



**Avaliação de nematoides entomopatogênicos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE  
SÃO PAULO**  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA  
ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**Avaliação de nematoides entomopatogênicos para o controle do carrapato  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**

**ELIANAI RIBEIRO DE SOUZA**

Dissertação apresentada para a obtenção do título  
de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio Área de concentração:  
Segurança Biológica no Agronegócio.

SÃO PAULO  
2024

**ELIANAI RIBEIRO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DO  
CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação Área de concentração:  
Segurança Alimentar e Sanidade no  
Agronegócio

Área de concentração: Segurança  
Biológica no Agronegócio

Orientador (a): Professora Dra. Márcia  
Cristina Mendes

Co-orientador (a): Dra. Julie Giovanna  
Chacón Orozco

SÃO PAULO

2024

Eu **Elianai Ribeiro de Souza**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: *Elianai Ribeiro de Souza* Data: 14 / 06 / 24

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Secretaria de  
Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Núcleo de Informação  
e Documentação – IB**

---

Souza, Elianai Ribeiro de.

Avaliação de nematoides entomopatogênicos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). / Elianai Ribeiro de Souza. - São Paulo, 2024.

60 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024D.ES04

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós- Graduação. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema. Linha de pesquisa: Sanidade, gestão ambiental e qualidade de alimentos, produtos e processos na produção agropecuária sustentável.

Orientador: Márcia Cristina Mendes Coorientador: Julie Giovanna Chacón Orozco

Versão do título para o inglês: Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick (Acari: Ixodidae).

1. Carrapato bovino 2. NEPs 3. Controle biológico 4. *Steinernema*  
5. *Heterorhabditis* I. Souza, Elianai Ribeiro de II. Mendes, Márcia Cristina  
III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/04

---



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**  
**INSTITUTO BIOLÓGICO**



Pós-Graduação  
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252 Caixa Postal 12898  
CEP 04010-970 São Paulo – SP  
pg@biologico.sp.gov.br

Curso reconhecido de acordo com o disposto na Portaria MEC N°612- D.O.U.2 5/06/2007

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Nome:** Elianai Ribeiro de Souza

**Título:** Avaliação de nematoides entomopatogênicos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 06/ 05/2024

Banca Examinadora

Prof. Dr Márcia Cristina Mendes

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr José Eduardo Marcondes de Almeida

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr Weber Vilas Bôas Soares

Instituição: Instituto de Zootecnia

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu Deus, criador de todas as coisas e guardião da vida, e aos meus pais Ana e José, os quais são meus maiores exemplos de vida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão a **Deus**, o doador de toda a vida, por iluminar meus caminhos nas horas mais difíceis desse trajeto e por fortalecer-me durante os desafios. Além disso, desejo expressar minha sincera apreciação aos meus pais, **Ana Rodrigues** e **José Ribeiro**, por terem me transmitido os valores e princípios que norteiam a existência, Amo vocês.

A **Dra. Márcia Cristina Mendes**, minha orientadora, meu sincero agradecimento por sua orientação, paciência, compreensão, sabedoria e apoio inestimáveis. Os ensinamentos que recebi dela serão preciosos para toda a minha vida. Sou imensamente grata.

À minha coorientadora, **Dra. Julie Giovanna Chacón Orozco**, expresso minha profunda gratidão por seu apoio indispensável ao longo desta jornada. Serei eternamente grata.

Aos meus avós, **Josefa Ribeiro** e **Margarido Lima** que foram um exemplo de vida para mim, embora não esteja mais entre nós. Saudades, amo vocês.

Agradeço à pesquisadora, **Mra. Fernanda C. Duarte**, e a **Rogéria Torres** pela amizade, paciência, disposição e dedicação ao longo deste trabalho. Vocês foram essenciais para a conclusão desta etapa.

Ao meu sobrinho **Cleyton Ribeiro**, à **Noemy Ribeiro** e à pequena **Cecília Ribeiro**, expresso minha profunda gratidão pelo constante incentivo, apoio e alegria que me proporcionaram durante os momentos mais turbulentos, além da disposição para ouvir minhas queixas, Amo vocês.

Ao meu irmão **Daniel Ribeiro** e minha cunhada **Patrícia Rodrigues** por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis. Amo vocês.

Agradeço à minha irmã **Maria Lúcia Ribeiro**, ao meu cunhado **Damião Sousa** e à minha sobrinha **Natalya Sousa** por estarem sempre presentes em minha vida.

A minha adorável companheira de quatro patas, **Shelby**, obrigada por alegrar meus dias. Amo você.

Aos meus **familiares e amigos** que me incentivaram, apoiaram, compartilharam minhas alegrias e angústias, e estiveram sempre prontos para me auxiliar em qualquer necessidade, expresso minha profunda gratidão.

Agradeço imensamente a **Isabella Barboza, Karina Araújo e Lais Torres** por toda a ajuda prestada durante o desenvolvimento deste projeto. A colaboração de vocês foi fundamental para a conclusão do mesmo. Quero expressar minha gratidão não apenas pelas orientações e apoio, mas também pelas risadas, conversas e pela presença constante em um momento tão crucial da minha vida. Vocês são incríveis.

Aos meus colegas de pós-graduação **Thais Araújo, Deborah Romano, Caroline Gambini, Lucas Mello e Anderson Sant'ana**, expresso minha sincera gratidão por tudo: pelas risadas compartilhadas, pelo apoio mútuo, pelas conversas, pelos momentos de surto e por estarem comigo nessa jornada. Vocês são incríveis.

Aos estagiários **Guilherme e André**, obrigada por ajudarem nos experimentos, pelas conversas e risadas.

Agradeço imensamente às minhas companheiras de trabalho **Brysa Cavalcante e Isabella Torres** por me suportarem diariamente, pelas nossas conversas e risadas. Nossa amizade é algo que levarei para toda a vida.

Ao pessoal do laboratório **Lisa**, obrigado por cederem o espaço para testes, e um agradecimento especial para **Luara Cassiano** pela colaboração e pelos ensinamentos.

Ao **Instituto Biológico** e a todos os **docentes e palestrantes** da pós-graduação, expresso minha gratidão por compartilharem seus conhecimentos e experiências. Esta jornada foi repleta de novos aprendizados e desafios.

Agradeço imensamente a todos os **funcionários e alunos** do laboratório de **Controle Biológico** do Instituto Biológico de Campinas – SP, pela calorosa recepção e pela generosa contribuição fornecida para este projeto, através do fornecimento do material utilizado.

Aos **funcionários da limpeza e porteiros do Instituto Biológico**, por cada bom dia, sorrisos e brincadeiras.



*“Existem coisas melhores adiante do que  
qualquer outra que deixamos para trás.”*

*(C.S. Lewis)*

## RESUMO

SOUZA, Elianai Ribeiro. **Avaliação de nematoides entomopatogênicos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)** 2024. 60 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

Um dos entraves da bovinocultura nacional está relacionado com o ectoparasito *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que acarreta perdas anuais estimadas em US\$ 3,24 bilhões. Os prejuízos são decorrentes da espoliação sanguínea, irritabilidade no local da fixação do parasito, danos ao couro, inoculação de toxinas e transmissão dos agentes patogênicos. O tratamento químico é a principal abordagem para controlar este carrapato em bovinos. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) tem se destacado como agentes de controle biológico de pragas agrícolas e tem sido introduzido no combate de parasitas de importância veterinária. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar ação patogênica dos NEPs sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* em condições laboratoriais, em condições simuladas de campo e analisar as alterações os efeitos dos NEPs por meio de técnicas histológicas. Foram testados sete isolados de NEPs, *Heterorhabditis bacteriophora* (HB EN01), *Heterorhabditis amazonensis* (IBCB n10 e IBCB n24), *Steinernema rarum* (PAM 25), *Steinernema carpocapsae* (All), *Steinernema brazilense* (IBCB n6) e *Steinernema feltiae* (IBCB n47), em diferentes concentrações 100, 200 e 300 juvenis por fêmea (JIs/fêmea) com 15 fêmeas (coletadas de bovinos leiteiros) por unidade experimental. Os isolados (HB EN01) *Heterorahbditis bacteriophora* e (PAM 25) *Steinernema rarum* foram selecionados para experimentos adicionais em substrato terra, mediante três técnicas de aplicação dos NEPs na concentração de 200 JIs/fêmea. 1) as fêmeas ingurgitadas foram dispostas sobre o substrato e em seguida aplicada a suspensão (F+S); 2) a suspensão foi aplicada 10 minutos antes da disposição das fêmeas (S+F) e 3) as fêmeas foram colocadas em sacos com tecido de filó (M). Para o experimento em condições simuladas de campo em área externa, cada unidade experimental foi representada por uma bandeja, contendo substrato, gramíneas (*Brachiara decumbens*) e 10 fêmeas ingurgitadas. Em cada bandeja foi inoculada com 220 mL de suspensão de NEPs (tratamento HB EN01 e PAM 25) na concentração de 200 JIs/fêmea. O processo histológico foi realizado com as fêmeas de carrapato infectadas com o nematoide que mostrou maior eficácia. Dos sete isolados de NEPs testados *in vitro* sobre fêmeas ingurgitadas duas delas, PAM 25 e HB EN01, mostraram-se eficazes nas concentrações de

100, 200 e 300 JIs/fêmea com porcentagem de eficácia acima de 80%. Os isolados PAM 25 e HB EN01 testados em substrato terra na dosagem de 200 jis/fêmea, nas três técnicas de tratamentos, apresentaram eficácia acima de 70%. O teste realizado em condições simuladas de campo mostrou eficácia com base na eclodibilidade das larvas apresentando porcentagens de 34,9% para o isolado HB EN01 e 44,6% para PAM 25. As análises histológicas indicaram alterações nos ovócitos das fêmeas tratadas com o isolado HB EN01 a partir do quarto dia de tratamento. Esses resultados sinalizam o potencial dos NEPs como agentes biocarrapaticidas promissores.

**Palavras chaves:** Carrapato bovino, NEPs, controle biológico, *Steinernema*, *Heterorhabditis*.

## ABSTRACT

**Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick (Acari: Ixodidae) 2024.** Dissertation (Master's in Health, Food Safety, and Environmental Management in Agribusiness) – Biological Institute, São Paulo Agribusiness Technology Agency, Department of Agriculture and Supply of the State of São Paulo, São Paulo, 2024.

One of the obstacles in national cattle farming is related to the ectoparasite *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, which causes annual losses estimated at US\$ 3.24 billion. The losses result from blood spoliation, irritability at the parasite attachment site, damage to the skin, inoculation of toxins, and transmission of pathogens. Chemical treatment is the main approach to control this tick in cattle. Entomopathogenic nematodes (EPNs) have emerged as biological control agents of agricultural pests and have been introduced in combating parasites of veterinary importance. Thus, the aim of this study was to evaluate the pathogenic action of EPNs on engorged females of the *R. microplus* tick under laboratory conditions, simulated field conditions, and through histological techniques. Seven EPNs isolates were tested: *Heterorhabditis bacteriophora* (HB EN01), *Heterorhabditis amazonensis* (IBCB n10 and IBCB n24), *Steinernema rarum* (PAM 25), *Steinernema carpocapsae* (All), *Steinernema brazilense* (IBCB n6), and *Steinernema feltiae* (IBCB n47), at different concentrations (100, 200, and 300 juveniles per female [JIs/female]) with 15 females (collected from dairy cattle) per experimental unit. The isolates HB EN01 (*Heterorahbditis bacteriophora*) and PAM 25 (*Steinernema rarum*) were selected for additional experiments in soil substrate, using three application techniques of EPNs at a concentration of 200 JIs/female. 1) Engorged females were placed on the substrate, followed by the application of the suspension (F+S); 2) the suspension was applied 10 minutes before placing the females (S+F); and 3) the females were placed in bags with cheesecloth (M). For the simulated field conditions experiment, each experimental unit was represented by a tray containing substrate, grass (*Brachiaria decumbens*), and 10 engorged females. Each tray was inoculated with 220 mL of EPN suspension (treatment with HB EN01 and PAM 25) at a concentration of 200 JIs/female. Histological analysis was performed on tick females infected with the nematode that showed the highest efficacy. Of the seven EPNs isolates tested in vitro on engorged females, two of them, PAM 25 and HB EN01, proved to be effective at concentrations of 100, 200, and 300 JIs/female, with efficacy percentages above 80%. The PAM 25 and

HB EN01 isolates tested in soil substrate at a dosage of 200 JIs/female, using the three treatment techniques, showed efficacy above 70%. The test conducted under simulated field conditions showed efficacy based on larval hatching, with percentages of 34.9% for the HB EN01 isolate and 44.6% for PAM 25. Histological analyses indicated alterations in the oocytes of females treated with the HB EN01 isolate from the fourth day of treatment. These results indicate the potential of EPNs as promising bioacaricide agents.

Keywords: Bovine tick, EPNs, biological control, *Steinernema*, *Heterorhabditis*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Morfologia de <i>R.microplus</i> . A- Macho, vista ventral; B: Macho, vista dorsal de; C: Fêmea, vista ventral; D: Fêmea, vista dorsal	24
Figura 2- Representação do ciclo de vida do carrapato <i>R.microplus</i>	25
Figura 3- Representação do ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos	28
Figura 4- Representação ilustrada do teste <i>in vitro</i> para avaliar a eficácia dos isolados descritos na tabela 1 em fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	34
Figura 5- Representação ilustrada do teste <i>in vitro</i> com substrato para avaliar a eficácia do <i>S. rarum</i> (PAM 25) e <i>H.bacteriophora</i> (HB EN01) em fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	35
Figura 6- Experimento em condições simuladas de campo para avaliar o efeito do <i>S. rarum</i> (PAM 25) e <i>H.bacteriophora</i> (HB EN01) em fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	36
Figura 7- Média da Porcentagem de Inibição de Postura e Eficácia dos isolados de nematoides na concentração de 100 JIs/fêmea testados com o carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	42
Figura 8- Média da Porcentagem de Inibição de Postura e Eficácia dos isolados de nematoides na concentração de 200 JIs/fêmea testados com o carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	42
Figura 9- Média da Porcentagem de Inibição de Postura e Eficácia dos isolados de nematoides na concentração de 300JIs/fêmea testados com o carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	43
Figura 10- Percentual médio da inibição de postura e eficácia do produto - teste com substrato terra isolado (PAM 25) <i>Steinernema rarum</i> testado com o carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	44
Figura 11- Percentual médio da inibição de postura e eficácia do produto - teste com substrato terra isolado (HB EN01) <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> testados com o carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	44
Figura 12- Aspecto morfológico e coloração das fêmeas ingurgitadas com 4° e 14° dias após tratamento (água, HB EN01 e PAM 25) A: controle no 4° dia; B: controle no 14° dia; C: HB EN01 no 4° dia; D: HB EN01 no 14° dia; E: PAM 25 no 4° dia; F: PAM 25 no 14° dia	45
Figura 13- Gráfico da temperatura e umidade do experimento em condições simuladas de campo no período de março a abril	46
Figura 14 – Gráfico de quantificação de larvas coletadas em unidades amostrais em condições simuladas de campo	47

Figura 15- Gráfico da média de larvas recuperadas ao final de experimento em condições simuladas de campo.....47

Figura 16- Cortes histológicos de fêmeas de *R. microplus* do teste *in vitro* do grupo controle corados com hematoxilina e eosina. As estruturas em destaques mostram o ovário (ov) dentro do círculo, a seta está indicando o granulo de vitelo (gv) e cório (ch). Todas estruturas integras.....49

Figura 17- Cortes histológicos de fêmeas de *R. microplus* do teste *in vitro* do grupo tratado com (HB EN01) no 4º dia corados com hematoxilina e eosina. No interior dos círculos está evidenciando o rompimento do granulo de vitelo (gv) e cório (ch).....49

Figura 18- Cortes histológicos de fêmeas de *R. microplus* do teste *in vitro* do grupo tratado com HB EN01 no 5º dia corados com hematoxilina e eosina. No interior do círculo está evidenciando o rompimento do granulo de vitelo (gv) e cório (ch).....50

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, modificado segundo Michalany (1990).

