
Atividade anti-ixodídica dos fungos *Sporothrix insectorum* e *Paecilomyces fumosoroseus* sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): bioensaios e microscopia eletrônica de varredura

The use of *Sporothrix insectorum* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): *in vitro* assay and electronic microscopy

Tiago Lot da Silva Nunes¹; Érika Barbosa Neves Graminha¹; Arlete Silveira Maia¹;
Giane Serafim da Silva^{1,2}; Nancy Prette Varandas¹; Alvimar José da Costa¹

Resumo: Em função do desenvolvimento de resistência aos diversos quimioterápicos existentes, o controle biológico vem sendo uma alternativa promissora no controle do *Boophilus microplus*. Neste trabalho foi avaliada a ação patogênica de *Sporothrix insectorum* e de *Paecilomyces fumosoroseus* nas diferentes fases do ciclo de vida do *Boophilus microplus*. Para isso, os fungos em estudo foram cultivados em meio de cultura apropriado, obtendo-se a suspensão estoque, a partir da qual foram preparadas suspensões nas concentrações de 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ conídios/mL para ambos os fungos. Os ovos e as larvas foram tratados por aspersão, e as partenóginas foram imersas nas diferentes suspensões de conídios. A patogenicidade dos fungos foi avaliada pela “performance reprodutiva” das carrapatos. O delineamento experimental foi realizado com cinco repetições para cada grupo de tratamento, nas diferentes concentrações fúngicas. Os fungos *S. insectorum* e *P. fumosoroseus* reduziram em 50,19% e 49,34%, respectivamente, a postura das partenóginas, quando utilizados na concentração de 10⁸ conídios/mL. Em relação à eficácia, tais fungos alcançaram os valores de 82,99% e 82,93% na concentração de 10⁸ conídios/mL e na de 10⁹ conídios/mL, respectivamente. Sobre ovos de *B. microplus*, a atividade de *P. fumosoroseus* foi superior a de *S. insectorum*, reduzindo a eclodibilidade em 79,04% na concentração de 10⁶ conídios/mL. *S. insectorum* reduziu tal parâmetro em apenas 37,92%, na concentração de 10⁷ conídios/mL. No tratamento das larvas, os fungos avaliados não diferiram significativamente (P<0,05) quanto à mortalidade das mesmas. As elétron-micrografias de varreduras, dos diferentes ínstares do *B. microplus*, evidenciam o poder predador dos fungos *S. insectorum* e *P. fumosoroseus*. Em face dos resultados obtidos, pode-se inferir que *S. insectorum* e *P. fumosoroseus* apresentaram ação deletéria sobre partenóginas de *B. microplus* *in vitro*, o que reforça a possibilidade do eventual emprego, desses fungos, no biocontrole desse importante ácaro.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, *Sporothrix insectorum*, *Paecilomyces fumosoroseus*, controle biológico.

Abstract: In function of the development resistance to the several existent chemotherapies, biological control has being a promising alternative to the control of *Boophilus microplus*. In this work, the pathogenic action of *Sporothrix insectorum* and *Paecilomyces fumosoroseus* in the different stages of life cycle of *Boophilus microplus* was evaluated. The fungus in study were cultivated in appropriate culture medium and suspensions in the concentrations of 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ conidia/mL for both fungus were prepared, starting from stock suspension. The eggs and the larvae were treated by spray, and the engorged tick were immersed in the different conidia suspensions. The pathogenicity of the fungus were appraised for the reproductive performance of the ticks. The experimental was accomplished with five repetitions for each treatment group, in the different fungal concentrations. The fungus *S. insectorum* and *P. fumosoroseus* reduced in 50,19% and 49,34%, respectively, the posture of the infected engorged female ticks, in the concentration 10⁸ conidia/mL. In relation to effectiveness, the fungus *S. insectorum* and *P. fumosoroseus*, they reached the values 82,99%, in the concentration 10⁸ conidia/mL, and 82,93% in the concentration 10⁹ conidia/mL, for the respective fungus. In the eggs treatment with the *S. insectorum* and *P. fumosoroseus*, the fungi *P. fumosoroseus* presented a superiority with reduction of eclodibility in 79,04%, in the concentration 10⁶ conidia/mL, while the *S. insectorum*, reduced in only 37,92%, in the concentration 10⁷ conidia/mL. In the larvae treatment there were not significant differences in the larva mortality in both fungi. The electronic microscopy, in different stage of life of the *B. microplus*, showed the power predatory of the fungi *S. insectorum* and *P. fumosoroseus*. With these results, it can be inferred that *S. insectorum* and *P. fumosoroseus* presented deleterious action on engorged female of *B. microplus* *in vitro*, what reinforces your possibility eventual control of this important tick.

