3.1.1. Obtenção dos Carrapatos

Foram utilizadas cinco fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* provenientes de bovinos de uma fazenda da região de Juiz de Fora, mantidas em câmara climatizada regulada a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa (U.R)  $>80\%$ , para oviposição e obtenção das larvas conforme BELLATO & DAEMON (1997). As larvas com 20 a 30 dias de jejum foram alimentadas artificialmente em coelhos domésticos através da técnica do saco de pano (NEITZ *et al.*, 1971), sendo utilizadas aproximadamente 4100 larvas por coelho, obtidas de alíquotas de 250mg de massa de ovos, num total de três coelhos.

As larvas ingurgitadas recuperadas no quarto e quinto dias após a infestação foram divididas em grupos de aproximadamente 300 indivíduos, colocados em seringas de plástico com as pontas cortadas e tampadas com algodão, mantidas em câmara climatizada regulada a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa (U.R)  $>80\%$ , para obtenção das ninfas.

Após a manutenção por 30 dias em câmara climatizada as ninfas foram alimentadas em coelhos domésticos seguindo a metodologia de NEITZ *et al.* (1971), para obtenção das ninfas ingurgitadas que foram recuperadas no terceiro e quarto dias após infestação (Figura1).

As ninfas ingurgitadas obtidas foram mantidas na câmara climatizada, nas mesmas condições das larvas, por menos de 24 horas até que os grupos experimentais fossem montados e os bioensaios laboratoriais com exposição de *Amblyomma cajennense* aos NEP fossem iniciados.

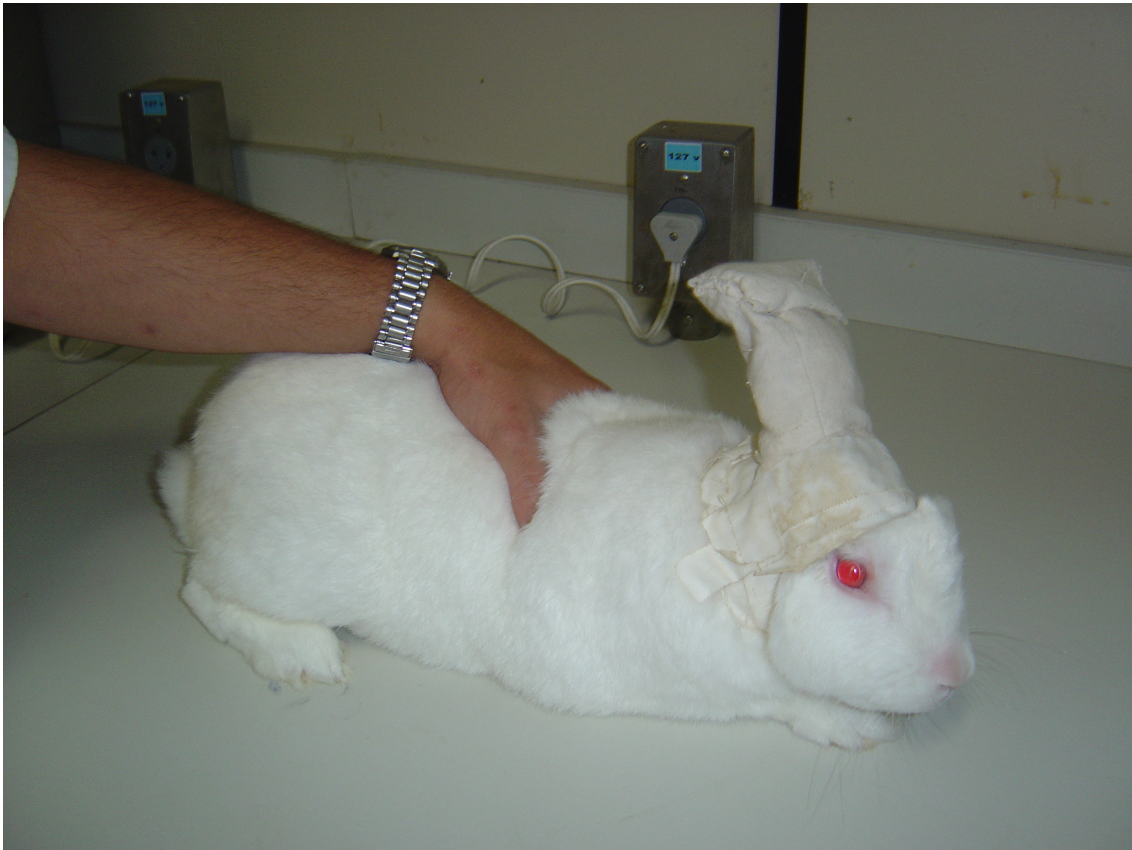


Figura 1. Coelho doméstico com saco de pano nas orelhas para alimentação das metaninfas e obtenção das ninfas ingurgitadas.

### **3.1.2. Obtenção e produção *in vivo* de *Steinernema glaseri* isolado Santa Rosa em lagartas de *Galleria mellonella*.**

Os nematóides *S. glaseri* isolado Santa Rosa foram cedidas pelo Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico-SP, através do Doutor Luis Garrigos Leite. A manutenção da colônia foi realizada com a multiplicação das larvas infectantes (L<sub>3</sub>) em lagartas de último instar de *Galleria mellonella* de acordo com a metodologia proposta por LINDEGREN *et al.* (1993), sendo freqüentemente utilizadas como hospedeiros de nematóides entomopatogênicos, pois além de serem fáceis de criar são hospedeiros adequados destes nematóides.

### **3.1.3. Obtenção e criação de lagartas de *Galleria mellonella***

Foram utilizadas mariposas *Galleria mellonella* oriundas da colônia existente no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, mantidas em câmaras de acasalamento (baldes de plástico com tampas perfuradas) contendo papéis sanfonados para postura. Após a detecção das posturas estas foram transferidas para formas de alumínio (formas para pizza) forradas com papel toalha recoberto por dieta artificial a base de trigo, leite em pó, melado e mel. Esses recipientes contendo as posturas foram então mantidos em câmara climatizada com temperatura de 26±1°C e U.R.>80% e após cerca de oito dias as lagartas eclodiram e após aproximadamente 30 dias da eclosão as lagartas atingiram o tamanho ideal (último instar) para serem infectadas e possibilitar a produção dos nematóides, sendo que uma parcela destas lagartas foi utilizada para a manutenção dos adultos reprodutores (VASCONCELOS, 2003).