Quadro 2- Protocolo de cortes de tecido e coloração das lâminas modificado segundo Michalany (1990).



## LISTA DE E SIGLAS SÍMBOLOS

**ANOVA**-Análise de variância

**B.O.D**- Estufa incubadora- Demanda Bioquímica de Oxigênio

**C**- Controle

**ch**- Corio

**gv** - Grânulos de vitelo

**h**- Horas

**Ip**- Inibição de postura

**IR**- Índice reprodutivo

**J1**- Juvenil de primeiro instar

**J2** - Juvenil de segundo instar

**J3** - Juvenil de terceiro instar ou Juvenis infectantes

**J4** - Juvenil de quarto instar

**JIs**- Juvenis infectantes

**Kg**-Quilograma

**M**- Marcador voal

**ml**- Mililitros

**NEPs**- Nematoides entomopatogênicos

**o** – Ovário

**ov**- Ovócito

**UR** - Umidade relativa

**US\$** - Dólar

**HB EN01** – Isolado de *Heterorhabditis bacteriophora*

**IBCB n02** - Isolado de *Steinernema carpocapsae*

**IBCB n6** - Isolado de *Heterorhabditis bacteriophora*

**IBCB n10** – Isolado de *Heterorhabditis amazonensis*

**IBCB n24** - Isolado de *Heterorhabditis amazonensis*

**IBCB n47** - Isolado de *Steinernema feltiae*

**PAM 25** - Isolado de *Steinernema rarum*

**F+S** – Fêmea mais suspensão

**S+F** - Suspensão mais fêmea  
**M** – Marcador  
**ONU** – Organização das nações unidas  
**ODS** – Objetivo de desenvolvimento sustentável  
**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono  
**UV** – Radiação ultravioleta  
**PH** – Potencial hidrogênico  
**HP88** - Isolado de *Heterorhabditis bacteriophora*  
**LPP1** - Isolado de *Heterorhabditis indica*  
**LPP30** - Isolado de *Heterorhabditis bacteriophora*  
**LPP7** - Isolado de *Heterorhabditis baujardi*  
**°C** – Grau Celsius  
**P** – Peso dos ovos e das fêmeas  
**IP** – Inibição de postura  
**RE** – Reprodução esperada  
**EP** - Eficácia do produto  
**cm** – centímetros  
**min** – Minutos  
**kg** – Kilogramas  
**°** - Grau  
**'** – Minuto  
**"** – Segundo  
**S** – Sul  
**W** – Oeste  
**x** – Por  
**%** - Porcentagem  
**±** - Mais ou Menos  
**E/larval %** - Eclosão larval  
**P** – Peso  
**p>** - Valor maior que 0,05  
**p<** - Valor menor que 0,05  
**µm** – micrometro

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	Geral.....	22
2.2	Específicos .....	22
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
3.1	Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	23
3.1.1	Ciclo do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	24
3.1.2	Importância do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ....	25
3.2	Nematoides Entomopatogênicos (NEPs).....	26
3.2.1	Ciclo de vida dos Nematoides.....	26
3.2.2	Fatores bióticos e abióticos que afetam os nematoides entomopatogênicos (NEPs) .....	28
3.2.3	NEPs no controle de pragas agrícolas.....	29
3.2.4	NEPs no controle de carrapatos .....	30
3.2.5	NEPs no controle de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1	Local do experimento .....	31
4.2	Procedência das cepas do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	32
4.3	Isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) .....	32
4.4	Avaliação <i>in vitro</i> para seleção de dose ideal de NEPs .....	32
4.5	Avaliação <i>in vitro</i> em substrato terra .....	34
4.6	Experimento em condições simuladas de campo.....	36
4.7	Histologia.....	37
4.7.1	Processo de fixação .....	37
4.7.2	Processo de Desidratação e Diafanização .....	37

4.7.3	Emblocamento .....	38
4.7.4	Corte e coloração das lâminas.....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1	Avaliação <i>in vitro</i> para seleção de dose ideal de NEPs .....	39
5.2	Avaliação <i>in vitro</i> em substrato terra.....	43
5.3	Experimento em condições simuladas de campo.....	45
5.4	Histologia.....	48
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes que se caracterizam pelo o processo de hematofagia no hospedeiro e, em função disso, podem ser vetores de agentes infecciosos para humanos e animais, causando danos à saúde pública além de prejuízos econômicos (RODRIGUES et al., 2022).

Algumas espécies da família Ixodidae são de grande importância veterinária dentre eles, a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, mas que pode ser encontrado, quando em alta infestação, em equinos, ovinos e cervídeos desde que compartilhem do mesmo ambiente que os bovinos (VERÍSSIMO et al., 1997, ANDREOTTI et al., 2015).

Na região sudeste do Brasil este parasito ocorre ao longo de todo o ano, fato este que prejudica diretamente os animais causando estresse, anemia, interferindo na redução da produção de leite e carne, além de transmitir agentes patogênicos para os bovinos (ANDREOTTI et al., 2019). O controle deste ectoparasito tem historicamente realizado por meio do tratamento de bovinos com carrapaticidas químicos, sendo essa a abordagem principal até o momento. No entanto, há registro da resistência deste carrapato a maioria princípios ativos utilizados como carrapaticidas, com exceção do grupo isoxazolinas que estão disponíveis no mercado desde 2022 (HIGA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2023). O uso constante e, muitas vezes de forma indiscriminada, de carrapaticidas pode resultar resíduos na carne e leite. Infelizmente, o Brasil apresentou um número de embargos à exportação devido à presença de resíduos químicos em carnes e subprodutos nos últimos anos (RATH et al., 2016).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2023) os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) da agenda 2030, em específico o ODS 12 que é “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”, visa alcançar o manejo ambiental saudável minimizando a presença resíduos químicos e seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente”. Diante disso, o Brasil tem desenvolvido programas de pesquisas voltados para o controle biológico de pragas agrícolas com resultados promissores e, seguindo essa mesma linha, a área de sanidade animal tem trabalhado com o manejo integrado de pragas com ênfase na utilização de produtos biológicos com a finalidade de minimizar o uso de produtos químicos na produção animal, que no ano de 2022 10,3 bilhões de dólares foram gasto para a saúde animal, 25% foram destinados aos produtos biológicos (SINDAN, 2022).

Nesse sentido, torna-se patente a necessidade de investimentos na pesquisa a respeito do uso de agentes de controle biológico na sanidade animal para garantir a credibilidade dos produtos brasileiros no mercado internacional favorecendo a exportação de produtos de origem animal. Nos últimos anos, o controle biológico tem experimentado um notável aumento, tanto em escala internacional quanto nacional. Pesquisas

Este estudo apresenta dados *in vitro* e em condições simuladas de campo que demonstram a eficácia de nematoides entomopatogênicos para o controle do *R. microplus* sendo referências para o desenvolvimento de um biocarrapaticida.

## **2 OBJETIVOS**

### 2.1 Geral

- Avaliar a virulência de nematoides entomopatogênicos (NEPs) sobre o carrapato *R. microplus*.

### 2.2 Específicos

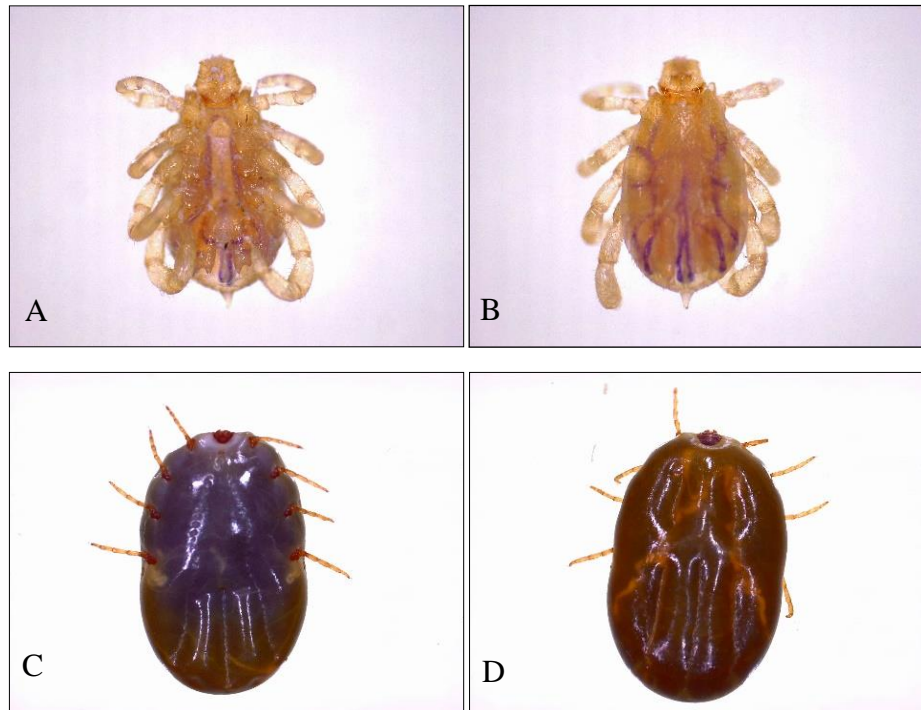
- Avaliar *in vitro* a virulência de sete isolados em diferentes concentrações sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*;
- Avaliar *in vitro* em substrato terra os NEPs que se mostrarem eficazes no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*;
- Avaliar a virulência dos NEPs que se mostrarem eficazes no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições simuladas de campo.
- Analisar os efeitos dos NEPs nas estruturas reprodutivas das fêmeas ingurgitadas utilizando técnicas histológicas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Carrapato *R. microplus*

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas pertencentes a classe Arachnida e que se caracteriza pela hematofagia independente da família, classe ou gênero (BARROS-BATTESTI et al., 2006). A sua morfologia consiste em quatro pares de pernas (exceto na fase larval que apresentam, apenas três pares de pernas), na presença de quelíceras e pedipalpos, na ausência de antenas e asas, e corpo e abdome fundidos (ANDREOTTI et al., 2016). Foram relatadas mais de 950 espécies de carrapatos no mundo, distribuídas nas famílias Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae e Deinocrotonidae, sendo esta última já extinta (GUGLIELMONE et al., 2010; NAVA et al., 2017; PENÁLVER et al. 2022).

No Brasil existe aproximadamente 80 espécies de carrapatos divididos em cinco gêneros, dentre eles: *Amblyomma*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor*. O gênero *Amblyomma* é o que apresenta maior diversidade de espécies (KRAWCZAK et al., 2015; LABRUNA et al., 2016; WOLF et al., 2016; MICHEL et al., 2017). Dentre os gêneros citados, o carrapato de maior importância econômica é o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888)* popularmente conhecido no Brasil como carrapato-do-boi (Figura 1). Este carrapato possui vasta distribuição geográfica em regiões tropicais e subtropicais. Eles se caracterizam por possuírem escudo de cor avermelhada, palpos curtos, espessos e angulosos, hipostômio com duas séries de dentes de cada lado e apêndice caudal.



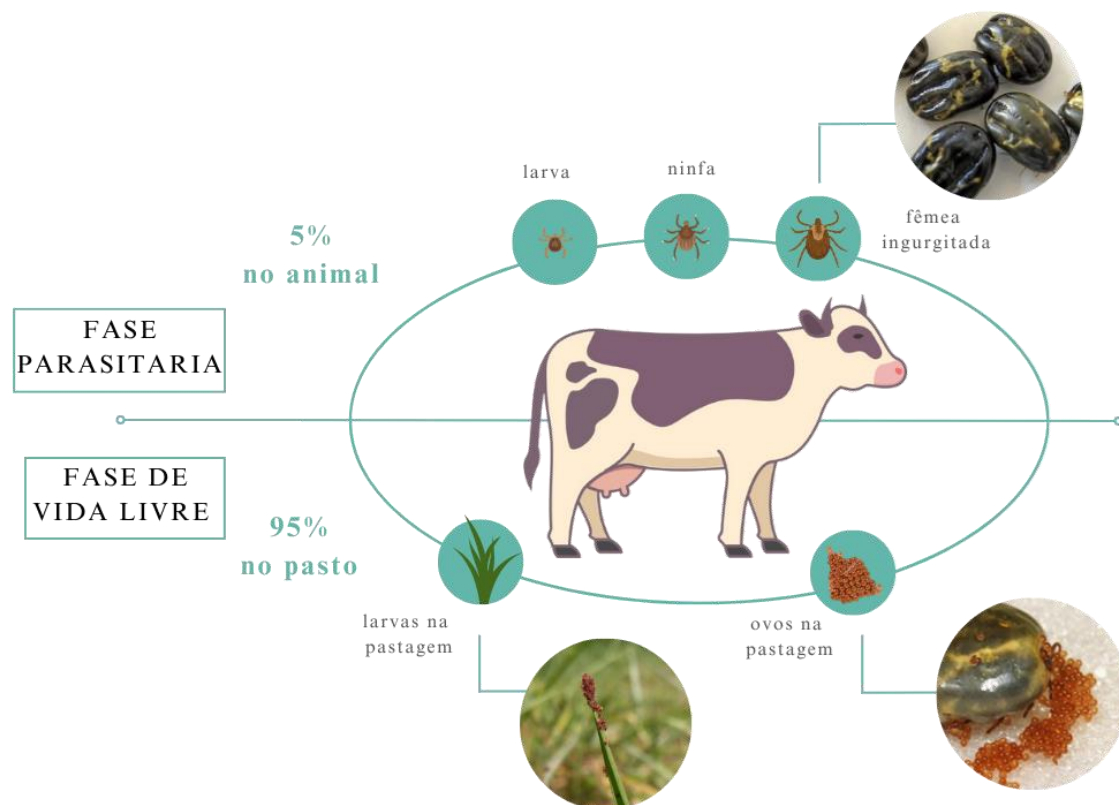
**Figura 1.** Carrapatos adultos *R. microplus*. A: Vista ventral de um macho; B: Vista dorsal de um macho; C: Vista ventral de uma fêmea ingurgitada; D: Vista dorsal de uma fêmea ingurgitada.  
**Fonte:** Morán (2023)

### 3.1.1 Ciclo do Carrapato *R. microplus*

Este parasita tem o ciclo monoxeno, ou seja, precisa de apenas um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida, tem preferência por bovinos, mas pode parasitar outros animais como: equinos, ovinos e até mesmo cervídeos (VERÍSSIMO et al., 1997). Seu desenvolvimento é dividido em duas fases: fase não parasitária que ocorre no pasto e se inicia com o desprendimento das fêmeas ingurgitadas (teleóginas) do hospedeiro, logo após, essas teleóginas caem ao solo onde ocorre a postura dos ovos e eclosão das larvas, a fase parasitária inicia-se com a fixação larval no hospedeiro onde se desenvolvem até o estágio adulto (FURLONG, 2002).