Key words: *Boophilus microplus*, *Sporothrix insectorum*, *Paecilomyces fumosoroseus*, biologic control.

¹ CPPAR – Centro de Pesquisas em Sanidade Animal, FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal.

² UNICASTELO – Universidade Camilo Castelo Branco – Campus VIII.

1 Introdução

No Brasil, segundo Horn (1983), os prejuízos causados pelo *Boophilus microplus* atingem anualmente a cifra de um bilhão de dólares. Entre os fatores responsáveis por essas perdas destacam-se: desvalorização do couro pelo ataque direto do parasito, desgaste dos animais pelo hematofagismo a que são submetidos, irritação no local da picada, estresse pelo manejo imprimido aos animais para o controle do parasito, mortalidade de aproximadamente 1,2% do rebanho em virtude de intoxicações com antiparasitários, acidentes nos banheiros utilizados para o tratamento, redução da taxa de natalidade, alto custo de aquisição dos quimioterápicos, construção e manutenção de instalações, gastos com mão-de-obra, e principalmente transmissão dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (PENNA, 1990; VERRÍSSIMO, 1990).

O uso de produtos carrapaticidas é largamente difundido e empregado há anos, sendo considerado o principal método de controle dos carrapatos. Contudo, essa ampla utilização tem gerado a seleção de cepas resistentes, paralelamente ao aumento gradativo de custos quando aplicados isoladamente (DRUMOND, 1970, *apud* BARROS e EVANS, 1989).

O controle biológico tem se apresentado como uma alternativa promissora no controle de parasitos. Alguns fungos têm sido objeto de pesquisas para o controle alternativo de *B. microplus*. Rocha (1984) descreveu várias espécies de invertebrados que participam ativamente no controle da fase de vida livre de *B. microplus*.

Alves *et al.* (1993) verificaram que o *Metarhizium anisopliae*, nas doses 10^6 e 10^7 conídios/mL, impediu a eclosão total de ovos de *B. microplus*. Embora também patogênica para ovos desse ácaro, a *Beauveria bassiana* mostrou eficácia anti-embriogênica inferior o *M. anisopliae*. Porém, tais fungos foram avaliados apenas contra ovos de *B. microplus*.

O *Sporothrix insectorum* e o *Paecilomyces fumosoroseus* têm demonstrado efeitos satisfatórios quando utilizados na agricultura. Ordonez e David (1993) verificaram que o *Sporothrix insectorum* reduz acentuadamente a infestação pelo percevejo *Leptopharsa heveae* em seringueiras (*Hevea brasiliensis*). Ainda, o *P. lilacinus*, atuando em ovos de *Meloidogyne arenaria*, provocou uma diminuição do número deste parasito do solo, em estudo conduzido por Carlie e Watkinson (1994).

O *Paecilomyces lilacinus*, como parasito de ovos de nematóides do gênero *Meloidogyne*, é considerado bom agente de controle biológico. Giraldo e Leguizamom (1996) também estudaram o efeito de *Paecilomyces* spp. no controle de ovos de *Meloidogyne* spp. em raízes de diversas espécies de plantas cucurbitáceas. Os autores observaram que, após 100 dias, ocorreu uma redução significativa da porcentagem de infecção das raízes das referidas plantas pelo nematóide.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-ixodídica dos fungos *Sporothrix insectorum*

e *Paecilomyces fumosoroseus*, em experimentos in vitro e por microscopia eletrônica de varredura, sobre as diferentes fases biológicas de *Boophilus microplus* (partenóginas, ovos e larvas).

2 Material e Métodos

2.1 Multiplicação e obtenção do inóculo

Placas de Petri (BDA), contendo os *S. insectorum* e *P. fumosoroseus*, após 10 a 12 dias do cultivo, receberam, à temperatura ambiente, 5,0 mL de água destilada esterilizada. Com auxílio de uma alça de Drigalsky, os esporos foram removidos, sendo as suspensões transferidas para Erlenmeyers esterilizados com capacidade de 250 mL, os quais foram estocados em geladeira a 4°C. A partir dessas suspensões estoque, foram preparadas suspensões de esporos em água destilada e esterilizada, mais o espalhante Tween 80 (1g/1L de água), nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL.