## **3.2. Exposição de *Amblyomma cajennense* aos nematóides entomopatogênicos**

Baseando-se no trabalho de VASCONCELOS *et al.* (2004) o qual obteve o melhor resultado com a dosagem de 5000 juvenis infectantes/ 5 fêmeas ingurgitadas, foram utilizados 10000 juvenis infectantes (JI) / 10 ninfas ingurgitadas (NI) no tratamento com maior dosagem de JI, seguindo a proporção de 1000 nematóides por fêmea.

Além desta dosagem de 10000 NEP/ unidade experimental (UE), sendo UE composta por 10 ninfas ingurgitadas, foram testadas as dosagem de 0 (grupo controle), 156, 325, 675, 1250, 2500 e 5000 juvenis infectantes de *S. glaseri* isolado Santa Rosa suspensos em 4ml de água destilada e adicionados em placa de Petri de 5cm de diâmetro cobertas com areia peneirada, previamente autoclavada, assim como proposto por ZHIOUA *et al.*(1995).

Com a finalidade de facilitar a discussão e comparação com outros estudos referenciados, cada um dos tratamentos aqui apresentados será citado na discussão levando-se em conta o número de juvenis infectantes (JI), de *S. glaseri*, por ninfa ingurgitada (NI).

Cada tratamento foi composto por 10 UE, num total de 100 NI por tratamento (Figura 2). O grupo controle só diferiu dos demais grupos por não conter JI. As placas de Petri foram seladas com parafilme e mantidas em estufa climatizada do tipo B.O.D ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e U.R.>80%) por 72 horas. Após este período as ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* foram lavadas com água destilada e transferidas para placas de Petri sem areia e nematóides (Figura 3) e observadas a cada  $24\pm 1$  hora durante 20 dias, a fim de se observar quais as alterações nos parâmetros biológicos, tais como: Período de ecdise (PE), compreendido entre a ecdise ou muda do primeiro e do último exemplar de cada placa vidro; Período de pré-ecdise (PPE), compreendido entre a recuperação do instar ingurgitado até o dia da primeira ecdise de cada placa; Percentual de ecdise (%EC), total de adultos que sofreu ecdise em relação ao total vivo em cada unidade experimental (U.E.); Período de muda (PM), período entre a coleta das ninfas ingurgitadas e a obtenção de cada adulto em cada UE; Percentual de mortalidade(%Mt) dado pela subtração de 100% menos o %Ec, já que os espécimes que não sofreram ecdise morreram.

Cada parâmetro foi analisado em relação ao total de indivíduos por unidade experimental e também para machos (neandros) e fêmeas (neóginas) isoladamente.

### 3.3. Análise estatística

Foram empregados Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey-Kramer com  $p \leq 0.05$  de significância, para verificar a existência de diferenças significativas em cada parâmetro, determinadas pelo tratamento experimental. Em amostragens de distribuição não normal a Análise de Variância e o Teste de Tukey-Kramer foram substituídos pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn's ao nível de confiança de 5%.

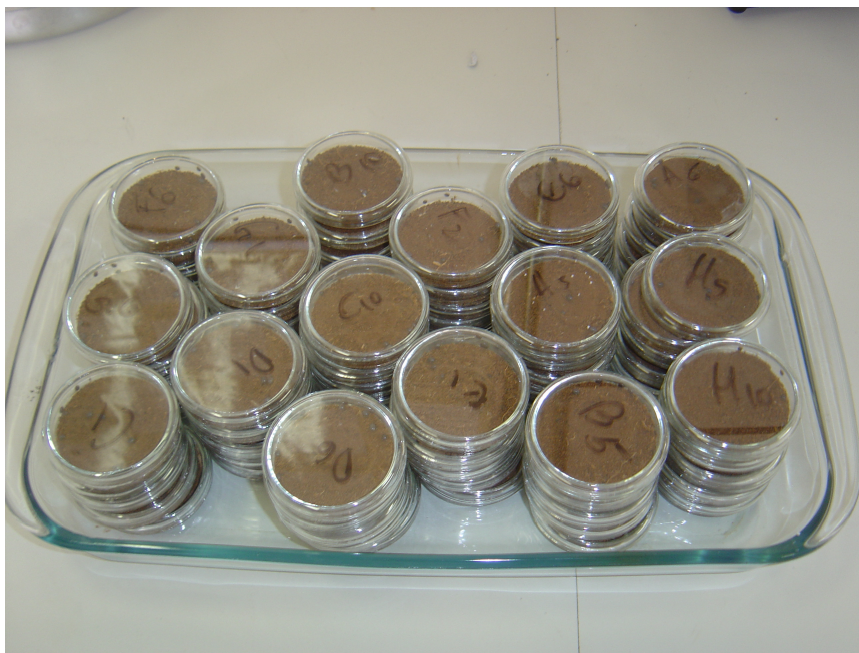


Figura 2. Detalhe dos tratamentos com exposição de *Amblyomma cajennense* aos nematóides entomopatogênicos nas dosagens de 0,156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 e 10000 NEP/ UE.



Figura 3. Detalhe dos tratamentos com as ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* lavadas com água destilada, mantidas em placas de Petri sem areia ou nematóides.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Período de Pré-ecdise

Os períodos de pré-ecdise para adultos, englobando machos e fêmeas e também para cada sexo isoladamente estão apresentados na tabela 1. Analisando-se inicialmente os adultos, englobando os dois sexos, verifica-se que dosagens de 15,6 a 250 JI/ NI não determinaram alterações significativas neste parâmetro, uma vez que foram registradas médias de aproximadamente 13 dias, estatisticamente semelhantes ao do grupo controle.