Em condições favoráveis, altas temperatura e umidade, as fêmeas podem produzir cerca de 2.000 a 3.000 ovos aproximadamente e o período de postura pode variar de duas a três semanas e de 21 a 30 dias até a eclosão das larvas. Essas larvas sobem no capim e se aglomeram à procura de um novo hospedeiro, elas são atraídas pelo CO<sub>2</sub> e pela temperatura dos animais (Figura 2) (RODRIGUES, 2023).





**Figura 2.** Representação do ciclo de vida do carrapato *R. microplus*. **Fonte:** Torres (2023)

### 3.1.2 Importância do carrapato *R. microplus*

Este carrapato é de grande relevância para a pecuária mundial e nacional, pois causa perdas econômicas no setor agropecuário, além de transmitir agentes etiológicos da “tristeza parasitária bovina”, doença causada por bactérias do gênero *Anaplasma* e protozoários do gênero *Babesia* (GUGLIELMONE et al., 2006). Tais doenças podem interferir no desempenho do bovino por intermédio da perda de peso, diminuição do leite e falta de apetite, e morte (ANDREOTTI et al., 2011; KLAFKE et al., 2017; KLAFKE et al., 2017). O carrapato *R. microplus* pode gerar 3,24 bilhões de prejuízo anual entre gastos diretos e indiretos (GRISI et al., 2014).

Um dos principais métodos de controle deste carrapato é realizado por meio de aplicações de produtos químicos nos bovinos, entretanto o uso constante de carrapaticidas leva a seleção de cepas resistentes (KOLLER et al., 2019). O uso desordenado desses carrapaticidas pode acelerar a resistência e causar a intoxicação dos animais, contaminar meio ambiente além disso pode acumular resíduos no leite e na carne (HIGA et al., 2015; KLAFKE et al., 2010; CASTRO-JANER et al., 2010). Um dos primeiros registros de resistência dos carrapatos aos acaricidas, se deu por volta da

década de 1950 com o grupo do arsênios, e posteriormente outras classes de produtos químicos (GEORGE et al.,2004). Dessa forma, para a redução do uso de carrapaticidas pesquisas com agentes de controle biológico como fungos, bactérias e nematoides, estão sendo conduzidos a fim de se obter um produto para o controle biológico do carrapato *R. microplus* (BARBOZA et al.,2022).

### **3.2 Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)**

Os (NEPs) são organismos benéficos utilizados no controle biológico de pragas na agricultura e na pecuária. Esses nematoides carregam essa nomenclatura devido as infecções que causam a morte aos seus hospedeiros (DOLONSKI et al., 2017). Tais organismos possuem uma diversidade de espécies que podem ser encontradas mundialmente, mostrando que estes organismos são potenciais agentes de controle biológico para o combate de pragas. A produção em escala comercial desses nematoides já e realizada em vários países (MONTEIRO & PRATA, 2013). Atualmente no Brasil, duas espécies são comercializadas (*Steinernema capcocapsae* e *Steinernema rarum*), mas somente uma (*Steinernema rarum*) é produzida no país por meio de fermentação bifásica líquida e sólida (LEITE et al., 2023).

Os NEPs pertencem ao filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida na qual estão inseridas as seguintes famílias Steinernematidae Chitwood e Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar (1976). A família Steinernematidae é composta por dois gêneros, o *Steinernema* (61 espécies) e *Neosteinernema* (1 espécie). A família Heterorhabditidae é constituída por um único gênero, *Heterorhabditis* com 22 espécies. (FERRAZ, 1998; GREWAL et al., 2003; DOLINSKI, 2006).

Os NEPs *Steinernema* e *Heterorhabditis* agem em simbiose com as bactérias dos respectivos gêneros *Xenorhabdus* e *Photoharbodus*, tais bactérias tem efeito patogênico quando inseridas no organismo do hospedeiro causando septicemia e conseqüentemente a morte do hospedeiro em um período de 24 a 48 horas (FERRAZ, 1998; GREWAL et al., 2001, HAZIR et al., 2003).

#### **3.2.1 Ciclo de vida dos Nematoides**

O ciclo de desenvolvimento dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) ocorre em três fases distintas: ovo, juvenil e adultos no interior de um hospedeiro (Figura 3). A fase juvenil é formada por 4 estágios; J1, J2, J3 (estágio infectante) e J4. No ambiente a

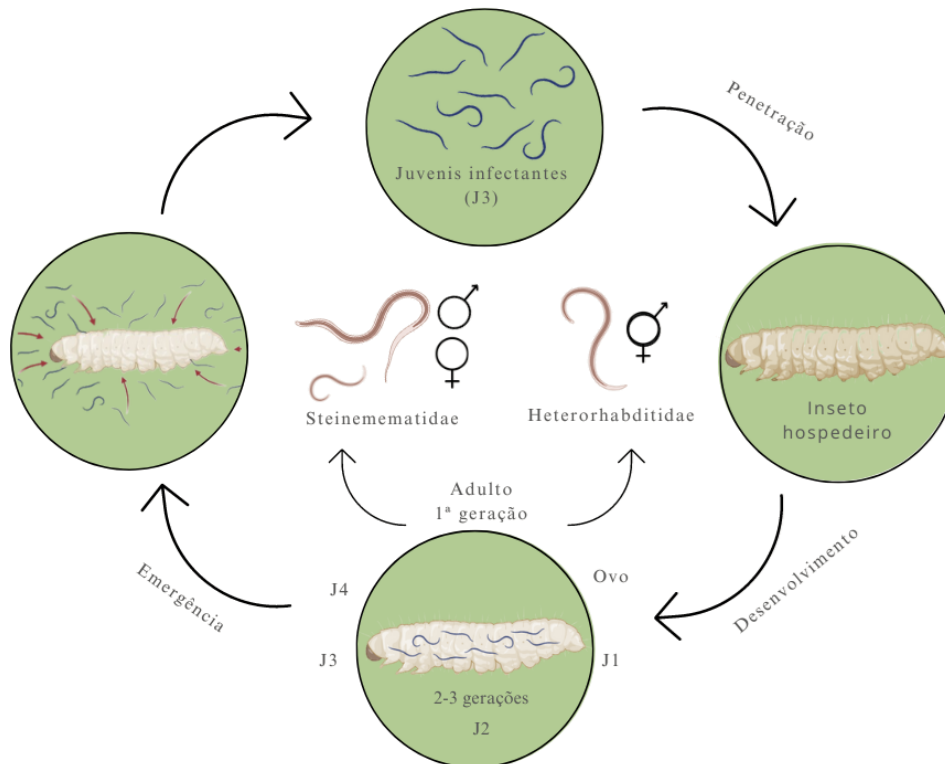
procura de hospedeiros, são encontrados os nematoides no estágio infectante (JIs) os hospedeiros são detectados pelos produtos de excreção, níveis CO<sub>2</sub> e gradientes de temperatura por eles liberados. Em seguida esses juvenis entram pelos orifícios naturais (boca, ânus e espiráculo) do inseto e se movem para hemocele (FERRAZ, 1998; DOLINSKI et al., 2005; DOLINSKI & MOINO-JR, 2006).

No interior do hospedeiro (na hemocele) os JIs liberam suas bactérias simbiotes que se proliferam e produzem toxinas que causam a morte do inseto (FERRAZ, 1998; HAZIR et al., 2003). Além disso, essas bactérias liberadas produzem substâncias que inibem o crescimento de outros microorganismos oportunistas favorecendo o aumento populacional dessas espécies dentro do hospedeiro colonizado, essas mesmas bactérias são fonte de alimento para os JIs que passarão para o estágio J4 e posteriormente se tornarão adultos (macho e fêmea) que em alguns hospedeiros se reproduzirão e darão origem a próxima geração.

Pode haver de duas a três gerações completadas pelos nematoides dentro do mesmo hospedeiro, depende do tamanho do inseto colonizado e do fornecimento de alimento na parte interna do cadáver. Assim que esse alimento é esgotado os JIs fazem a retenção das bactérias e vão em busca de um novo hospedeiro (FERRAZ, 1998; GREWAL et al., 2003; DOLINSKI, 2006).

O ciclo desses NEPs é semelhante em ambos gêneros, entretanto as espécies do gênero *Heterorhabditis* possuem morfologicamente uma projeção quitinosa chamado de “dente” que tem como função perfurar a cutícula do hospedeiro que se encontra na extremidade anterior do nematoide. Especificamente nesse gênero também ocorre hermafroditismo na primeira geração, ao invés de machos e fêmeas copularem, os mesmos fazem a autofecundação, e ainda no interior do mesmo hospedeiro produzem ovos que se tornarão juvenis, e assim nasce uma segunda geração cujos os nematoides são denominados de anfimíticos macho e fêmeas. Esses, após a cópula, dão origem novamente a ovos e juvenis, estes se alimentam do resto do inseto cadáver e assim vão em busca de um novo hospedeiro, fechando o ciclo (ADAMS; NGUYEN, 2002).

A permanência dos juvenis no solo à procura de um hospedeiro varia entre dias ou meses, isso ocorre devido ao um inédito mecanismo de sobrevivência. Assim que saem do cadáver infectado vão em direção ao solo, os mesmos conservam a cutícula do estágio J2, permanecendo com duas cutículas, o que favorece sua conservação por um período maior (KAYA, 1990).



**Figura 3.** Representação do ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos. **Fonte:** Torres (2023)

### 3.2.2 Fatores bióticos e abióticos que afetam os nematoides entomopatogênicos (NEPs)

No meio ambiente, vários fatores bióticos e abióticos podem interferir negativamente na sobrevivência dos JIs, e com isso, pode limitar o uso dos NEPs no controle de pragas. Dentre esses fatores estão a radiação ultravioleta (UV), alta temperatura, umidade baixa, textura e pH do solo, presença de pesticidas, dentre outros. Para contornar esses efeitos negativos, aconselha-se que a aplicação dos mesmos seja realizada no período da tarde ou pela manhã, para que se tenha uma umidade favorável e assim facilitar a locomoção dos JIs. Vale destacar que as espécies de nematoides necessitam de diferentes níveis de umidade e temperatura do solo. Uma vantagem é que o uso adequado de fertilizantes e alguns pesticidas como carbaril, clorpirifós não afetam negativamente o JIs e podem ser utilizados em sinergia. (SHAPIRO –LLAN; DOLINSKI, 2015; KOPPENHOFER et.al, 1995; GREWAL et al., 1994)

Em relação a fatores bióticos, vários organismos como fungos, bactérias e nematoides predadores podem intervir na eficiência dos NEPs. Os fungos nematófagos das espécies *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* estão dentre os mais importantes por serem fungos de solo e pela alta capacidade de infectar os nematoides. Sugere-se que antes de qualquer aplicação de NEPs em um determinado local, seja realizado um levantamento dos fungos nematófagos, caso seja verificado a presença de algum desse citados acima, é necessário que a quantidade de juvenis infectantes aplicados seja maior (DOLONSKI, 2020).

### 3.2.3 NEPs no controle de pragas agrícolas

O uso de NEPs como agentes biológicos tem apresentado resultados significativos no controle de pragas agrícolas. Um dos primeiros relatos de estudos em campo foi registrado no ano de 1986 por Arrigoni et al. (1986), onde nematoides da espécie *Steinernema Carpocapsae* foram avaliados no controle do besouro *Migdolus fryanus*. Em outro estudo, Schimitt et al. (1992) utilizaram outras espécies do gênero *Steinernema* contra a broca-da bananeira (*Cosmopolites sordidus*).

Leite et al. (2003) testaram isolados de nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* com o objetivo de controlar a espécie da cigarrinha raiz (*Mahanarva fimbriolata*) e relataram uma porcentagem de 84% de mortalidade. Duas espécies de NEPs foram testadas por Alves et al. (2005) no controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), estes autores observaram que a espécie *Steinernema carpocapsae* foi a mais patogênica sobre este besouro especificamente no estágio larval.

Isolados das espécies *Heterorhabditis indica* e *Steinernema brazilense* foram testados em campo juntamente com inseticidas por Leite et al. (2012) no controle do bicudo-da cana-de açúcar (*Sphenophorus levis*). Os resultados mostraram que o isolado *Steinernema brazilense* foi mais eficaz comparado ao *Heterorhabditis indica*. Os resultados mostraram que o isolado *S. brazilense* foi mais eficaz comparado ao *Heterorhabditis indica*.

Nanzer (2022) testou os NEPs e as bactérias simbióticas do gênero *Steinernema* para o controle de percevejos da espécie *Euschistus heros* e *Dichelops melacanthus* encontrados na soja e verificaram que os nematoides foram mais eficazes com porcentagem acima de 90% de mortalidade do que a utilização da bactéria simbiote de NEPs.

### 3.2.4 NEPs no controle de carrapatos

O uso de nematoides entomopatogênicos para o controle de carrapatos tem se mostrado promissor nas últimas décadas. No ano de 1990, carrapatos da espécie *Rhipicephalus annulatus* foram testados para verificar a susceptibilidade de fêmeas ingurgitadas aos NEPs (SAMISH & GLAZER, 1991). Análises por meio de testes *in vitro* mostraram que a fase em que as fêmeas se encontram ingurgitadas é o estágio mais susceptível a infecções pelos mesmos, enquanto os demais estágios são altamente resistentes (SAMISH & GLAZER, 2001; VASCONCELOS et al., 2004; SAMISH et al., 2008; CARDOSO et al., 2013).

Pesquisas efetuadas para selecionar isolados dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* para o controle do carrapato do boi, revelaram que os nematoides do gênero *Heterorhabditis* apresentaram maior virulência ao infectar o *R. microplus* (MAULEON et al., 1993; EL-SADAWY & HABEEB, 1998; HILL, 1998; HASSANAIN et al., 1999; GLAZER et al., 2001; ALEKSEEV et al., 2006; MONTEIRO & PRATA, 2013).

### 3.2.5 NEPs no controle do carrapato *R. microplus*

Testes realizados em laboratório com as espécies *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabditis indica* (LPP1) mostraram-se eficientes, visto que com uma dose de 75 JIs/fêmea ingurgitada, a eficácia foi superior a 90% em contrapartida a porcentagens menores obtidas com outros isolados testados com concentrações mais altas (MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012; MONTEIRO & PRATA, 2013).