2.2 Obtenção e axenização de partenóginas, de ovos e de larvas de *B. microplus*

Os exemplares de *B. microplus* foram obtidos de animais naturalmente infestados. Parte das fêmeas ingurgitadas, colhidas e selecionadas após minucioso exame morfológico, foi empregada nos bioensaios in vitro e parte utilizada na manutenção da colônia de *B. microplus*. As fêmeas selecionadas foram axenizadas externamente, mergulhando-as em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por um minuto. Em seguida, foram transferidas para uma solução de tiosulfato de sódio a 1%, por 30 segundos, e lavadas por três vezes consecutivas em água destilada esterilizada. Os exemplares colhidos e axenizados foram mantidos em placas apropriadas, em câmara climatizada (BOD), à temperatura de 27°C, umidade relativa superior a 80% e fotoperíodo de 16 horas.

Após oviposição das carrapatos, os ovos foram pesados e distribuídos em placas de Petri, contendo ágar-água a 2%, e previamente identificadas (0,05g de ovos por placa). Para obtenção de larvas, 0,05g de ovos foram colocados em seringas esterilizadas adaptadas.

2.3 Delineamento experimental

Os testes foram realizados em duas etapas, com delineamento inteiramente casualizado, idênticos, para evitar contaminação cruzada entre os dois fungos. Em cada teste foram empregados cinco grupos tratamentos (concentrações fúngicas de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL), mais o grupo-controle, tratado apenas com o veículo das suspensões (água e uma gota de espalhante) e cinco repetições cada.

2.4 Bioensaio - partenóginas

As fêmeas ingurgitadas pertencentes às cinco repetições de cada tratamento (10 carrapatos por repe-

tição), foram banhadas, por imersão, com 10 mL de cada suspensão (*S. insectorum* ou *P. fumosoroseus*), durante cinco minutos. Em seguida, as carrapatos foram transferidas e fixadas individualmente em placas de Petri. Essas placas foram colocadas em condições favoráveis para o desenvolvimento do parasito e do patógeno em estufa tipo BOD, 27°C, umidade superior a 80% e fotoperíodo de 16 horas, por um período de 20 dias.

2.5 Bioensaio - ovos

Os ovos utilizados nos testes foram colhidos de fêmeas axenizadas que ovipuseram em condições assépticas. A seguir, foram transferidos para placas de Petri, onde cada tratamento com cinco repetições foram tratados com duas gotas de suspensão de esporos de *S. insectorum* e/ou *P. fumosoroseus* (conta-gotas), nas diferentes concentrações utilizadas e acondicionados em câmara climatizada como descrito no item anterior.

2.6 Bioensaio – larvas

As larvas empregadas nos ensaios, provenientes de ovos das fêmeas axenizadas, foram colocadas em seringas esterilizadas até eclosão. Em seguida, alíquotas de larvas vivas e ativas foram transferidas para envelopes confeccionados com papel de filtro, os quais foram selados por grampos. Foram adicionadas aos mesmos duas gotas de suspensão de diferentes concentrações de *S. insectorum* e/ou *P. fumosoroseus*, sendo cada concentração acondicionada em placa de Petri e incubadas como descrito no item anterior. Os envelopes foram abertos cinco dias após o tratamento, tempo necessário à ação do fungo (ALVES *et al.*, 1998).

A patogenicidade e reisolamento de *S. insectorum* e *P. fumosoroseus*, nos diferentes instares do *B. microplus*, após 25 dias do tratamento com as suspensões fúngicas foram avaliados e comparados com as culturas originais, segundo coloração e morfologia da colônia.

2.7 Estudo ao microscópio eletrônico de varredura sobre o modo de ação de *S. insectorum* e *P. fumosoroseus* e mecanismo de parasitismo dos fungos sobre os diferentes instares do *B. microplus*

Os ovos, as larvas e as partenóginas de *B. microplus*, após os respectivos períodos de incubação, foram examinados quanto à colonização pelos fungos. Os espécimens que se apresentaram parasitados foram fixados em glutaraldeído a 3% em tampão de fosfato de potássio a 0,05 M, pH 7,4 por 72 horas. Em seguida, foram lavados na solução tampão pura, por seis vezes consecutivas, com intervalo de 15 minutos e fixados em tetróxido de ósmio a 2%, no mesmo tampão. A seguir, foram novamente lavados, desidratados em uma série gradual de acetona, secos em secador de ponto crítico, montados em suportes, recobertos com 35 nm de ouro e elétron-micrografados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operando em 15 kV (MAIA e SANTOS, 1997).