No grupo tratado com 500 JI/ NI houve uma redução significativa neste parâmetro, com média de 12 dias, em relação ao grupo controle que apresentou um PPE de 13,3 dias. Por outro lado o tratamento com 1000 JI/ NI prolongou-se o período necessário à ecdise registrando-se média de 14 dias. Tais resultados evidenciam que para estes grupos podem ter havido uma interferência no ciclo biológico do *A. cajennense* causado pelo *S. glaseri*. Enquanto a dosagem de 500 JI/ NI causou um estresse que pode ser contornado pela aceleração da ecdise, enquanto no tratamento com 1000 JI/ NI houve um prejuízo para as ninfas, que tiveram seu PPE prolongado. Segundo TRAVASSOS & VALLEJO-FREIRE (1944) o período de pré-ecdise, denominado por estes autores de período de pré-muda, durou entre 9 e 12 dias a 32°C, o que difere dos valores aqui encontrados, provavelmente em função da diferença de temperatura já que no presente trabalho os experimentos foram realizados em estufas climatizadas mantidas à 27°C.

**Tabela 1.** Períodos de pré-ecdise, em dias, de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de *Amblyomma cajennense* infectados com diferentes dosagens de *S. glaseri* mantidos em estufa climatizada com UR $\geq$  80 % e temperatura de 27 $\pm$ 1°C.

Categoria		Controle A	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	TESTE ESTATISTICO
		Grupo Controle	B	C	D	E	F	G	H	
			156 NEP	312 NEP	625 NEP	1250 NEP	2500 NEP	5000 NEP	10000 NEP	
Adultos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn
	$\bar{x} \pm DP$	13,30 <sup>b</sup> $\pm$ 0,48	13,00 <sup>b</sup>	13,00 <sup>b</sup>	13,00 <sup>b</sup> $\pm$ 0,42	13,00 <sup>b</sup> $\pm$ 0,48	13,00 <sup>b</sup>	12,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,70	14,00 <sup>a</sup>	
	Limites	13,00 -14,00	13,00 -13,00	13,00-13,00	13,00 – 14,00	13,00 – 14,00	13,00-13,00	12,00 – 14,00	14,00-14,00	
Machos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn
	$\bar{x} \pm DP$	13,30 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,48	13,00 <sup>cd</sup>	13,00 <sup>cd</sup>	13,00 <sup>abd</sup> $\pm$ 1,58	13,00 <sup>abd</sup> $\pm$ 0,71	13,00 <sup>cd</sup>	12,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,70	14,00 <sup>a</sup>	
	Limites	13,00-14,00	13,00-13,00	13,00-13,00	13,00-18,00	13,00-15,00	13,00-13,00	12,00-14,00	14,00-14,00	
Fêmeas	n	10	10	10	10	10	10	10	9	Kruskal-Wallis Dunn
	$\bar{x} \pm DP$	14,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,53	14,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,49	13,00 <sup>b</sup> $\pm$ 0,63	14,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,23	14,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,23	13,00 <sup>b</sup> $\pm$ 0,63	13,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,03	14,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,73	
	Limites	14,00-15,00	13,00-17,00	13,00-15,00	13,00-16,00	13,00-17,00	13,00-15,00	12,00-15,00	14,00-16,00	

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferenças significativas ao nível de 5%, entre grupos experimentais.

Unidade experimental = 10 ninfas ingurgitadas.

DP = Desvio padrão.

n= Tamanho da amostra.



SMITH (1975) constatou períodos de 14 a 18 dias sob condições controladas, estando de acordo com DAEMON & ISHIZUKA (1995) que encontraram o período de pré-ecdise ninfal variando entre 13 e 19 dias, em condições laboratoriais, corroborando assim os dados aqui encontrados, tendo em vista que o que estes autores denominaram de ecdise ninfal corresponde à ecdise dos neandros e das neóginas do presente trabalho.

REIS *et al.* (2003) analisando o efeito deletério do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sobre a ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* notaram que houve redução significativa no PPE de todos os grupos tratados, mesma tendência registrada no total do grupo tratado com 1000 JI/ NI do presente trabalho, o que sugere o efeito nocivo dos agentes de controle biológico sobre os carrapatos do gênero *Amblyomma* empregados em cada um destes experimentos.

Considerando-se os machos isoladamente nenhum dos grupos tratados apresentou variação significativa do PPE em relação ao controle, embora possa ter havido variação significativa nos PPE dos tratamentos em si. O grupo tratado com 1000 JI/ NI, teve o seu PPE aumentando significativamente de 13,30 para 14,00 dias, variando significativamente também em relação aos grupos tratados com 15,6 JI/ NI, 31,2 JI/ NI, 250 JI/ NI e 500 JI/ NI. Tal aumento seja talvez uma evidência de que quantidades elevadas de *S. glaseri* podem provocar uma mudança na estratégia de sobrevivência das ninfas em muda de *Amblyomma cajennense*. Em função da literatura não apresentar trabalhos que analisam este parâmetro em testes com carrapatos tratados com agentes de controle, não foi possível estabelecer correlações com a literatura pertinente, assim como em relação ao período de pré-ecdise para as fêmeas analisadas isoladamente, o qual sofreu redução significativa no grupo tratado com 32,5 JI/ NI que foi de 13,00 dias e no grupo tratado com 250 JI/ NI, cujo PPE também foi de 13,00 dias em relação ao grupo controle que teve um período de ecdise de 14,5 dias. Esses resultados pode ser um indício de que as fêmeas são mais susceptíveis à ação do nematóide *S. glaseri*, o que poderia ser previsto já que elas apresentam um período de muda mais longo do que os machos (GUGLIELMONE & MOORHOUSE, 1985). YODER *et al.* (1997) citam ainda que as fêmeas demoram mais para espessar sua cutícula nesta fase não parasitária. Entretanto, não foi possível também a realização de comparações com outros resultados em função de não terem sido encontrados trabalhos com a avaliação deste parâmetro na literatura.

Cabe ressaltar ainda que em uma das UE do grupo tratado com 1000 JI/ NI não havia fêmeas e, portanto, o número de tratamentos dessa amostra diferiu dos demais, o

que pode ser explicado pelo fato da coleta das ninfas ingurgitadas terem sido recuperadas no 3º e 4º dias após infestações dos coelhos assim como PRATA *et. al.* (1998), que obteve resultados semelhantes pois as fêmeas apresentam um período de ingurgitamento maior do que os machos.