Os nematoides do gênero *Heterorhabditis* tem demonstrado maior virulência para os carrapatos, o que pode estar relacionado às bactérias simbiotes, porém essa eficiência precisa ser melhor esclarecida. O fato de as espécies desse gênero possuírem uma projeção na cutícula no momento da perfuração pode também contribuir para uma maior eficiência e na aceleração da morte das fêmeas (MONTEIRO et al., 2010; MONTEIRO & PRATA, 2013).

Os efeitos ocasionados pelos NEPs nas fêmeas ingurgitadas foram mortalidade das mesmas, diminuição da postura e da eclosão larval (FREITA-RIBEIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010). Em busca de uma formulação letal para o controle de carrapatos Monteiro (2014) testou isolados de nematoides *in vitro* em

formulação de insetos cadáveres *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* para o controle de *R. microplus* e verificou que com a formulação em *G. mellonella* houve mais eficácia em relação ao *T. molitor* com percentual de 99% de mortalidade para primeira formulação.

Monteiro et al. (2020) testaram a virulência de *H. bacteriophora* LPP30 sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em laboratório em diferentes concentrações e obteve uma taxa de controle acima de 97% de mortalidade para todas as concentrações. Os mesmos autores analisaram, em condições simuladas de campo, o efeito de quatro espécies de NEPs em formulações de diferentes insetos cadáveres nas fases não parasitaria do carrapato, duas espécies de NEPs (*H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7) se destacaram com eficiência de 90% de mortalidade na formulação de inseto cadáver *Galleria mellonella*.

Filgueiras et al. (2022) avaliaram a eficácia de *H. bacteriophora* sobre fêmeas do carrapato bovino de diferentes locais e níveis de ingurgitamento e demonstrou que independentemente do nível de ingurgitamento a eficácia do isolado utilizado no estudo não diferiu. Nesse mesmo trabalho em condições simuladas de campo a eficácia desse nematoide liberados por inseto cadáver foi de aproximadamente 73% de no controle do *R. microplus*.

Dessa forma, a investigação e seleção de novos isolados de NEPs visa enriquecer a oferta de agentes de controle biológico para o combate do carrapato dos bovinos e contribuir para o desenvolvimento sustentável, auxiliando assim um programa de manejo do carrapato do boi, já que o uso constante de acaricidas muitas vezes, de forma descontrolada, tem acelerado o aparecimento da resistência deste parasita aos principais grupos químicos dos carrapaticidas comerciais.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local do experimento**

Os testes foram realizados no Laboratório de Parasitologia Animal e nas áreas externas do Instituto Biológico de São Paulo – SP (23° 35'12" S 46° 39' 08" W com altitude de 759 m com clima subtropical úmido.

## 4.2 Procedência das cepas do carrapato *R. microplus*

Amostras de carrapato *R. microplus* foram coletadas de bovinos leiteiros da Fazenda Experimental do Polo Regional de Pindamonhangaba – SP (22° 57'10" S 45° 26' 20" W) com altitude de 561 m com clima subtropical quente.

## 4.3 Isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs)

Os isolados de nematoides entomopatogênicos (tabela1), foram cedidos pela Unidade Laboratorial em Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, Campinas – SP.

**Tabela 1.** Identificação dos NEPs, suas bactérias simbiotes e a procedência dos isolados.

Isolado	NEP hospedeiro	Bactéria	Origem geográfica
HB EN01	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminences</i>	Alemanha
PAM 25	<i>Steinernema rarum</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	Bagê- RS
IBCNn2	<i>Steinernema carpocapse</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	USA
IBCB n6	<i>Steinernema brazilense</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>	Porto Murtinho- MS
IBCB n10	<i>Heterorhabditis amozenensis</i>	<i>Photorhabdus luminences</i>	Santa Fé do Sul- SP
IBCB n24	<i>Heterorhabditis amozenensis</i>	<i>Photorhabdus luminences</i>	Santa Fé do Sul- SP
IBCB n47	<i>Steinernema feltiae</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	Alemanha

## 4.4 Avaliação *in vitro* para seleção de dose ideal de NEPs

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia Monteiro et al., (2020) modificado (Figura 4). Para cada repetição, quinze fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram separadas e pesadas em balança de precisão e colocadas em placa de Petri descartável (85x15mm) sobre papel filtro em formato circular com o mesmo diâmetro da placa. Posteriormente foi aplicado 1mL de suspensão de nematoides com 100, 200 e 300 JIs/fêmea nas três concentrações respectivamente, enquanto para o controle foi usado 1 mL de água destilada distribuída homogeneamente sobre toda a superfície do papel. As placas foram fechadas e vedadas com parafilm e armazenadas em estufa à 28±1°C e UR>80%.

Após três dias o parafilm foi removido e as placas foram retornadas para estufa e permaneceram por mais 15 dias. Após este período os ovos de cada placa foram



removidos, pesados e depois transferidos para tubos de ensaio devidamente identificados. Os tubos foram tampados com algodão e umedecidos com água e mantidos em estufa. O percentual de eclosão de larvas foi avaliado depois de 15 dias a pesagem dos ovos. Os testes foram realizados com 10 repetições com os sete isolados descritos na Tabela 1. Os dados obtidos do peso das fêmeas, dos ovos e porcentagem de eclosão de cada isolado foram analisados de acordo com Drummond et al. (1973):

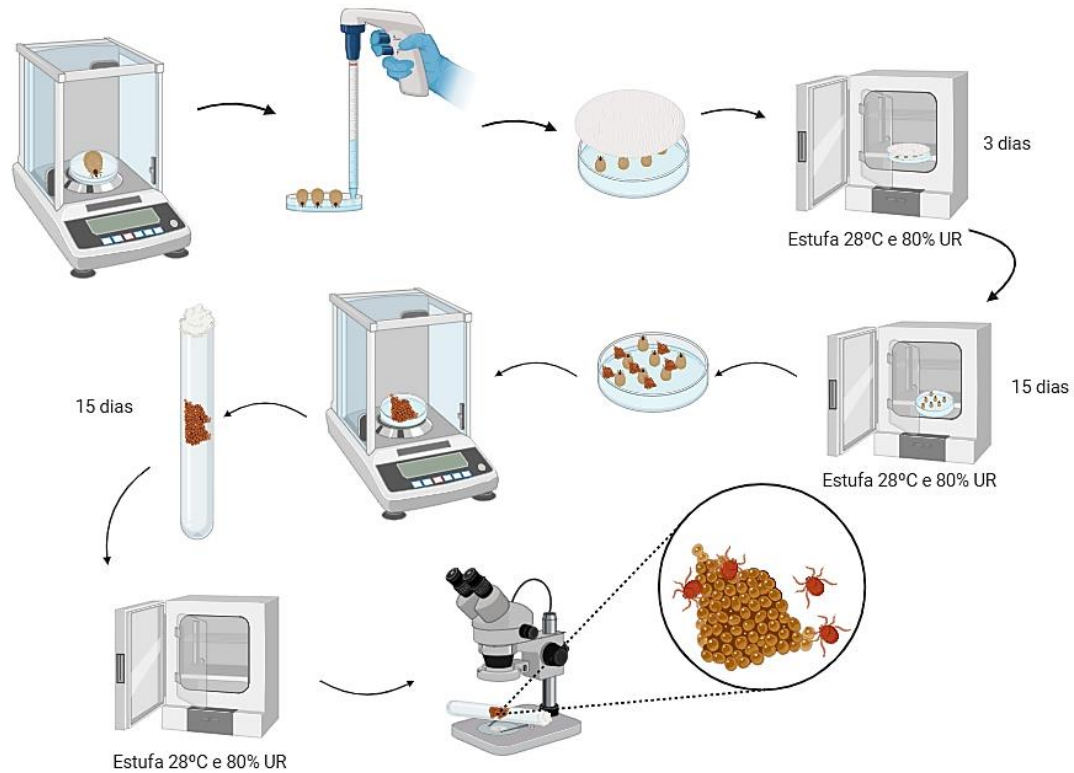
$$P = \frac{\text{Peso de ovos}}{\text{Peso de Fêmeas}}$$

$$IP = 100 - \frac{\text{Peso do tratado}}{\text{Peso do controle}} \times x$$

$$RE = \frac{\text{Peso de massa de ovos} \times \% \text{ de eclosão} \times 20000}{\text{Peso de massa de Fêmeas}}$$

$$EP = \frac{RE \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado} \times 100}{RE \text{ do grupo controle}}$$

Sendo, P: Peso dos ovos e das fêmeas; IP: inibição de postura; RE: reprodução esperada; EP: eficácia do produto; 20000: número equivalente a quantidade de ovos presentes em 1g de ovos.



**Figura 4.** Teste *in vitro* para avaliar a eficácia dos isolados em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

#### 4.5 Avaliação *in vitro* em substrato terra

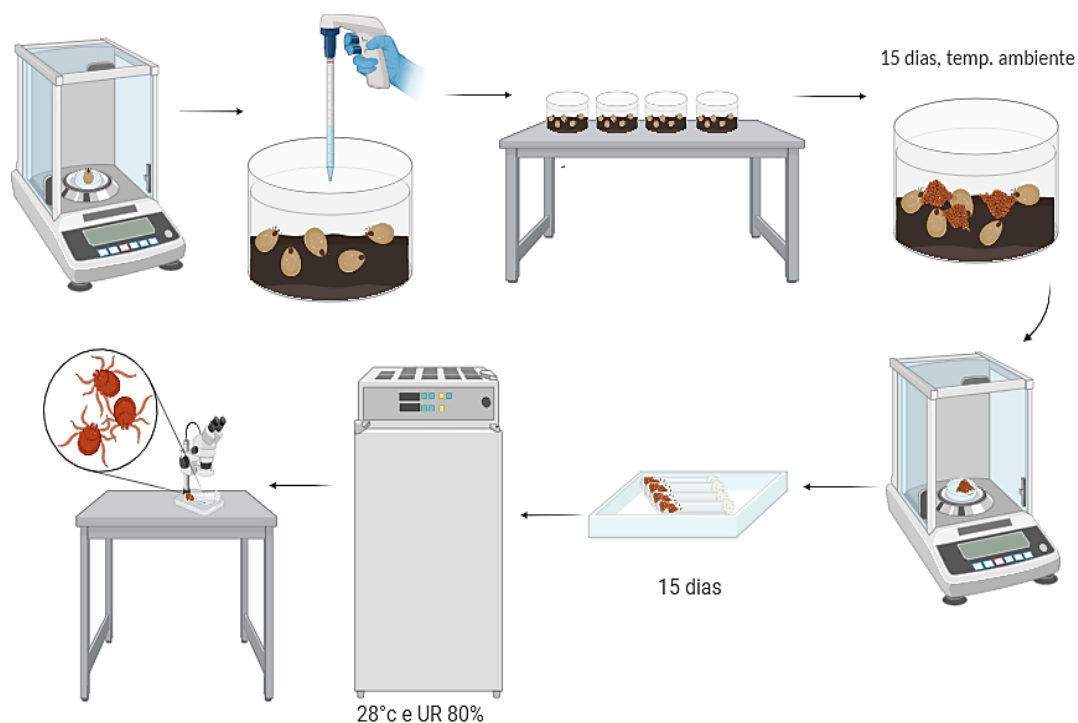
A avaliação *in vitro* em substrato terra foi realizada com os dois isolados que mostraram eficácia acima de 90% *S. rarum* (PAM25) e *H.bacteriophora* (HB EN01). Neste experimento cada unidade amostral foi preparada em frascos plásticos com 12 cm de diâmetro no qual foi colocado terra estéril até uma altura de 2 cm (Figura 5). Foram utilizadas 15 fêmeas ingurgitadas para cada repetição e 1 ml de nematoides em suspensão na dose de 200 JIs/fêmea. O teste foi elaborado com três métodos que diferiram em relação a ordem de liberação dos NEPs (Tabela 2). Os frascos foram tampados e mantidos em temperatura ambiente (11,2°C a 21°C). Todos os testes foram feitos em triplicata. No método S+F aguardou-se 10 min para liberação das fêmeas.

**Tabela 2.** Ordem de liberação entre NEPs e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* do teste *in vitro* substrato terra

	Ordem de liberação	
	Primeiro	Segundo
Controle (C)	Fêmeas	Água destilada
Técnica 1 (F+S)	Fêmeas	NEPs
Técnica 2 (S+F)	NEPs	Fêmeas
Técnica 3 (M)	NEPs	*Fêmeas no marcador

\*Marcador confere em sacos de tecido de voal branco e fechados com barbante Fonte: *et al.* (2022)

Os ovos de cada frasco foram removidos, pesados e colocados em tubos de ensaio devidamente identificados e vedados com algodão umedecido e mantidos por 15 dias em estufa à temperatura de 28°C e 80% UR para a eclosão das larvas. Posteriormente a porcentagem de eclosão foi observada. Os dados obtidos do peso das fêmeas, dos ovos e porcentagem de eclosão de cada isolado foram analisados de acordo com Drummond et al. (1973).



**Figura 5.** Teste *in vitro* com substrato para avaliar a eficácia do *S. rarum* (PAM 25) e *H.bacteriophora* (HB EN01) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* .

#### 4.6 Experimento em condições simuladas de campo

O experimento foi realizado no período de março a junho de 2023 no Instituto Biológico de São Paulo (23° 35'10" S 46° 38' 57"W) em uma área externa do Instituto Biológico em bandejas (unidades experimentais) de 30 x 50 cm com 2,200 kg de terra onde foram cultivadas gramíneas (*Brachiara decumbens*). As unidades experimentais foram escolhidas e identificadas de forma aleatória e colocadas a uma distância de 1m entre elas.

Neste teste foi utilizado os isolados de nematoides *S. rarum* (PAM 25) e *H. bacteriophora* (HB EN01) na dose de 200JIs/fêmea (foram colocadas 60 fêmeas em cada unidade amostral) e em seguida foi aplicada 220 ml de suspensão da nematoide utilizando um regador de jardinagem. Nas unidades controle não foi aplicada a suspensão de nematoide. O experimento foi realizado com seis repetições. Após a aplicação dos nematoides, as unidades experimentais foram inspecionadas diariamente (exceto nos dias chuvosos) no período de 60 dias para verificar os aspectos das fêmeas e o início da postura. As fêmeas, quando mortas, foram retiradas das unidades. As larvas foram coletadas no período do dia 01 a 30 de maio, para tanto as pontas do capim onde as larvas se agrupavam foram cortadas com uma tesoura e colocadas em sacos plásticos para posterior contagem no laboratório. As larvas foram contadas utilizando uma bomba a vácuo e um contador manual. Os dados obtidos foram analisados pelo programa ANOVA (análise de variância).