2.8 Parâmetros Ixodológicos

Para a avaliação dos parâmetros ixodológicos, nos bioensaios com partenóginas, foi utilizada a equação (GONZALES *et al.*, 1993):

$$\% \text{ Redução de oviposição total} = \frac{\text{Peso médio da massa de ovos do grupo controle} - \text{Peso médio da massa de ovos do grupo tratado}}{\text{Peso médio da massa de ovos do grupo controle}} \times 100$$

Os percentuais de eclosão foram calculados por meio da contagem de cascas e ovos, oriundos de partenóginas e de ovos tratados, colhidas de todos os grupos e repetições experimentais.

A avaliação da redução do percentual de eclodibilidade dos ovos, submetidos ao *S. insectorum* e *P. fumosoroseus*, foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Percentual Eclodibilidade} = \frac{\text{Média da eclodibilidade do grupo de controle} - \text{Média da eclodibilidade do grupo tratado}}{\text{Média da eclodibilidade do grupo controle}} \times 100$$

A metodologia adotada para cálculo das percentagens de eficácia reprodutiva e de controle (eficácia) foi

a estabelecida por Drummond *et al.* (1973), por meio das seguintes variáveis:

$$\begin{aligned} \% \text{ Estimativa de Reprodução (ER)} &= \frac{\text{Peso dos ovos (g)}}{\text{Peso das fêmeas (g)}} \times \% \text{ Eclosão} \times 20000^* \\ \% \text{ de Controle ou de eficácia} &= \frac{\text{ER controle} - \text{ER tratado}}{\text{ER controle}} \times 100 \end{aligned}$$

A mortalidade das larvas foi determinada à partir de exame através de estereoscópio e contato com estilete.

Os dados ixodológicos foram avaliados pelo procedimento ANOVA (SAS, 1998) e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

3 Resultados e Discussão

Os resultados de redução de postura (Tabela 1) demonstraram que os fungos utilizados (*S. insectorum* e *P. fumosoroseus*) promoveram uma substancial redução na postura das partenóginas (50,19% e 49,34%, respectivamente), principalmente na concentração 10⁸ conídios/mL. Esses dados assemelham-se aos encontrados por Bittencourt (1992) que, testando *Metarhizium anisoplae* e *Beauveria basiana* (10⁸ conídios/mL) em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, observou elevada mortalidade em todos os estágios evolutivos.

Quando analisados estatisticamente, observou-se o efeito deletério dos fungos entomopatogênicos *S. insectorum* e *P. fumosoroseus* sobre a eclodibilidade dos ovos dos grupos das partenóginas tratadas e respectivos percentuais de eficácia (P<0,05). A concentração de 10⁸ conídios/mL foi melhor para o fungo *S. insectorum*, apresentando 82,99% de eficácia, enquanto que as outras concentrações (10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁹ conídios/mL)

apresentaram eficácia de 27,93%, 17,14%, 50,26%, 68,44%, respectivamente. Esta ação deletéria, do referido fungo, pode ser visualizada na Figura 1A, onde se observa uma completa colonização da partenógina.

Para o fungo *P. fumosoroseus*, a melhor eficácia, em partenóginas, foi alcançada na concentração de 10⁹ conídios/mL, que apresentou valor de 82,93%, enquanto que as concentrações de 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ conídios/mL apresentaram eficácia de 13,21%, 6,49%, 43,40%, 66,26%, respectivamente. A colonização da partenógina, pelo fungo, desencadeando uma lesão no tegumento, pode ser verificada na Figura 1 B - seta.

Esses dados contrastam com os resultados de Barc *et al.* (1999), para *Metarhizium anisoplae*, os quais demonstraram que tal fungo apresentou 40% de eficácia sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, na concentração de 10⁸ conídios/mL. Os autores concluem que o referido fungo, na concentração empregada, foi insuficiente no controle do ixodídeo em questão.