### **Período de ecdise**

Os períodos de ecdise para adultos, englobando machos e fêmeas e também para cada sexo isoladamente estão apresentados na tabela 2 na qual se pode notar que o PE dos adultos, englobando machos e fêmeas, foi reduzido significativamente no grupo tratado com 1000 JI/ NI (PE=2.30 dias), em relação ao grupo controle (PE= 4,30 dias). Tal variação pode ser um indicativo de que o nematóide *S. glaseri* afetou significativamente o período de ecdise destes carrapatos. Entretanto, REIS, *et al.* (2003) analisando a ação patogênica dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre a ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* relataram que não ocorreu variação significativa no período de ecdise dos grupos tratados em relação ao grupo controle, embora o percentual de mortalidade tenha sido elevado nos grupos tratados com  $10^4$  conídios / espécime.

Os valores encontrados para o PE total do grupo controle estão em concordância com aqueles encontrados por SERRA-FREIRE (1984) que registrou um período de ecdise de 3,96, utilizando neoninfas com aproximadamente a mesma idade e submetidas às mesmas condições de laboratório empregadas no presente trabalho, confirmando que os carrapatos utilizados neste experimento estão em concordância com os padrões registrados por outros autores para esta espécie.

**Tabela 2.** Períodos de ecdise, em dias, de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de *Amblyomma cajennense* infectados com diferentes dosagens de *S. glaseri* mantidos em estufa climatizada com UR  $\geq$  80% e temperatura de 27 $\pm$ 1°C.

Categoria		Controle A	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Teste estatístico	
		Grupo Controle	B	C	D	E	F	G	H		
			156 NEP	312 NEP	625 NEP	1250 NEP	2500 NEP	5000 NEP	10000 NEP		
Adultos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn	
	$\bar{x} \pm DP$	4,30 <sup>a</sup> $\pm$ 1,25	4,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,71	4,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,82	4,20 <sup>a</sup> $\pm$ 0,79	4,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,48	3,70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,92	4,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,82	2,30 <sup>b</sup> $\pm$ 1,27		
	Limites	2,00-6,00	4,00-6,00	3,00-5,00	3,00-5,00	3,00-6,00	3,00-6,00	3,00-5,00	1,00-5,00		
Machos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn	
	$\bar{x} \pm DP$	3,30 <sup>cb</sup> $\pm$ 0,82	3,40 <sup>a</sup> $\pm$ 1,71	3,60 <sup>a</sup> $\pm$ 1,17	3,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,55	3,10 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,52	3,60 <sup>a</sup> $\pm$ 0,97	3,70 <sup>a</sup> $\pm$ 1,25	1,60 <sup>b</sup> $\pm$ 0,52		
	Limites	2,00-5,00	1,00-6,00	2,00-6,00	1,00-5,00	1,00-5,00	2,00-5,00	1,00-5,00	1,00-2,00		
Fêmeas	n	10	10	10	10	10	10	10	9	Bartlett's test ANOVA	
	$\bar{x} \pm DP$	2,30 <sup>a</sup> $\pm$ 1,34	2,50 <sup>a</sup> $\pm$ 1,18	3,20 <sup>a</sup> $\pm$ 1,135	2,50 <sup>a</sup> $\pm$ 1,78	2,90 <sup>a</sup> $\pm$ 1,29	2,60 <sup>a</sup> $\pm$ 1,17	2,40 <sup>a</sup> $\pm$ 1,43	1,78 <sup>a</sup> $\pm$ 0,667		
	Limites	1,00-5,00	1,00-4,00	1,00-5,00	1,00-5,00	1,00-5,00	1,00-4,00	1,00-5,00	1,00-3,00		

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferenças significativas ao nível de 5%, entre grupos experimentais.

Unidade experimental = 10 ninfas ingurgitadas.

DP = Desvio padrão.

n= Tamanho da amostra.

O período de ecdise, considerando-se apenas os machos em separado, apresentou um aumento significativo para os grupos tratados com 15,6 JI/ NI (PE = 3.40 dias), 31,2 JI/ NI (PE = 3.60 dias), 500 JI/ NI (PE = 3.10 dias) e 1000 JI/ NI (PE = 3.70 dias), em relação ao grupo controle cujo período de ecdise foi de 3,30 dias. Tais variações podem expressar o efeito deletério do nematóide *S. glaseri* sobre o carrapato *A. cajennense*, sendo que este aumento no período de ecdise pode aumentar o tempo de exposição destes carrapatos às adversidades ambientais diminuindo sua viabilidade ou ainda aumentando seus riscos de serem predados.

O período de ecdise das fêmeas não sofreu variação em nenhum dos grupos tratados, em comparação ao grupo controle. Já em relação aos adultos ou aos machos houve uma redução em todos os grupos experimentais. Como não foram encontradas, na literatura, análises do período de ecdise para fêmeas, não foi possível a elaboração de correlações.

### **Período de muda**

Os períodos de muda para adultos, englobando machos e fêmeas e também para cada sexo isoladamente estão apresentados na tabela 3, na qual podemos observar que o PM para adultos, englobando machos e fêmeas, sofreu uma redução significativa no grupo tratado com 500 JI/ NI (PM = 14,52 dias), em relação ao grupo controle cujo PM foi de 15,29 dias, concordando com OLIVIERI & SERRA-FREIRE (1984), que registraram um período muda de 15,66 dias. Dessa maneira, fica claro que, os parâmetros aqui analisados para o carrapato *A. cajennense* estão dentro dos padrões estabelecidos para a espécie. Logo, a redução no período de muda registrada no grupo tratado com 500 JI/ NI pode servir de base para evidenciar que *S. glaseri* apresentou ação patogênica sobre *A. cajennense* em quantidades elevadas e, mesmo assim, havia um grupo tratado com dosagem superior a esta, grupo tratado com 1000 JI/ NI que não sofreu variação estatisticamente significativa neste parâmetro, mas de qualquer maneira neste último foi registrado alterações significativas quando analisou o PPE e o PE, o que corrobora tal suposição.

**Tabela 3.** Períodos de muda, em dias, de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de *Amblyomma cajennense* infectados com diferentes dosagens de *S. glaseri* mantidos em estufa climatizada com UR  $\geq$  80% e temperatura de 27 $\pm$ 1°C.