**Figura 6.** Experimento em condições simuladas de campo para avaliar o efeito do *S rarum* (PAM 25) e *H.bacteriophora* (HB EN01) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em área do Instituto Biológico de São Paulo. **Fonte:** SOUZA (2023)

## 4.7 Histologia

### 4.7.1 Processo de fixação

O processo histológico foi realizado com as fêmeas de carrapato infectadas com o nematoide que mostrou maior eficácia, o isolado HB EN01. Trinta fêmeas foram testadas seguindo o protocolo descrito em 4.4 e após o terceiro, quarto e quinto dia foram retiradas 10 fêmeas das placas de Petri para as próximas etapas. As mesmas foram perfuradas superficialmente nas duas laterais com auxílio de agulhas de insulina com espessura de 4 mm por 5 de diâmetro e esteromicroscópio para que haja penetração do fixador. Em seguida, realocadas em cassetes e emergidas no fixador Duboscq-Brasil por 24 horas. Depois, em frascos de álcool 70°, as fêmeas permaneceram por, no mínimo, 72 horas. A proporção entre a quantidade de fixador e a amostra foi de 70% de fixador 30%.

### 4.7.2 Processo de Desidratação e Diafanização

Após a fixação essas amostras passaram por banhos crescentes de álcool (70°, 80°, 95° e álcool absoluto) para a desidratação e a diafanização em banhos de xilol. O protocolo foi realizado nas seguintes etapas conforme o quadro 1:

**Quadro 1.** Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, modificado segundo Michalany (1990).

Reagentes	Tempo
Álcool 70°	45 minutos
Álcool 80°	45 minutos
Álcool 95° I	45 minutos
Álcool 95° II	45 minutos
Álcool Absoluto I	45 minutos
Álcool Absoluto II	45 minutos
Xilol I	60 minutos
Xilol II	60 minutos
Xilol III	60 minutos

Fonte: Modificado de Cassiano (2015).

#### 4.7.3 Emblocamento

Nesta etapa foi realizada a impregnação em parafina, na qual os cassetes foram submergidos em parafina colocados na estufa histológica a 52°C overnight. Posteriormente as amostras foram introduzidas em moldes de silicone, contendo parafina histológica

#### 4.7.4 Corte e coloração das lâminas

Neste processo de coloração as lâminas foram colocadas dentro de uma estufa 52°C overnight e logo após iniciou-se a desparafinização em banhos de xilol, lavagem em álcool absoluto, hidratação em soluções hidro alcoólicas, coloração pela hematoxilina de Harris e Eosina desidratação em álcoois e diafanização em xilol modificado segundo Michalany (1990) de acordo com o quadro abaixo 2:

**Quadro 2.** Protocolo de cortes de tecido e coloração das lâminas modificado segundo Michalany (1990).

Reagentes	Tempo
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Xilol III	10 minutos
Álcool absoluto I	5 minutos
Álcool absoluto II	5 minutos
Álcool absoluto III	5 minutos
Álcool 95° I	5 minutos
Álcool 95° II	5 minutos
Álcool 80° I	5 minutos
Álcool 80° II	5 minutos
Álcool 70°	5 minutos

Lavar em água corrente	-
Hematoxilina	5 minutos
Lavar em água corrente	-
Diferenciador	Põe e tira
Lavar em água corrente	-
Colocar em água morna	20 minutos
Eosina	5 minutos
Lavar em água corrente	-
Álcool 70°	Põe e tira
Álcool 80° I	Põe e tira
Álcool 80° II	Põe e tira
Álcool 95° I	Põe e tira
Álcool 95° I	Põe e tira
Álcool absoluto I	Põe e tira
Álcool absoluto II	Põe e tira
Álcool absoluto III	Põe e tira
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Xilol III	Até 12 horas
Aplicar a lamínula	-
Aguardar a secagem e analisar	-

**Fonte:** Michalany (1990)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação *in vitro* para seleção de dose ideal de NEPs

Os resultados obtidos da seleção dos isolados de NEPs com maior virulência sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* apresentaram, após o período de 35 dias, uma eficácia de 90% para os isolados *S. rarum* (PAM 25) e *H. bacteriophora* (HB EN01), em todas as concentrações testadas os valores de eclosão larval foram inferiores a 21% sem diferença significativa entres ambos isolados. A inibição de postura para o isolado *S.*

*rarum* (PAM 25) foi superior a 80% na concentração de 300/JIs, já para o isolado *H. bacteriophora* (HB EN01) a inibição na mesma concentração foi acima de 90% (Figura 9). Nas concentrações de 200JIs e 300JIs/fêmea do isolado *S.rarum* (PAM 25) as porcentagens de eficácia foram similares,  $99\% \pm 1,07$  e  $99\% \pm 1,45$  respectivamente, porém a concentração de 100 JIs/fêmea foi de  $92\% \pm 8,45$ . Esta similaridade também foi observada nos resultados com o isolado HB EN01:  $94\% \pm 12,4$  para 100/JIs,  $98,7\% \pm 2,15$  para 200 JIs/fêmea e  $100\% \pm 0$  quando aplicado 300 JIs/fêmea (Tabela 2, Figuras 7 e 8).

Dentre os demais isolados testados *S.brazilense* (IBCBn06), *H .amazonensis* (IBCBn10), *H. amazonensis* (IBCBn24) e *S. feltiae* (IBCBn47), apenas o isolado *S. carpocapse* (IBCBn02) na concentração de 300 JIs/fêmea mostrou uma eficácia (EP) acima de 70%, os demais apresentaram eficácias inferiores a 60% para as três concentrações avaliadas (Tabela 2). Na análise de variância entre os isolados *Steinernema rarum* (PAM 25) *Heterohabditis bacteriophora* (HB EN01) houve diferença significativa em relação aos demais isolados ( $p>0,05$ ).

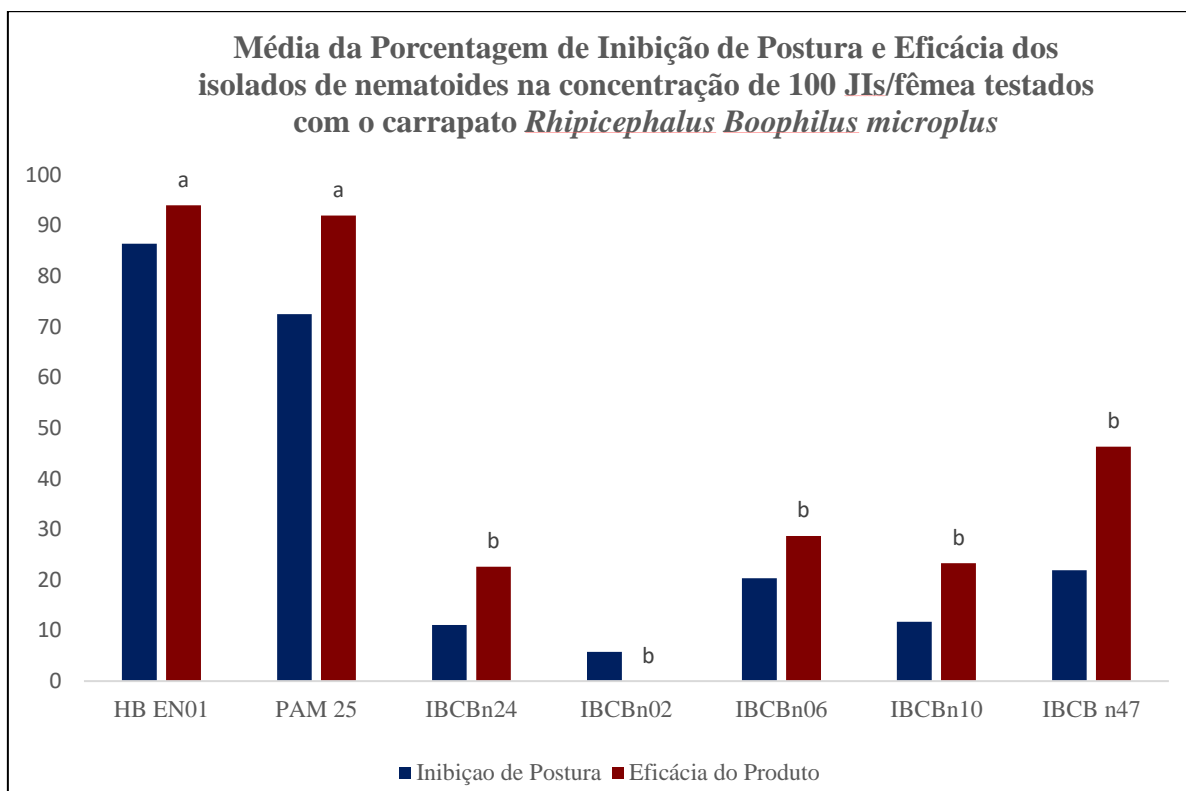
Com base nas observações realizadas durante o experimento, notou-se alterações significativas nos aspectos das fêmeas ingurgitadas tratadas com os isolados *S.rarum* (PAM 25) e *H. bacteriophora* (HB EN01) em comparação ao grupo controle a partir do quarto dia de tratamento. Percebe-se nitidamente uma distinção entre aparência das fêmeas saudáveis (grupo controle) e as fêmeas tratadas, que apresentaram um avermelhamento e inchaço no quarto dia, e uma coloração mais escura e aspecto seco no décimo quarto dia (Quadro 3).



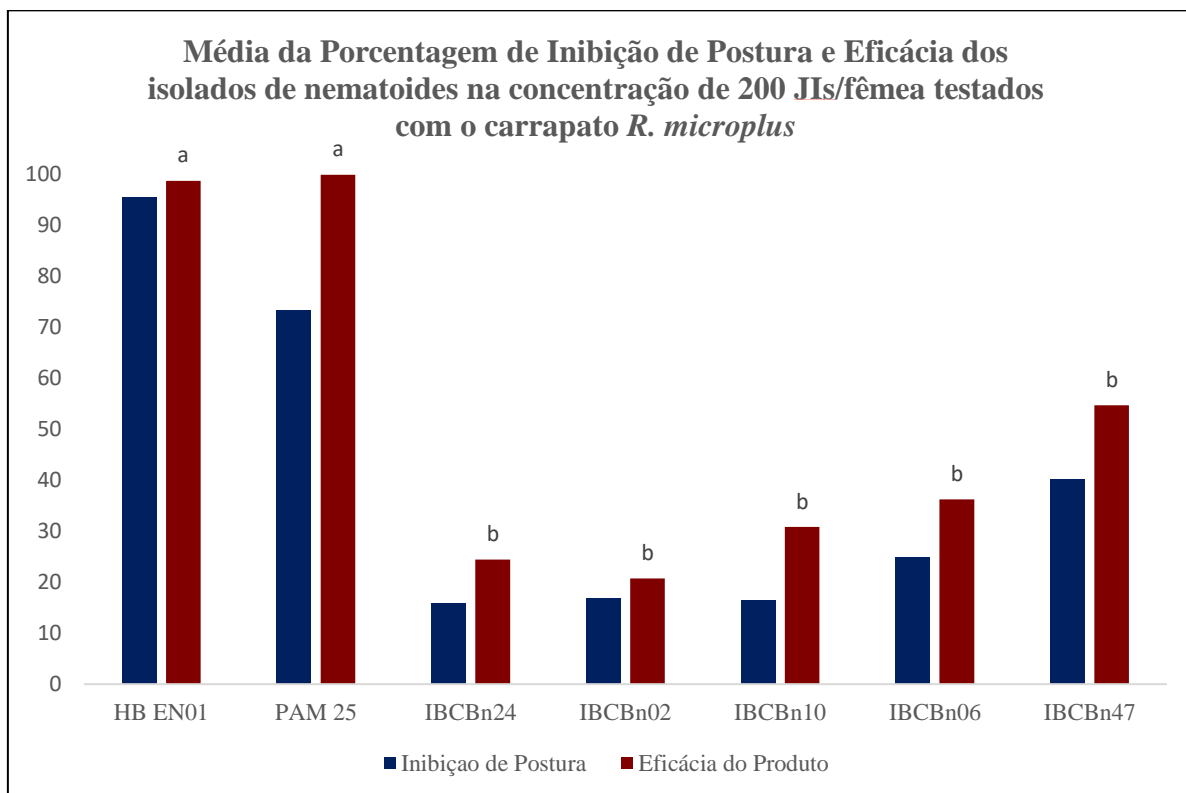
**Tabela 3.** Média de porcentagem e desvio padrão dos testes *in vitro* com sete isolados de nematoides entomopatogênicos nas concentrações de 100, 200 e 300 JIs/fêmea ingurgitadas do carrapato *R. microplus*

Tratamento	Concentração	P/fêmeas (g)	P/ovos (g)	IP %	E/larval %	EP %
Controle PAM 25	0	3,15 ± 0,35	1,0 ± 0,19	-	81,5 ± 16,5	-
	100/JIs	3,06 ± 0,22	0,38 ± 0,31	72,53 ± 22,67	21 ± 19,3	92 ± 8,45
	200/JIs	2,93 ± 0,48	0,33 ± 0,24	73,31 ± 19,11	0,7 ± 1,64	99 ± 1,07
	300/JIs	3,06 ± 0,49	0,20 ± 0,13	84,62 ± 9,6	2,7 ± 4,16	99 ± 1,45
Controle HB EN01	0	3,377 ± 0,29	1,539 ± 0,21	-	81,5 ± 16,50	-
	100/JIs	3,377 ± 0,43	0,237 ± 0,22	86,4 ± 17,31	11,5 ± 23,10	94,0 ± 12,45
HB EN01	200/JIs	3,447 ± 0,39	0,06 ± 0,06	95,42 ± 4,5	9 ± 16,63	98,79 ± 2,15
	300/JIs	3,000 ± 0,34	0,08 ± 0,08	99,9 ± 0	0 ± 0	100 ± 0 a
Controle IBCB n02	0	3,519 ± 0,33	1,565 ± 0,31	-	90 ± 7,81	-
	100/JIs	3,185 ± 0,23	1,252 ± 0,43	5,85 ± 20,5	77,5 ± 12,48	0 ± 46,5
IBCB n02	200/JIs	3,334 ± 0,42	1,203 ± 0,47	16,8 ± 25,4	85 ± 23,62	20,7 ± 43,1
	300/JIs	3,110 ± 0,26	1,056 ± 0,36	21,8 ± 19,5	67,5 ± 18,25	71,08 ± 25,21
Controle IBCBn6	0	3,483 ± 0,33	1,496 ± 0,31	-	90 ± 7,81	-
	100/JIs	3,141 ± 0,23	1,191 ± 0,43	20,3 ± 26,9	71,5 ± 24,6	28,78 ± 36,9
IBCBn6	200/JIs	3,305 ± 0,42	1,167 ± 0,47	24,9 ± 24,4	74,5 ± 23,62	36,2 ± 33,1
	300/JIs	3,114 ± 0,26	0,988 ± 0,36	29,5 ± 25,3	77,5 ± 29,8	46,1 ± 35,3
Controle IBCBn10	0	3,704 ± 0,28	1,856 ± 0,21	-	82,5 ± 15,32	-
	100/JIs	3,513 ± 0,18	1,512 ± 0,18	11,75 ± 9,8	67 ± 25,6	23,3 ± 27,19
IBCBn10	200/JIs	3,425 ± 0,27	1,392 ± 0,20	16,5 ± 10,80	73 ± 17,16	30,80 ± 24,6
	300/JIs	3,440 ± 0,30	1,266 ± 0,32	25,4 ± 14,81	81,5 ± 7,83	31,78 ± 17,8
Controle IBCBn24	0	3,714 ± 0,28	1,875 ± 0,21	-	82,5 ± 15,32	-
	100/JIs	3,540 ± 0,29	1,456 ± 0,18	11,10 ± 9,8	75 ± 25,62	22,63 ± 36,70
IBCBn24	200/JIs	3,448 ± 0,27	1,403 ± 0,20	15,99 ± 13,68	75 ± 17,16	24,42 ± 24,60
	300/JIs	3,401 ± 0,30	1,219 ± 0,32	28,16 ± 14,81	85 ± 7,83	26,91 ± 17,89
Controle IBCBn47	0	3,515 ± 0,21	1,608 ± 0,30	-	93,5 ± 7,83	-
	100/JIs	3,257 ± 0,49	1,164 ± 0,21	21,9 ± 13,1	77 ± 12,9	46,3 ± 21
IBCBn47	200/JIs	3,173 ± 0,15	0,894 ± 0,39	40,1 ± 26,1	62,0 ± 25,6	54,7 ± 27,5
	300/JIs	3,175 ± 0,15	0,880 ± 0,29	31,6 ± 20,0	70,0 ± 7,2	47,6 ± 13,1