Os resultados de eclodibilidade e o percentual de redução de eclodibilidade dos ovos tratados com suspensões do *S. insectorum* e *P. fumosoroseus*, nas mesmas concentrações, são bastante divergentes entre si. O melhor percentual de redução de eclodibilidade significativa (P<0,05) (79,04%) foi apresentado pelo *P.*

Tabela 1 – Eficácia dos fungos *Sporothrix* e *Paecilomyces fumosoroseus* sobre partenóginas (*Boophilus microplus*), percentagens de redução de eclodibilidade dos ovos tratados, percentagens de mortalidade de larvas tratadas e suas respectivas comparações múltiplas (teste de Tukey) das médias.

Tratamentos (conídios/mL)	Eficácia (%)		Redução de Eclodibilidade (%)		Mortalidade das Larvas (% de Eficácia)	
	<i>S. insectorum</i>	<i>P. fumosoroseus</i>	<i>S. insectorum</i>	<i>P. fumosoroseus</i>	<i>S. insectorum</i>	<i>P. fumosoroseus</i>
Controle	-	-	-	-	-	-
10 ⁵	27,93 ^{ab}	13,21 ^{ab}	10,12 ^a	37,5 ^{abc}	88,46 ^b	38,46 ^{ab}
10 ⁶	17,14 ^{ab}	6,43 ^{ab}	20,62 ^{ab}	79,04 ^d	46,15 ^{ab}	26,92 ^{ab}
10 ⁷	50,26 ^{abc}	43,4 ^{ab}	37,92 ^{abc}	65,79 ^{cd}	65,38 ^{ab}	53,85 ^{ab}
10 ⁸	82,99 ^c	66,26 ^b	17,68 ^{ab}	54,31 ^{bcd}	61,54 ^{ab}	84,62 ^b
10 ⁹	68,44 ^{bc}	82,93 ^{ab}	25,08 ^{ab}	54,46 ^{bcd}	42,31 ^{ab}	69,23 ^{ab}

* As comparações múltiplas da Eficácias são calculadas sobre redução de postura e eclodibilidade dos ovos das partenóginas tratadas.

** Na comparações múltiplas, todos os controles são identificados por ^a

*** P < 0,05

^{*} - valor estimado do número de larvas oriunda de 1g de ovos de *Boophilus microplus*

fumosoroseus na concentração de 10^6 conídios/mL. Nas outras concentrações (10^5 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conídios/mL) não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos percentuais de redução de eclodibilidade (37,50%, 65,79%, 54,36%, 54,46%). Na Figura 1 D observa-se ovo parasitado pelo fungo e alterações sobre a camada externa, provavelmente causadas por enzimas.

O fungo *S. insectorum* apresentou melhor percentual de redução de eclodibilidade (37,92%), estatisticamente

significativa ($P < 0,05$), na concentração de 10^7 conídios/mL (Fig. 1 C), enquanto que nos outros tratamentos, os resultados obtidos foram de 10,12%, 20,62%, 17,68%, 25,08%, para as respectivas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^8 , 10^9 conídios/mL.

Em experimento conduzido por Fernandez *et al.* (2001), não foi encontrada diferença estatística sobre o percentual de eclosão de larvas de *B. microplus* oriundas de ovos tratados com diferentes isolados de *B.*