Categoria		Controle A	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Teste estatístico
		Grupo Controle	B	C	D	E	F	G	H	
			156 NEP	312 NEP	625 NEP	1250 NEP	2500 NEP	5000 NEP	10000 NEP	
Adultos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn
	$\bar{x} \pm DP$	15,29 <sup>a</sup> $\pm$ 0,45	15,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,43	14,95 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,49	14,75 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,83	15,31 <sup>a</sup> $\pm$ 0,38	14,70 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,38	14,52 <sup>b</sup> $\pm$ 0,45	14,32 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,20	
	Limites	14,50-15,50	14,40-15,90	14,20-15,70	13,22-15,90	14,88-16,00	14,11-15,30	13,80-15,50	12,00-15,22	
Machos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn
	$\bar{x} \pm DP$	15,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,71	14,89 <sup>a</sup> $\pm$ 0,56	13,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,79	14,98 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,19	15,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,84	13,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,65	14,10 <sup>b</sup> $\pm$ 0,42	14,746 <sup>ab</sup> $\pm$ 14,75	
	Limites	13,86-16,00	14,400-16,00	14,00-16,42	13,15-18,0	14,00-16,660	14,00-16,00	13,15-14,66	14,20-15,28	
Fêmeas	n	10	10	10	10	10	10	10	9	Bartlett's test ANOVA
	$\bar{x} \pm DP$	15,66 <sup>a</sup> $\pm$ 0,93	15,32 <sup>a</sup> $\pm$ 0,98	15,22 <sup>a</sup> $\pm$ 0,96	15,60 <sup>a</sup> $\pm$ 0,78	15,52 <sup>a</sup> $\pm$ 1,16	14,52 <sup>a</sup> $\pm$ 0,88	14,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,62	15,33 <sup>a</sup> $\pm$ 0,58	
	Limites	14,00-17,00	13,80-17,00	14,00-17,200	14,00-16,75	13,33-17,66	13,00-15,33	13,70-15,50	14,33-16,00	

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferenças significativas ao nível de 5%, entre grupos experimentais.

Unidade experimental = 10 ninfas ingurgitadas.

DP = Desvio padrão.

n= Tamanho da amostra.

Considerando-se apenas os machos isoladamente, o PM sofreu redução significativa apenas no grupo tratado com 500 JI/ NI, que foi de 14,10 dias, em relação ao grupo controle que apresentou um PM de 15,1 dias, seguindo a mesma tendência da análise dos adultos como um todo, reforçando assim a aquela suposição de que a espécie de NEP testada neste ensaio apresenta um potencial como agente de controle biológico do carrapato *A. cajennense*, sendo os machos mais susceptíveis aos NEP do que as fêmeas.

Já para as fêmeas, analisadas isoladamente, não houve variações significativas nos grupos tratados, em relação ao grupo controle, embora todos tenham apresentado períodos de muda superiores aos dos machos, o que era de se esperar, já que as fêmeas apresentam um metabolismo mais intenso, devido a formação de estruturas reprodutivas mais complexas do que aquelas dos machos, o que também leva ao aumento do período de muda (GUGLIELMONE e MOORHOUSE, 1985), enquanto os machos precisam de menos tempo para sofrer a ecdise já que a exigência em termos de recursos é muito menor.

### **Percentual ecdise (% Ec) e Percentual de mortalidade (%Mt)**

Os percentuais de ecdise para adultos, englobando machos e fêmeas e também para cada sexo isoladamente estão apresentados na tabela 4, na qual se pode notar que o percentual de fêmeas obtidas, após a ecdise das ninfas ingurgitadas, foi menor que o de machos em todos os grupos experimentais, o que está de acordo com PRATA *et al.* (1998), pois as ninfas que originam os machos apresentam um período de ingurgitamento menor do que aquelas que originam as fêmeas e como as ninfas ingurgitadas utilizadas neste trabalho foram recuperadas no 3º e 4º dias após infestação dos coelhos, isso poderia ser previsto.

É importante ressaltar que os espécimes que não sofreram ecdise morreram e, sendo assim, o %Mt pode ser calculado pela subtração de um menos o %Ec, e dentre os grupos tratados só foi observada a redução significativa do %Ec no grupo tratado com 1000 JI/ NI, tratamento com dosagem de *S. glaseri* máxima deste experimento, cujo %EC foi de 87% e, portanto, o %Mt de 13,5%, depreendendo-se que elevadas dosagens do nematóide possam ter impedido a ecdise de uma parcela relevante

**Tabela 4.** Percentual de ecdise de adultos e de machos e fêmeas, isoladamente, de *Amblyomma cajennense* infectados com diferentes dosagens de *S. glaseri* mantidos em estufa climatizada com UR  $\geq$  80% e temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Categoria		Controle A	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Tratamento	Teste estatístico	
		Grupo Controle	B	C	D	E	F	G	H		
			156 NEP	312 NEP	625 NEP	1250 NEP	2500 NEP	5000 NEP	10000 NEP		
Adultos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn	
	$\bar{x} \pm \text{DP}$	98% <sup>a</sup> $\pm$ 4%	96% <sup>a</sup> $\pm$ 7%	97% <sup>a</sup> $\pm$ 7%	95% <sup>ab</sup> $\pm$ 7%	95% <sup>ab</sup> $\pm$ 7%	95% <sup>ab</sup> $\pm$ 5%	95% <sup>ab</sup> $\pm$ 7%	87% <sup>b</sup> $\pm$ 5%		
	Limites	90% - 100%	80% - 100%	80% - 100%	80% - 100%	80% - 100%	80% - 100%	80% - 100%	80% - 90%		
Machos	n	10	10	10	10	10	10	10	10	Kruskal-Wallis Dunn	
	$\bar{x} \pm \text{DP}$	69% <sup>a</sup> $\pm$ 14%	54% <sup>a</sup> $\pm$ 14%	57% <sup>a</sup> $\pm$ 19%	59% <sup>a</sup> $\pm$ 23%	50% <sup>a</sup> $\pm$ 20%	60% <sup>a</sup> $\pm$ 11%	60% <sup>a</sup> $\pm$ 16%	62% <sup>a</sup> $\pm$ 16%		
	Limites	40%-- 90%	40% - 80%	20% - 80%	10% - 88%	20% - 70%	40% - 80%	30% - 80%	50% - 90%		
Fêmeas	n	10	10	10	10	10	10	10	9	Bartlett's test ANOVA	
	$\bar{x} \pm \text{DP}$	29% <sup>a</sup> $\pm$ 11%	42% <sup>a</sup> $\pm$ 16%	40% <sup>a</sup> $\pm$ 16%	36% <sup>a</sup> $\pm$ 18%	45% <sup>a</sup> $\pm$ 15%	35% <sup>a</sup> $\pm$ 13%	35% <sup>a</sup> $\pm$ 13%	25% <sup>a</sup> $\pm$ 10%		
	Limites	10% - 50%	20% - 60%	20% - 60%	10% - 70%	30% - 70%	20% - 60%	20% - 60%	0 - 44%		

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferenças significativas ao nível de 5%, entre grupos experimentais.