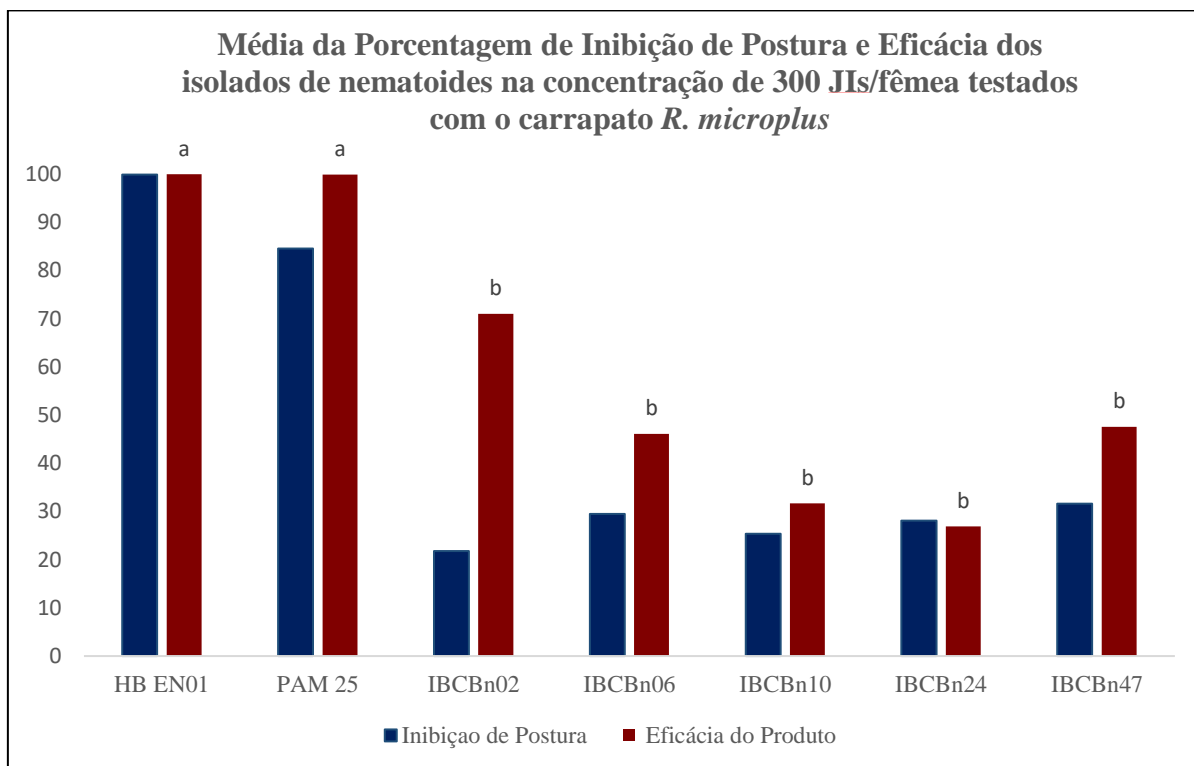
\*IP- Inibição de postura; P- Peso; E/larval % - Eclosão larval; EP- Eficácia do nematoide



**Figura 7.** Média da Porcentagem de Inibição de Postura e Eficácia dos isolados de nematoides na concentração de 100 JIs/fêmea testados com o carrapato *R. microplus*.



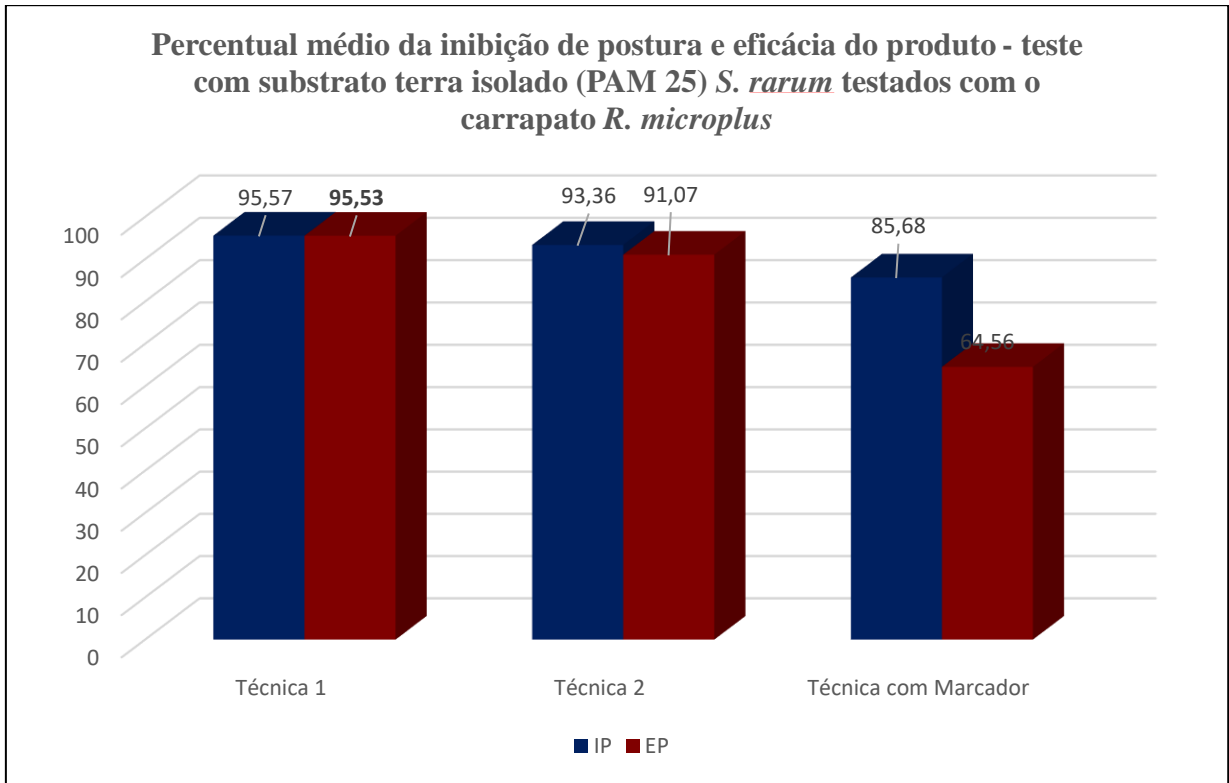
**Figura 8.** Média da Porcentagem de Inibição de Postura e Eficácia dos isolados de nematoides na concentração de 200 JIs/fêmea testados com o carrapato *R. microplus*



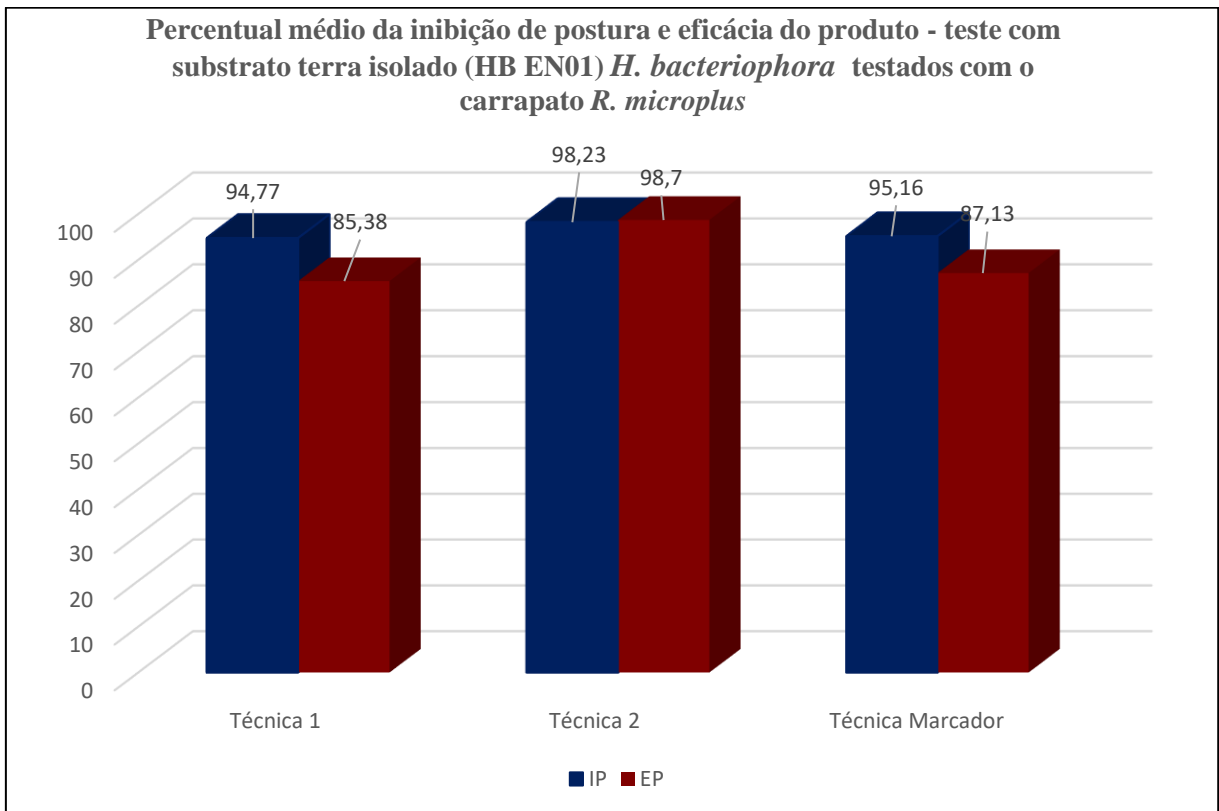
**Figura 9.** Média da Porcentagem de Inibição de Postura e Eficácia dos isolados de nematoides na concentração de 300 JIs/fêmea testados com o carrapato *R. microplus*

## 5.2 Avaliação *in vitro* em substrato terra

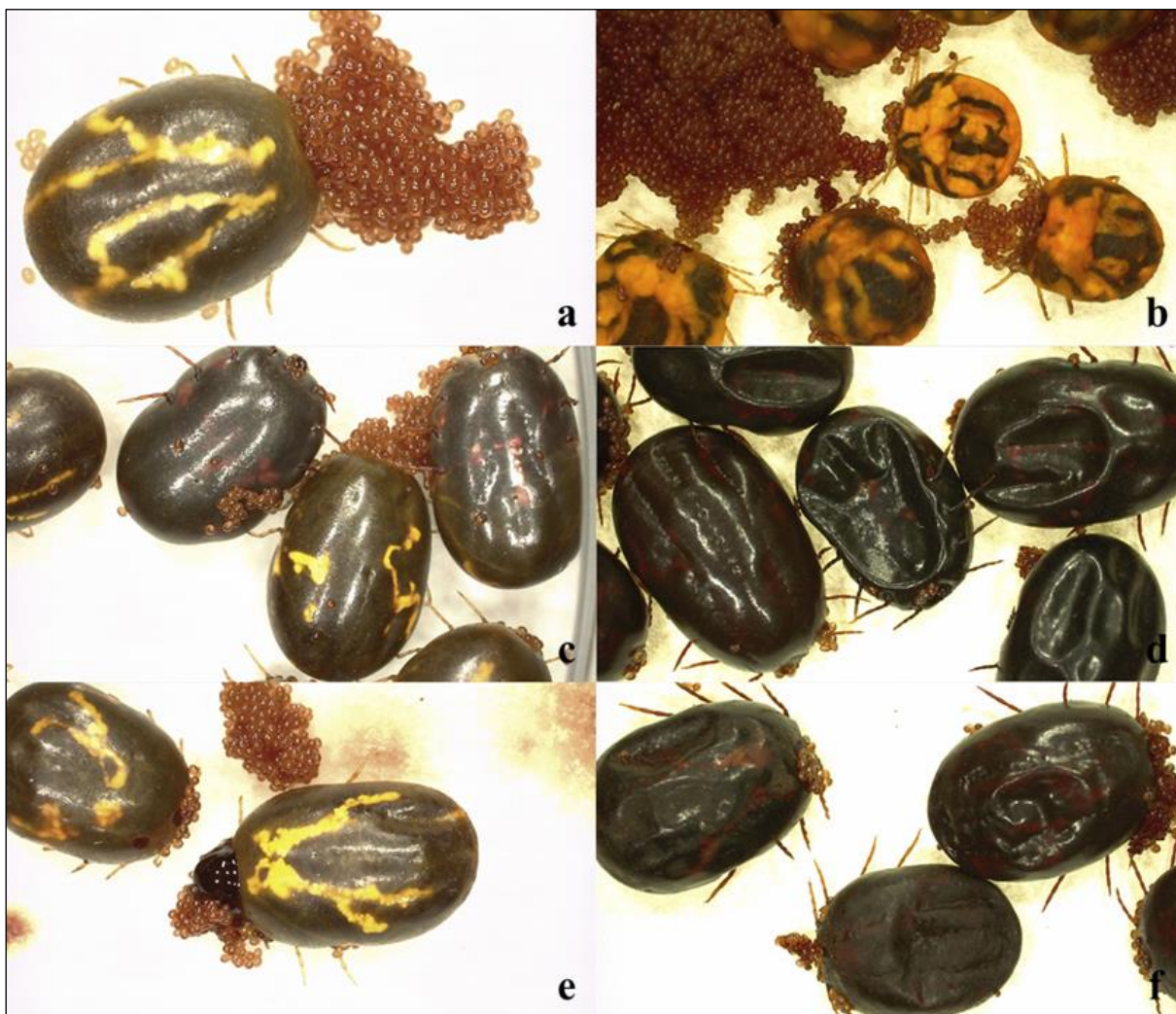
No experimento *in vitro* com substrato terra para as três técnicas distintas, obteve-se para os dois isolados (PAM 25) *S. rarum* e (HB EN01) *H. bacteriophora* apresentaram uma taxa de inibição de postura e eficácia do nematoide acima de 80%, com exceção da técnica com marcador (voal), na qual a eficácia para o isolado (PAM 25) *S. rarum* em que a eficácia foi de 60%. (Figura 10 e Figura 11)