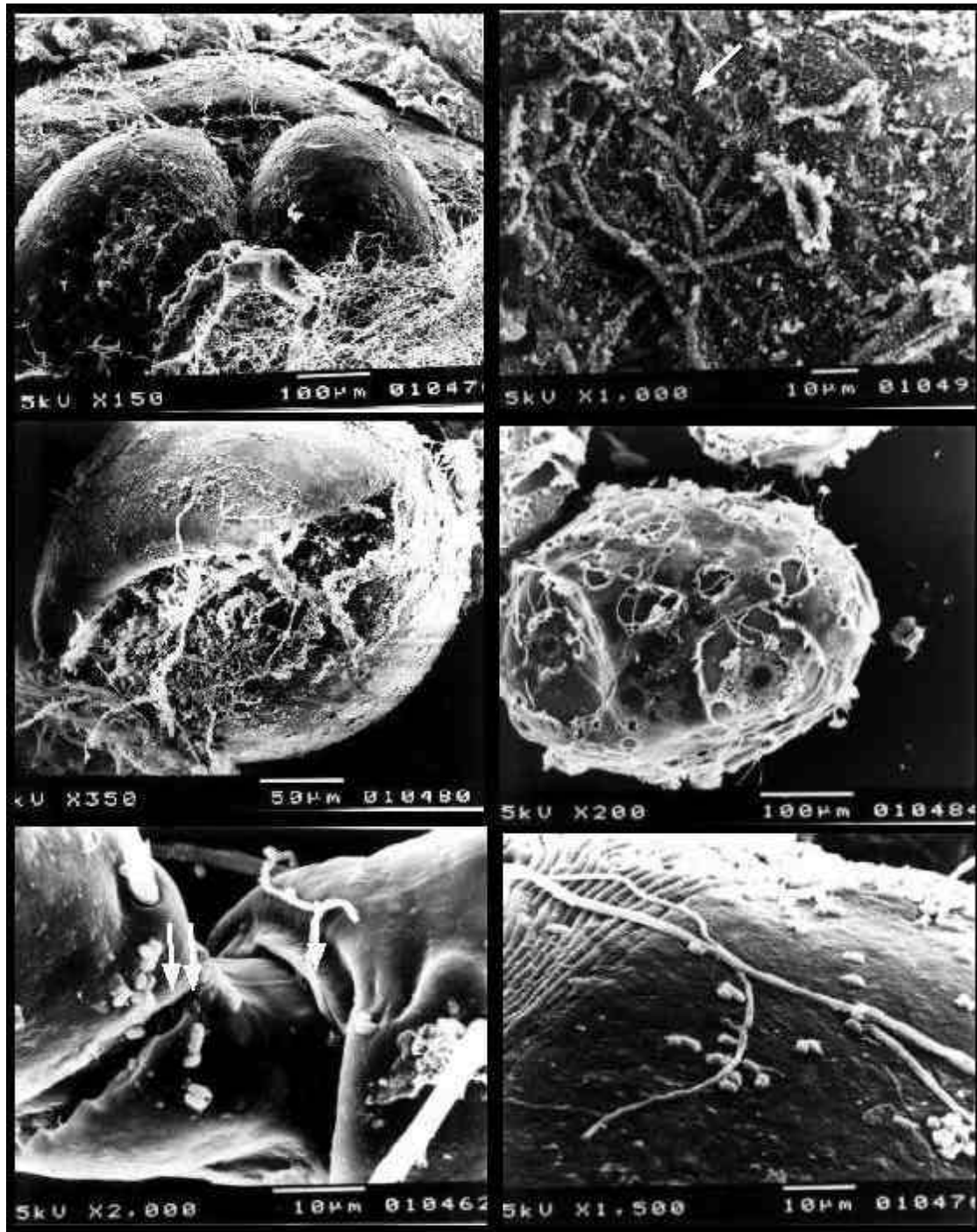


Figura 1 – Elétron-micrografias de varredura: A) Região labial da partenógina de *Boophilus microplus* predadas por *Sporothrix insectorum*, colonizada pelo fungo. B) Partenógina de *B. microplus* predado por *Paecilomyces fumosoroseus*, detalhe do tegumento colonizado pelo fungo, com rupturas (↓). C) Ovo de *B. microplus* predado por *S. insectorum*, rompimento da cutícula externa, e habitado por hifas. D) Ovo de *B. microplus* predado por *P. fumosoroseus*, detalhe do ovo com rupturas na camada externa (hifas sob a camada). E) Larva de *B. microplus* predado por *S. insectorum*, detalhe da hifas penetrando no interior da articulação (↓) e conídios aderidos ao trocater (↓↓). F) Hifas e conídios do fungo *P. fumosoroseus* colonizando a região dorsal da larva de *B. microplus*.

bassiana, comparado ao grupo controle. Os autores apenas ressaltam que foi bastante inferior.

As larvas de *B. microplus* tratadas com suspensões de conídios dos fungos *S. insectorum* e *P. fumosoroseus*, não apresentaram diferenças estatísticas na mortalidade ($P>0,05$), quando comparadas ao controle nas diferentes concentrações 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conídios/mL, de ambos os fungos. Observações mostraram que as larvas tratadas apresentaram uma diminuição de movimentos dos seus membros posteriores, ficando evidente sua ação prejudicial sobre a deambulação das referidas larvas (Fig.1 E e 1F).