Unidade experimental = 10 ninfas ingurgitadas.

DP = Desvio padrão.

n= Tamanho da amostra.





dos adultos. PINHEIRO (1987) constatou que *A. cajennense* é mais resistente às dosagens de agentes de controle químicos do que *B. microplus*, e isso talvez possa ser justificado pelo fato de *A. cajennense* apresentar uma cutícula quitinosa mais espessa do que aquela encontrada em outros carrapatos, mais susceptíveis à infecção por este mesmo nematóide, assim como testado por KAAYA *et al.* (2000) trabalhando com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus appendiculatus* os quais registraram um índice superior a 60% de mortalidade com uma dosagem de 1000 JI de *S. carpocapsae* isolado "DD" / fêmea ingurgitada. VASCONCELOS *et al.* (2003) em seu trabalho registraram que a dosagem de JI de *S. glaseri* necessária para que mais de 90% das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* morressem em 3 dias pós-infecção foi de 500 JI / fêmea ingurgitada. SAMISH & GLAZER (1992), com 100 JI de *S. carpocapsae*, isolado DT, por espécime obtiveram 90% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus*, após oito dias de infecção e observaram que 200 JI / espécime proporcionaram o mesmo índice de mortalidade, porém em apenas dois dias pós-infecção. Fêmeas ingurgitadas de *A. americanum* também foram susceptíveis às infecções por *S. glaseri* e *S. riobraviss* com dosagens de 5000 JI/ UE, obtendo-se 90% de mortalidade (KOCAN *et al.*, 1998b). Embora existam experimentos que comprovem a letalidade de *S. glaseri* sobre fêmeas ingurgitadas de algumas espécies de carrapatos, não foi possível correlacionar a literatura com o presente trabalho já que aqui os bioensaios foram realizados com ninfas ingurgitadas.

A mortalidade não foi significativa em seis dos sete grupos tratados, só surtindo efeito no grupo cuja dosagem foi de 1000 JI/ NI. Outra explicação possível, para que o efeito deletério não tenha sido significativo em seis dos sete grupos tratados, além do fato de *A. cajennense* possuir cutícula mais espessa que outros carrapatos, pode ser o fato de que as ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* não apresentam aberturas genitais o que dificultou a infecção pelos Steinernematídeos já que estes não possuem dentículos na região anterior que facilitam a penetração via tegumento (GAUGLER & HAN, 2002). Ainda podemos especular que a baixa eficiência na infecção de *A. cajennense* por *S. glaseri* foi decorrente da capacidade que alguns carrapatos têm de produzir secreções cuticulares com a propriedade de repelir ou matar os nematóides (MAULÉON *et al.*, 1993).

Tanto os percentuais de ecdise e mortalidade quanto os períodos de pré-ecdise, ecdise e muda poderiam ter sofrido maior influência dos nematóides entomopatogênicos utilizados se na montagem das unidades experimentais, não tivesse sido adicionada

areia nas placas de Petri, pois segundo SAMISH *et al.* (2000) pode ocorrer redução da virulência pelos JI quando adicionado solo na placa de Petri. Entretanto optou-se por incluir areia a fim de aproximar os bioensaios das condições encontradas em campo.

Sendo assim, se faz necessário a realização de novos estudos avaliando o efeito de *S. glaseri* isolado Santa Rosa sobre os parâmetros biológicos de ninfas de machos e fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* com dosagens superiores a 1000 juvenis / ninfa ingurgitada, assim como sobre diferentes tipos de substrato.

## 5. CONCLUSÕES

\* Na maioria dos grupos experimentais foram registradas alterações significativas dos parâmetros biológicos das ninfas analisadas, confirmando que o nematóide é capaz de penetrar em estágios sem abertura genital.

\* *S. glaseri* apresentou potencial de controle biológico para ninfas ingurgitadas de *A. cajennense*.

\* As dosagens a partir de 500 juvenis infectantes / ninfa ingurgitada foram deletérias à determinados processos da fase não parasitária de *A. cajennense*.

\* Novos estudos são necessários, ainda *in vitro*, com dosagens superiores a 1000 juvenis / ninfa ingurgitada, assim como com outros tipos de substratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B. J. & NGUYEN, K. B. 2002. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York:01-33.

BAHIENSE, T.C; FERNANDES, E.K.K.;BETTENCOURT, V.R.E.P. 2006. Avaliação da atividade do fungo *Beauveria bassiana* sobre ovos do carrapato *Amblyomma cajennense*. **Rev. Brás. Parasitol. Vet.**,13 (1): 315.

BARRENTA, S F. 1961. Resistência de las garrapatas a los ixodicidas. In Lucha contra las garrapatas del ganado. **FAO. Est Agrop.**,54: 94-103.

BARROS, T. A. M.; EVANS, D. E. 1989. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesq. Vet. Bras.**,9: 17-21.

BELLATO, V.; DAEMON, E. 1997. Efeitos de Três Temperaturas Sobre A Fase Não Parasitária de *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae). **Ver. Brás. Parasitol. Vet.**,6 (1): 21-27.

BATHON, H. 1996. Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. **Biocont. Sci. and Technol.**, 6: 421-434.

BITTENCOURT, V. R. E. P. 1997. Avaliação da eficácia In Vitro de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **6**(1): 42-52.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MENEZES, G. C. R.; MASCARENHAS, A. G. ; MONTEIRO, S. G. 1999a. Ação dos fungos *BEAUVERIA BASSIANA* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1882 sobre larvas do carrapato *ANOCENTOR NITENS* (Acari: Ixodidae). **Parasitologia al Dia**, **23**(3-4): 82-86.