**Figura 10.** Percentual médio da inibição de postura e eficácia do produto - teste com substrato terra isolado (PAM 25) *S. rarum* testado com o carrapato *R. microplus*



**Figura 11.** Percentual médio da inibição de postura e eficácia do produto - teste com substrato terra isolado (HB EN01) *H. bacteriophora* testados com o carrapato *R. microplus*

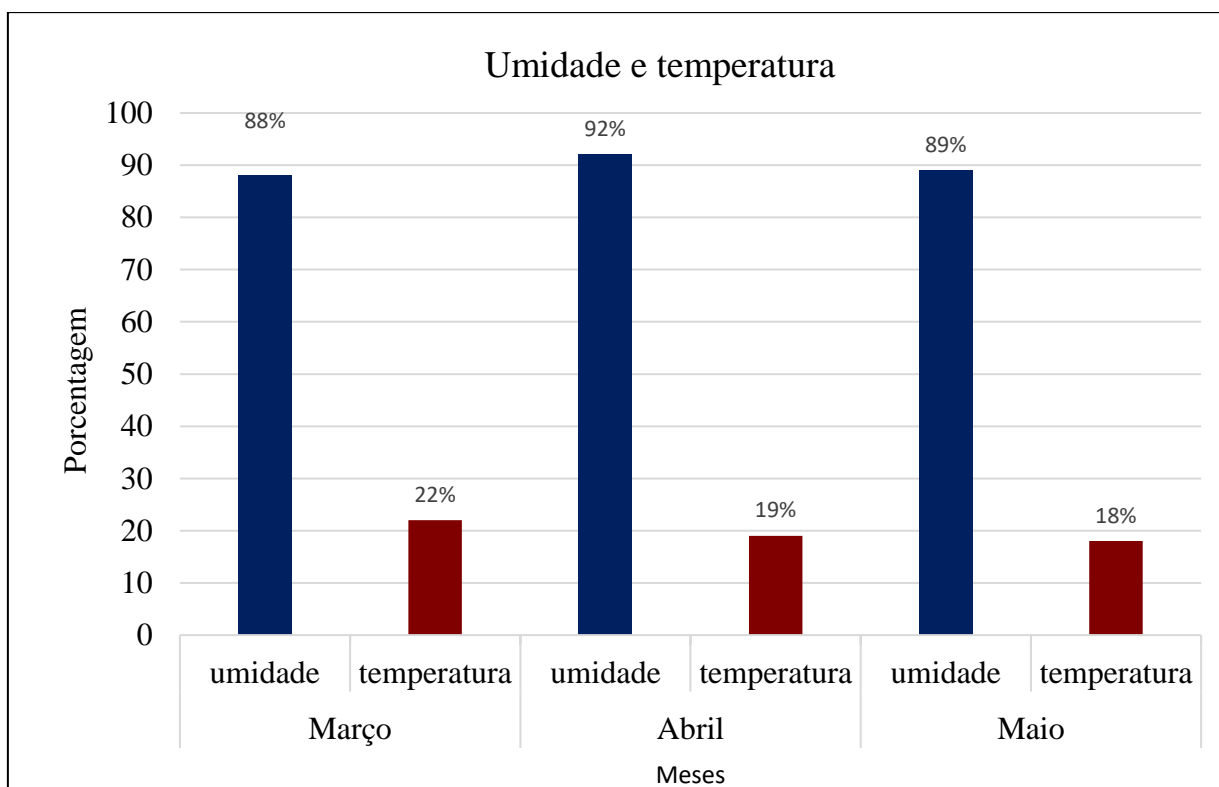


**Figura 12.** Aspecto morfológico e coloração das fêmeas ingurgitadas com 4º e 14º dias após tratamento (água, HB EN01 e PAM 25) a: controle no 4º dia; b: controle no 14º dia; c: HB EN01 no 4º dia; d: HB EN01 no 14º dia; e: PAM 25 no 4º dia; f: PAM 25 no 14º dia.

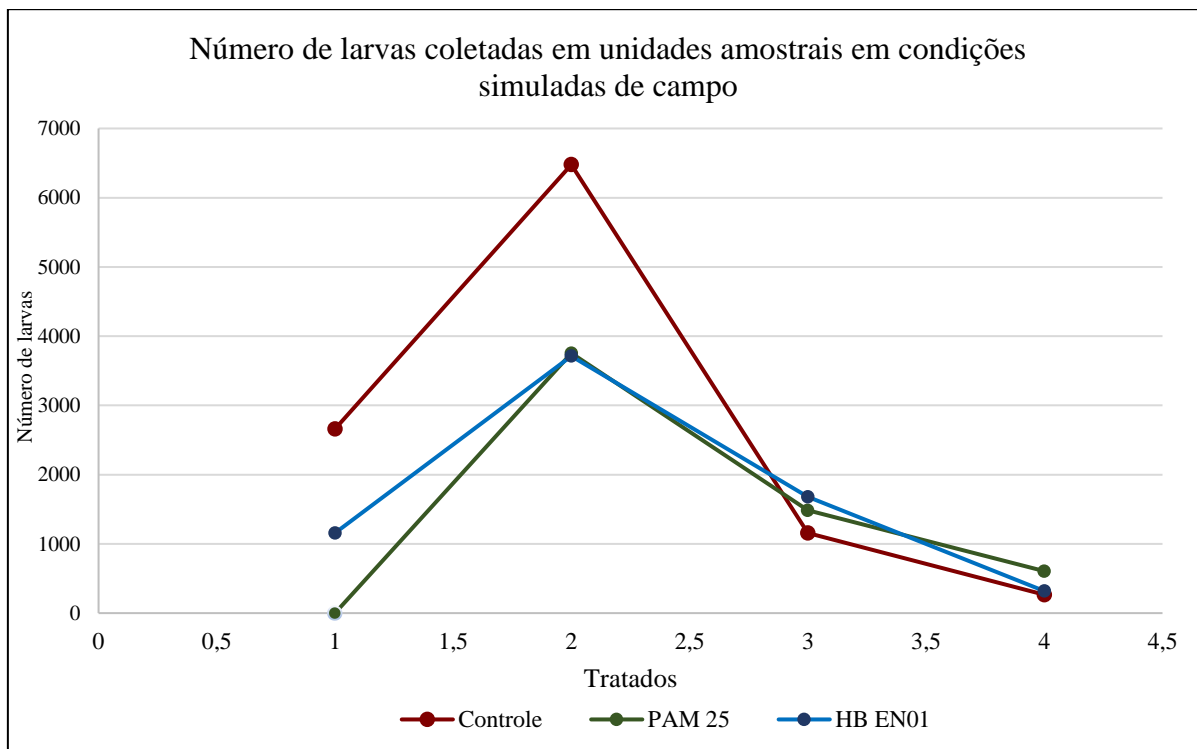
### 5.3 Experimento em condições simuladas de campo

Não foi possível a visualização de todas as fêmeas das unidades experimentais. Dentre as observadas foram retiradas 15 fêmeas mortas nos tratamentos do experimento e 14 do grupo controle (Tabela 3). Na contagem das larvas não houve diferença significativa em relação ao isolado (HB EN01) *H. bacteriophora* ( $p > 0,05$ ) comparado ao controle, porém houve diferença significativa entre o controle e o isolado (PAM 25) *S. raram* ( $p < 0,05$ ). Verificou-se que a média de recuperação das larvas para o grupo controle foi superior a 2500 larvas, enquanto para os tratamentos (PAM 25) *S. raram* e (HB EN01) *H. bacteriophora* foi de aproximadamente 1400 e 1700 respectivamente. A maior quantidade de larvas coletadas ocorreu na segunda semana para todos tratamentos (Figura

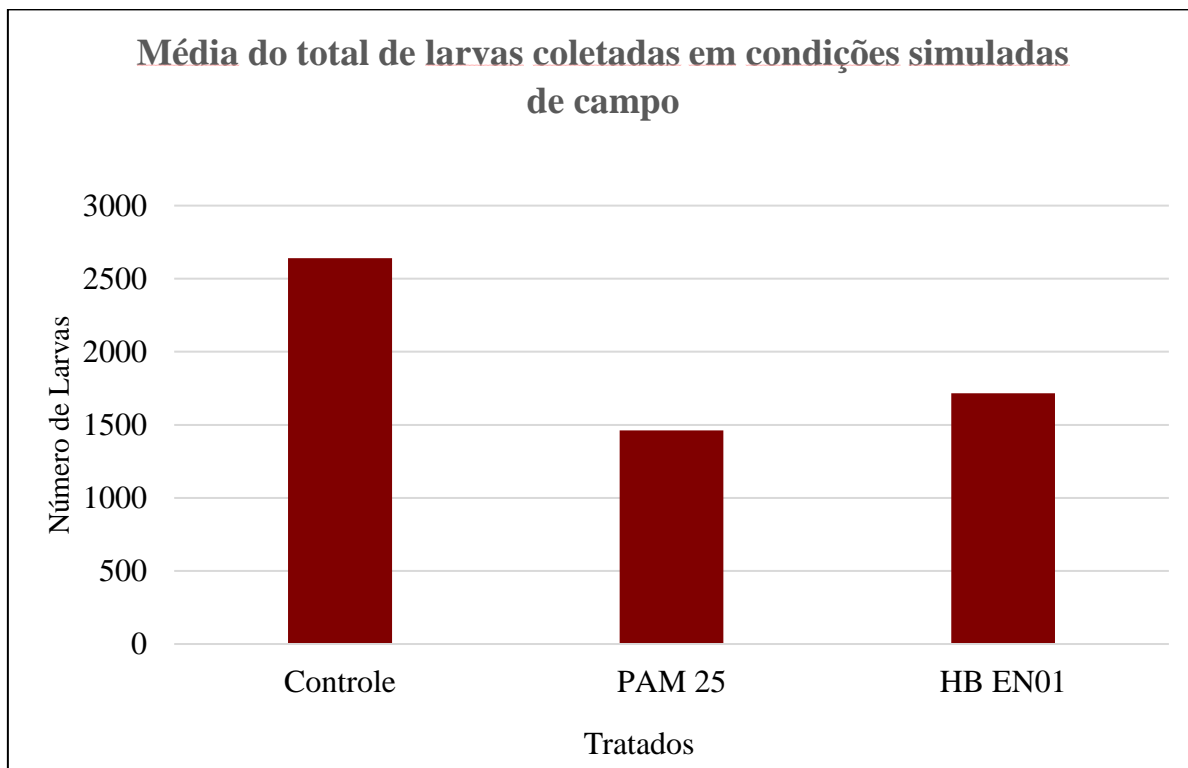
12). A figura 14 apresenta o total de larvas coletadas no grupo controle, e tratados demonstrando a eficácia superior do isolado (PAM 25) *S. rarum* em relação ao (HB EN01) *H. bacteriophora* com as respectivas de eficácia de 44,6% e 34,9%, já (figura 15) apresenta a média do total de larvas para cada tratado. Durante todo o período do experimento (março a maio) a temperatura se manteve com uma média estável aproximadamente 22°C. Entretanto a umidade teve algumas oscilações, porém de modo geral a média foi estável durante quase todo o período do experimento (figura 13).



**Figura 13.** Dados de temperatura e umidade do experimento em condições simuladas de campo no período de março a abril. Fonte: INMET (2023)



**Figura 14.** Quantificação de larvas coletadas em unidades amostrais em condições simuladas de campo.



**Figura 15.** Médias de larvas recuperadas ao final de experimento em condições simuladas de campo.

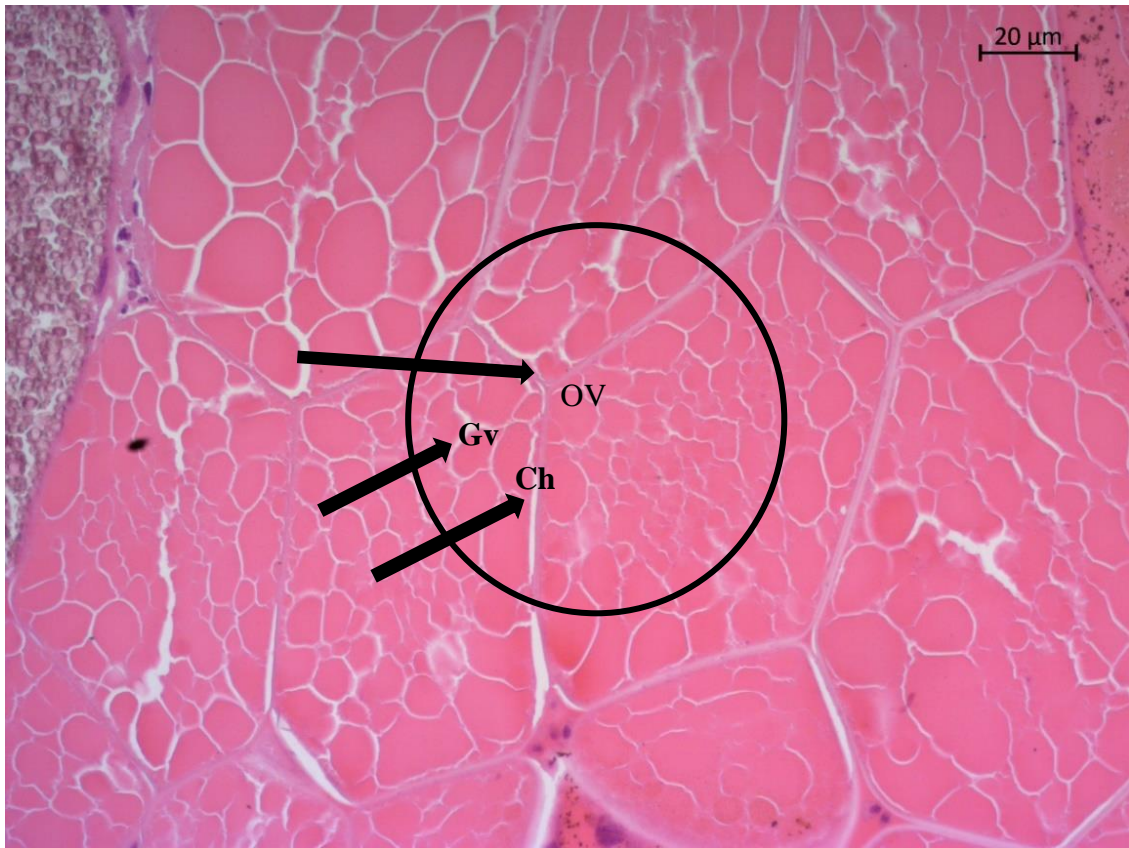
**Tabela 4.** Total de fêmeas de *R. microplus* coletadas de cada unidade experimental em condições simuladas de campo.