4 Conclusões

Com base nos resultados apresentados nesta pesquisa, pode-se inferir:

- Sporothrix insectorum* e *Paecilomyces fumosoroseus* apresentaram ação deletéria sobre partenóginas de *B. Microplus*, in vitro.
- S. insectorum* apresentou 82,99% de eficácia no controle das partenóginas, em suspensões de 10^8 conídios/mL, enquanto *P. fumosoroseus* alcançou 82,93%, em suspensão de 10^9 conídios/mL.
- P. fumosoroseus* proporcionou uma maior redução da eclodibilidade de ovos de *B. microplus* (79,04%) do que *S. insectorum* (37,92%), quando utilizadas suspensões de 10^6 conídios/mL e 10^7 conídios/mL, respectivamente.
- A eficácia dos fungos sobre larvas de *B. microplus* foi de 84,62% e 88,46% (*P. fumosoroseus* e *S. insectorum*) nas suspensões de 10^8 e 10^5 conídios/mL, respectivamente.
- A microscopia eletrônica de varredura ilustra a ação dos fungos *S. insectorum* e *P. fumosoroseus* sobre os diferentes instares do *B. microplus*.

Portanto, com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que os fungos *Sporothrix insectorum* e *Paecilomyces fumosoroseus*, apresentaram ação deletéria in vitro sobre as diferentes fases do ciclo do *B. microplus*. O emprego desses fungos como agentes de biocontrole pode ser uma alternativa promissora no combate deste importante ácaro.

Referências Bibliográficas

- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In:_____. *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 637-710.
- ALVES, S. B.; VIEIRA, S.A.; SILVEIRA NETO, S. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para ovos do carrapato *Boophilus microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 24, 1993, Piracicaba. *Resumos...* Piracicaba [s.n.], 1993. p. 344.
- BARC, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; CORRÊA, R. R. Avaliação da eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado CB 103 sobre fêmea de *B. microplus*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador. *Resumos...* Salvador: CBPV, 1999. p. 73-74.
- BARROS, A. T. M.; EVANS, D. E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.9, n. 1-2, p. 17, 1989.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. *Ação do fungo Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887)*. 1992. 105f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.
- CARLIE, M. J.; WATKINSON, S. C. *The fungi*. London: Academic Press, 1994. p. 355-360.
- DRUMOND, R.O.; CRUST, S.F.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of inseticides. *Journal Economic Entomology*, College Park, v.66, p. 130-133, 1973.
- FERNANDES, É. K. K.; DA COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade de diferentes linhagens de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. em ovos de *Boophilus microplus* in vitro. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7, 2001, Poços de Caldas. *Resumos...* Poços de Caldas [s.n.], 2001. p. 353.
- GIRALDO, M.; LEGUIZAMOM, J.E. Biological control of *Meloidogyne* spp. Goeldi with the fungus *Paecilomyces* sp. Samson. in Luffa plants. *Fitopatologia Colombiana*, v.20, n.1-2, p. 20-25, 1996.
- GONZALES, J. C.; MUNIZ, R. A.; FARIAS, A.; GOLÇALVES, L. C. B.; REW, R. S. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.49, Amsterdam, p. 107-119, 1993.
- HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. *Boletim Defesa Sanitária Animal*, Brasília, v.17, 1983.
- MAIA, A. S.; SANTOS, J. M. dos. A SEM technique for preparing biological control agentes of nematodes in action. *Acta Microscopica*, Caracas, v.6, Supple., B, p. 550-551, 1997.
- ORDONEZ, G.; DAVID, H. *Sporothrix insectorum*: Biological control method of lace bug *Leptopharsa gibbicarina* in oil palm culture in latin America. (Hemiptera, Tingidae). *Bulletin de la Societe Entomologique de France*, Paris, v.98, n. 1. p. 77 – 85, 1993.
- PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. *Cadernos Técnicos de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.4, p. 3-65, 1990.
- ROCHA, U. F. *Biologia e controle biológico do carrapato Boophilus microplus. (CANESTRINI, 1887)*. Jaboticabal: FCAV, 1984. 32 p. (Boletim Técnico).
- SAS INSTITUTE. *User's guide: statistics*. Cary: 1998.
- VERRÍSSIMO, C.J. *Estudo da resistência e susceptibilidade do carrapato bovino (Boophilus microplus) em rebanho mestiço*, 1990. 163f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1990.