BITTENCOURT, V.R.E.P; MASCARENHAS, A.G., FACCINI, J. L. H. 1999b. Mecanismo de infecção do fungo *METARHIZIUM ANISOPLIAE* no carrapato *BOOPHILUS MICROPLUS* em condições experimentais. **Ciência Rural**, **29**(2): 351-354.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; 2000. MASCARENHAS, A. G. ; MENEZES, G. C. R. ; MONTEIRO, S. G. . Ação in vitro do *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *BEAUVERIA BASSIANA* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre ovos do carrapato *ANOCENTOR NITENS* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). **Ver. Brás. Méd. Vet.**, **22**(6): 248-251.

BRUM, J. G. W. 1988. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) por *Cedecea lapage* (Grimont *et al.*1981) etiopatologia e sazonalidade. **Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Brasil.**

CAPALBO, D. M. F. & DE NARDO, E. A. B. 2000. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico: p. 351-385. *In*: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 388.

CARNEIRO, M.E.; MONTEIRO, S. G. ; DAEMON, E. ; BITTENCOURT, V. R. E. P. 1999. Effect of the isolate 986 of the fungi *BEAUVERIA BASSIANA* (Bals.) Vuill. on eggs of the tick *ANOCENTOR NITENS* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). **Ver. Brás. Parasitol. Vet.**, **8**(1): 59-62.

CHAGAS, A.C. S., PASSOS, W. M., PRATES, H. T., LEITE, R.C., FURLONG, J., FORTES, I.C.P. 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp.* Em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, **39**(5): 247-253.

DA COSTA G.L., SARQUIS M.I., DE MORAES A.M. & BITTENCOURT V.R. 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologi**, **154**: 207-209.

DAEMON, E., ISHIZUKA, A. C. 1995. Efeitos de diferentes temperaturas sobre a ecdise ninfal de *Amblyomma cajennense* (Acarina: Ixodidae). **Rev. Bras. Ciênc. Vet.** **2**(1): 7-9.

DENHOLM, I., DEVINE G.J. & WILLIAMSOM, M.S. 2002. Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. **Science**, **297**: 2222-2223.

DOHM, D.J., LINTHICUN, K.J. 1993. Effects of temperature on fecundity and viral replication in *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae) infected with venezuelan equine encephalomyelitis virus. **J. Med. Entomol.** **30**(1):286-90.

DOULCET M. M. A.de, MIRANDA, M. B., BERTOLOTTI M. A. 1998. Infectivity of entomogemous nemetodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to *Pelliculus humanus capilalis* De Geer (Anoplura: Pediculidae). **Fund. Appl Nematol.** **21**:13-16.

FERNANDES, É. K. K. ; COSTA, G. L. ; MORAES, A. M. L. ; BITTENCOURT, V. R. E. P. 2004. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) . **Journal of Basic Microbiology.** **44**(4): 270-274.

FERNANDES, E. K., COSTA, G. L., MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V., BITTENCOURT, V. R. E. P. 2006. Study on genetic variability of *BEAUVERIA BASSIANA* isolates associated with morphological evaluation and pathogenicity for *BOOPHILUS MICROPLUS* larvae. **Parasitology Research**, **98**(4): 324-332.

FLECHTMANN, C.H.W. 1985. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 3ªed. São Paulo: Editora Nobel, 192p.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; LOURES-RIBEIRO, A. 2005. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and All strains (Steinernema: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **48**(6): 911-919.

FURLONG, J. 1993. Controle do carrapato dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, **8**: 49-61.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C. de A. 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, **23**(137): 53-56.

GAUGLER, R. & HAN, R. 2002. Production technology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York, 289-310.

GLAZER, I. 1992. Invasion rate as a measure of infectivity of Stenernematid and Heterorhabditid nematodes to insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, **59**: 90-94.

GLAZER, I. & SAMISH, M. 1993. Suitability of *Boophilus annulatus* replete female ticks as hosts of the nematode *Steinernema carposapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology** **61**: 220-222.

GLAZER, I.; ALEKSEEV, E. & SAMISH, M. 2001. Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged female *Boophilus annulatus* ticks. **Journal of Parasitology**, **87**(4): 808-812.

GLAZER, I.; ALEKSEEV, E. & SAMISH, M. 2001. Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged female *Boophilus annulatus* ticks. **Journal of Parasitology**, **87**(4): 808-812.

GODWIN, P. K.; SAMISH, M. & GLAZER, I. 2000. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African tick species. **Ann. NY. Acad. Sci.** **916**: 303-308.

GUGLIELMONE, A.A & MOORHOUSE, D.E. 1985. Differences in nymphs of *Amblyomma triguttatum* moulting to males or females. **Acarologia. t. XXVI.** (1): 7-11.

HONER, M.R., A GOMES. 1990. O manejo integrado da mosca dos chifres, berne e carrapato em gado de corte. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, 60 p. (Circular Técnico, 22).

JORDÃO L P. 1981. Técnica elimina carrapato. **Prod Leite**; 66: 26-30.

KAAYA, G.P., E.N. MWANGI & E.A. OUNA. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.** **67**: 15–20.

KAAYA, G. P. 2000. Laboratory and field evaluation of entomogenous fungi for tick control. **Annals of the New York Academy of Science**, **916**: 559-564.

KOCAN, K. M.; PIDHERNEY, M. S.; BLOUIN, E. F.; CLAYPOOL, P. L.; SAMISH, M. & GLAZER, I. 1998a. Interaction of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) with selected species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, **35** (4): 514-20.

KOCAN, K. M.; PIDHERNEY, M. S.; BLOUIN, E. F.; CLAYPOOL, P. L.; SAMISH, M. & GLAZER, I. 1998b. Entomopathogenic nematodes as a potential biological control method of ticks. **Annals New York Academy of Sciences**, **9**: 355-364.

KOSCHORRECK, J., KOCH, C. & RONNEFAHRT, I. 2002. Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU – a regulatory perspective. **Toxicology Letters**, **131**: 117–124.



LINDEGREN, J.E.; VARELO, K.A.; MACKEY, B.E. 1993 Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapse* infective juvenile. **Journal of Nematology**, **25** (2): 193- 197.

LINTHICUM, K.J.; LOGAN, T.M. BAILEY, C.L.; GORDON, S.W.; PETERS, C.J.; MONATH, T.P.; OSORIO, J.; FRANCY, D.B.; MC LEAN, R.G.; LEDUC, J.W.; et. al. 1991. Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection in and transmission by the tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). **J Med Entomol**, **28**(3):405-9.

MAULEON H.; BARRE, N.; PANOMA, S. 1993. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). **Experimental Applied Acarology**, **17**: 831–838.

MASSARD, C.A. 1984. **Ehrlichia bovis (Donatien & Lestoquard, 1936) diagnóstico, cultivo in vitro e aspectos epidemiológicos em bovinos no Brasil**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 113p. (Tese, Doutorado)

MONTEIRO, J.L., FONSECA, F., PRADO, A. 1931. Pesquisas epidemiológicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. **Mem. Inst. Butantã**, **6**: 139-173.

MONTEIRO, S.G. 2000. **Ação do isolado 986 do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, sobre o carrapato *Anocentor nitens* (Neumann) Schulze, 1937**. 75f. Tese (Tese de Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

NEITZ, W.O., BOUGHTON, F., WALTERS, H.S. 1971. Laboratory investigations on the life caroo paralysis tick *Ixodes rubidicundus* (Neumann, 1904). **Ondersp. J. Vet. Res.**, **38**: 215-224.

OLIVIERI, J.A. & SERRA-FREIRE, N.M., 1984. Estádio larval do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Arq. Univ. Fed. Rural RJ**, **07**:139-147.

PINHEIRO, V.R.E. 1987. Avaliação do efeito carrapaticida de alguns pিরeróides sintéticos sobre o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acarina: Ixodidae). **A hora Veterinária**. Ano 7 n.40. nov/Dez.

PRATA, M.C.A., FACCINI, J.L.H., & DAEMON, E. 1998. Relationship between weight and number of engorged *Amblyomma cajennense* Larvae and nymphs (Fabricius, 1787)(ACARI: IXODIDAE) in experimental infestations on rabbits. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 7(2): 107-111.

REIS, R. C. S. ; SOUZA, E. J. ; BITTENCOURT, V. E. P. 1998. Avaliação da Eficácia in vitro dos Fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre Larvas não Alimentadas do carrapato *Amblyomma cajennense*.. In: **VI Simpósio de Controle Biológico**. Rio de Janeiro - RJ.p. 5-5.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R. ; SOUZA, E.J. de ; BITTENCOURT, V. R. E. P. 2001. Ação in vitro dos fungos *BEAUVERIA BASSIANA* (Bals.) Vuill. e *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (Metsch.) Sorok. sobre ninfas e adultos de *AMBLYOMMA CAJENNENSE* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 53(5): 544-547.

REIS, R.C.S.; CHACON, S. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. ; FACCINI, J. L. H. . 2003. Efeito dos fungos *BEAUVERIA BASSIANA* (Balsamo) e *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (Metschnikoff, 1879) na ecdise ninfal de *AMBLYOMMA COOPERI* (Nuttal & Warburton, 1908) (Acari: Ixodidae). **Ver. Brás. Parasitol. Vet.** 12(2): 68-70.

REIS, R.C..S.; MELO, D.R.; PERINOTTO, W.M. de S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. 2005. Patogenicidade in vitro de formulações fúngicas sobre ninfas e adultos de *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Ver. Brás. Parasitol. Vet.** 14(3): 101-105.

SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. 2000. Biocontrol of ticks by entomopathogenic nematodes. **Annals of The New York Academy of Sciences**, 916: 589-594.

SAMISH, M. 2000. Biocontrol of ticks. **Annals of New York Academy of Sciences**, 916: 172-178.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. 2004. Biological control of ticks. **Parasitology**, **129**: 389-403.

SERRA-FREIRE, N.M. 1982. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Univ. Fed. Rural. Rio de Janeiro**, **5**: 187-193.

SERRA-FREIRE, N. M. 1984 Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: Ocorrência estacional e comportamento dos estágios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro**, **5(2)**:187-193.

SMITH, M.W. 1975. Some aspects of the ecology and lifecycle of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787) in Trinidad and their influence on tick control measures. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **69**: 121-129.

SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. 1999. Efeito do contato dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na ecdise ninfal de *Amblyomma cajennense*. In: XVI Semana do Médico Veterinário da UFRRJ. Seropédica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. **6**: 84-87.

SOUZA, E.J. de; REIS, R. C.S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. 1999. Efeito do contato dos fungos *BEAUVERIA BASSIANA* e *METARHIZIUM ANISOPLIAE* na ecdise ninfal de *AMBLYOMMA CAJENNENSE*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, **6(2)**: 84-87.

SOUZA, E.J. de; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. 1999. Evaluation of in vitro effect of the fungo *BEAUVERIA BASSIANA* and *METARHIZIUM ANISOPLIAE* on eggs and larvae of *AMBLYOMMA CAJENNENSE*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **8(2)**: 127-132.

STOCK, S. P. 2005. Insect-parasitic nematodes: from labs curiosities to model organisms. **Journal of Invertebrate Pathology**, **89**: 57-66.

SUTHERST R.W., Jones R.J. & Schnitzerling H.J. 1982. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature** **295**: 320-321.

TRAVASSOS, J & VALLEJO-FREIRE, J. 1944. Criação de *Amblyomma cajennense* para o preparo da vacina contra febre-maculosa. **Mem. Inst. Butantan**, **18**: 146-235.

VASCONCELOS, V.O. 2003. Ação dos nematóides entomopatogênicos *Steinernema glaseri* Santa Rosa e *Heterorhabditis bacteriophora* CCA no comportamento biológico de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. Dissertação de mestrado em Comportamento e Ecologia Animal. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, UFJF, Brasil.

VASCONCELOS, V. O.; FURLONG, J.; FREITAS, G. M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M. M.; RODRIGUES, R. C. & PRATA, M. C. A. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol. Res.** **94**: 201-206.

YODER, J.A; SELIN, M.E. 1997. Impact of Feeding Moulting and relative Humidity on Cuticular Wax Deposition and Water Loss in the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum*. **J. Insect Physiol.** **43**: 547-551.

ZHIOUA E., BROWNING M., JOHNSON P.W., GINSBERG H.S. & LEBRUN R.A. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal for Parasitology**, **83**: 815-818.

ZHIOUA, E.; LEBRUN, R. A. GINSEBERG, H. S. AESCHLIMANN, A. 1995. Pathogenicity of *Steinernema carpocapse* and *S. Glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) to *ixodes acapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, **32** (6): 900-905.