	Tratamentos		
	PAM 25	HB EN01	Controle
Total de fêmeas inseridas nas unidades amostrais	60	60	60
Total de fêmeas mortas retiradas das unidades amostrais	15	15	14
Porcentagem de fêmeas mortas	25%	25%	23,3 %

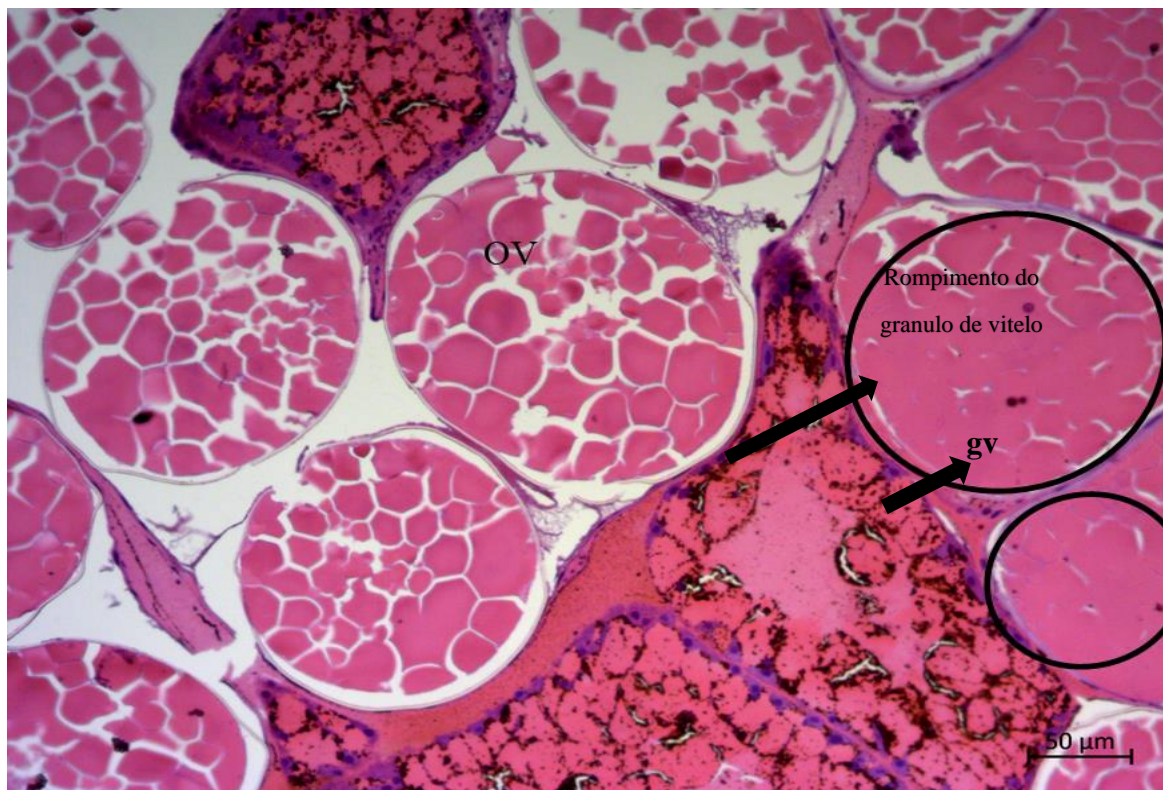
#### 5.4 HISTOLOGIA

A Figura 16 retrata fêmeas do grupo controle, enquanto as Figuras 17 e 18 representam o grupo tratado, com fêmeas analisadas após 4 e 5 dias de experimento, respectivamente. Na Figura 16, é possível identificar a presença do ovário (ov), evidenciado pelo círculo, preenchido por grânulos de vitelo (gv), com o corio (ch) preservado, indicado pelas setas, demonstrando a integridade dos tecidos. Por outro lado, nas imagens 17 e 18, não se observam os grânulos de vitelo (gv) intactos, como no grupo controle. Sugere-se que esses grânulos tenham sido rompidos, resultando na permanência de lipídios, carboidratos e proteínas no ovócito. Além disso, há a presença de vacúolos entre os ovócitos. As características foram analisadas em cinco lâminas de cada grupo, com a presença desses padrões em todas elas. O grupo tratado removido no 3º dia não apresentou alterações.





**Figura 16.** Cortes histológicos de fêmeas de *R. microplus* do teste *in vitro* do grupo controle corados com hematoxilina e eosina. As estruturas em destaques mostram o ovário (ov) dentro do círculo, a seta está indicando o granulo de vitelo (gv) e cório (ch). Todas estruturas integras.



**Figura 17.** Cortes histológicos de fêmeas de *R. microplus* do teste *in vitro* do grupo tratado com HB EN01 no 4º dia corados com hematoxilina e eosina. No interior dos círculos está evidenciando o rompimento do granulo de vitelo (gv) e cório (ch).



**Figura 18.** Cortes histológicos de fêmeas de *R. microplus* do teste *in vitro* do grupo tratado com HB EN01 no 5º dia corados com hematoxilina e eosina. No interior do círculo está evidenciando o rompimento do granulo de vitelo (gv) e cório (ch).

## 6 DISCUSSÃO

A utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs) como agentes de controle biológico de pragas é uma estratégia consolidada na agricultura, reconhecida como um dos principais métodos nesse campo. Na esfera veterinária, a investigação sobre NEPs concentra-se no combate a artrópodes, como o cascudinho em aviários, e em ectoparasitos de bovinos, como o carrapato *R. microplus*.

No presente estudo ao avaliar sete isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) para o controle do carrapato *R. microplus*, apenas dois deles, os isolados (PAM 25) *S. rarum* e (HB EN01) *H. bacteriophora*, demonstraram eficácia, com taxas acima de

90% em todas as concentrações testadas 100, 200 e 300 JIs/fêmea. Constatou-se que a ação dos NEPs se manifestou sobre as fêmeas partir do quarto dia de tratamento indicando que esses isolados têm potencial biocarrapaticida.

A presença de apêndices na região cefálica das espécies do gênero *Heterorhabditis* facilita a penetração no hospedeiro, favorecendo a infecção. Os dados de eficácia obtidos para o isolado (HB EN01) *H. bacteriophora* (em todas as concentrações) neste estudo foram similares aos resultados encontrados por Monteiro et al. (2020) com o isolado (*H. bacteriophora* HP88) e (*H. indica* LPP1) testados com fêmeas do carrapato *R. microplus* em experimentos laboratoriais utilizando insetos cadáveres *T. molitor* e *G. mellonella*. Outros estudos relatam que a combinação deste isolado com o fipronil contribui para o controle do bicudo da cana-de-açúcar Leite et al. (2012).

Estudos de controle biológico com a espécie *S. rarum* vem sendo conduzidos, principalmente desde os anos noventa com insetos pragas na agricultura (NGUYEN et al., 2006). No entanto, pesquisas relacionadas ao controle do carrapato não foram encontradas até o momento, tornando este o primeiro relato de experimento com o isolado (PAM 25) *S. rarum* no combate do carrapato bovino. Os resultados obtidos por Silva et al., (2021) para o controle do bicudo de cana (*Sphenophorus levis*) teve uma mortalidade acima de 75% semelhante aos resultados desta pesquisa com valor superior a 90% para todas as concentrações testadas.

Nota-se, nos testes com substrato terra, que houve expressiva eficácia, visto que em dois dos tratamentos testados (S+F e F+S) a eficácia foi acima de 90%. Os resultados obtidos com tratamento utilizando marcadores apresentou eficácia inferior comparada aos demais tratamentos, mas ainda assim apresentou eficácia de aproximadamente 65% e 80% nos testes com *S. rarum* (PAM 25) e *H. bacteriophora* (HB EN01) respectivamente, demonstrando que a técnica pode ser utilizada em casos específicos em que seja necessário proteger os carrapatos para alguma outra proposta de estudo. Trabalho realizado por Abdel-Ghany et al. (2024) com o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* usando substrato terra os resultados foram acima de 84% para todas as concentrações (4000, 2000, 1000, 500 e 250 JIs/ml) com o NEP *H. bacteriophora* HP88 e *Steinernema* sp. SII.

O experimento realizado com substrato terra foi descrito por Monteiro et al. (2014) no qual foi avaliado a eficácia do nematoide *H. indica* (LPP1), *H. bacteriophora* HP88, *S. carpocapsae*, ALL, *S. feltiae* sobre a mortalidade das fêmeas ingurgitadas, não foi verificada a dosagem utilizada, já que os nematoides foram adicionados através de cadáveres dos insetos *G. mellonella* e *T. molitor*. As mortalidades das fêmeas de carrapatos variaram de 80% a 100% em um período de 10 dias após o tratamento com

dois, quatro e seis cadáveres. Ainda que a metodologia utilizada no presente trabalho seja distinta ao relato de Monteiro (2014) observou-se que os valores encontrados para o *H. bacteriophora* (HP88) foram semelhantes ao isolado (HB EN01) *H. bacteriophora*.

Em relação aos testes feitos em condições simuladas de campo a metodologia e os isolados diferem do experimento realizado por Monteiro et al. (2020), além disso, esses autores não avaliaram a eclosão das larvas, no entanto verificaram a mortalidade das fêmeas no período 22 dias com eficácia acima de 76% para os isolados testados. No presente estudo foram recolhidas somente as fêmeas mortas, sendo 25% para ambos os isolados (PAM 25 e HB EN01) e 23,3% para o grupo controle, entretanto, nem todas as fêmeas foram visualizadas nas unidades experimentais. De acordo com a média de larvas eclodidas os dois isolados (PAM 25) e (HB EN01) mostraram-se eficazes no controle do *R. microplus* com eficácia superior do isolado PAM 25 em relação ao HB EN01. Porém, em estudos realizado por Filgueira et.al (2022) com isolado da espécie *H.bacteriophora* obteve uma redução significativa na eclosão de larvas com variações de 50% a 95 %.

Os resultados dos testes histológicos apresentados neste estudo evidenciam as alterações morfológicas em ovários de *R. microplus* sob efeito do isolado (HB EN01) *H. bacteriophora*. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que avalia através de técnicas histológicas a ação deste isolado sobre carrapatos. Foi observado que a partir do 4º dia do contato do carrapato com o isolado algumas alterações nos ovócitos começaram a surgir, estando presente no 4º e 5º dia. Não houve alterações no 3º dia, sugerindo que a ação do nematoide inicia-se após o 4º dia de infecção corroborando os resultados das avaliações visuais realizadas durante os experimentos *in vitro*, visto que a partir do quarto dia após o tratamento é que foram notadas as alterações físicas como alterações das colorações.

Algumas alterações histológicas nos ovários das fêmeas encontradas neste estudo podem ser comparadas com as alterações causadas por outras formas de controle. Almeida et al. (2022) realizaram o controle biológico do carrapato *R. microplus*, com a utilização do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, o qual observou-se a modificação nos grânulos de vitelo e o rompimento do cório, bem como neste estudo.

Na literatura, as análises da técnica histológica são geralmente realizadas com o carrapato *R. sanguineos*, porém, a ação de nematoides entomopatogênicos ainda não foi descrita (GARCIA et al. 2004, 2005, 2008). Sousa et al., (2005) submeteu carrapatos ao tratamento com o extrato da planta *Melia azedarach*, demonstrando a ausência dos grânulos, e a ausência do cório, que são características vistas em ambos os estudos.

Oliveira et al. (2008) foram os primeiros a testarem os efeitos de produtos químicos sintéticos no sistema reprodutor feminino de carrapatos *R. sanguineus*.

O estudo foi realizado com fêmeas imersas em fipronil. As alterações relatadas foram principalmente em relação ao número de oócitos afetados, número e tamanho dos vacúolos citoplasmáticos, a presença de figuras de mielina e microtúbulos citoplasmáticos e modificações nas organelas das células germinativas (OLIVEIRA et al., 2008, 2009, 2011).

Camargo-Mathias (2013) analisou os efeitos do princípio ativo deltametrina sobre o sistema reprodutor do carrapato *R. sanguineus*, que demonstrou a eficácia do produto no crescimento dos ovários, causando danos as células germinativas do carrapato. Destaca-se que uma das alterações relatadas, no ovócito, é a composição e organização dos grânulos de vitelo, os quais sofreram processo de fusão resultando em grânulos extremamente grandes e descaracterizados, semelhante aos achados deste estudo.

## 7 CONCLUSÃO

Dois dos 7 isolados de NEPs (PAM 25 e HB EN01) testados foram virulentos nas concentrações de 100, 200 e 300 JIs por fêmea, com mais de 80% de eficácia e inibição de postura .

Após o 4º dia de tratamento *in vitro* com fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, nas concentrações já mencionadas anteriormente, com os isolados HB EN01 e PAM 25 as fêmeas já se mostravam com alterações e com coloração escura características de infecção.

Os isolados (PAM 25) *S. rarum* e (HB EN01) *H. bacteriophora* testados em substrato terra sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* na dosagem de 200 JIs/fêmea, nas três técnicas se mostraram virulentos, com eficácia acima de 60%.

O teste realizado em condições simuladas de campo, mostrou uma porcentagem de eficácia com base na eclodibilidade das larvas de 34,9% para o isolado HB EN01 e 44,6% para PAM 25.

Os dados histológicos revelaram a alteração dos ovócitos com rompimento do córion das fêmeas tratadas com o isolado HB EN01 a partir do quarto dia de tratamento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Ghany, H. S. M., Alzan, H. F., Hendawy, S. H. M., Elsadawy, H. A., & Abdel-Shafy, S. (2024). In vitro evaluation of the effect of entomopathogenic nematodes on different developmental stages of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Acarologia*, 64(2), 323–334. <https://doi.org/10.24349/1hyi-f1vq>.

ALEKSEEV, E.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. *BioControl*. v. 51, p. 507-518, 2006.

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. New York: Cabi Publishing, 2002. p. 1-33.

ALVES, L.F.; ROHDE, A.C.; ALVEZ, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*. v. 34, p. 139-141, 2005.

ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F. D.; SOARES, M. A.; BARROS, J. C.; MILLER, R. J.; PÉREZ De LEÓN, A. A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 2, 2011. 127-133 p.

ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F. D.; SOARES, M. A.; BARROS, J. C.; MILLER, R. J.; PÉREZ De LEÓN, A. A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 20, n. 2, 2011. 127-133 p.

ARRIGONI, E. B.; DINARDO, L. L.; CONDE, A. J.; TERÁN, F. O. Aplicação de *Neoplectana carpocapsae* Weiser, 1955 em condições de campo para o controle de *Migdolus* spp. (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologia Brasileira*, v. 8, p. 181-189, 1986.

BARBOZA, I. A. Análise do efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* em condições simuladas de campo Dissertação de Mestrado. Programa Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico de São Paulo. 2022.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223p.

CAMARGO-MATHIAS MI. Guia Básico de Morfologia Interna de Carrapatos Ixodídeos; 2013.

CARDOSO, R.; MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A.; BATISTA, E.S.P. Effect of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) Isolate Santa Rosa on the biological parameters of engorged nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Arquivos do Instituto Biológico*. v. 80, p. 237-241, 2013.

CASSIANO, L. L. Implementação de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de transmissão para pesquisa de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. Dissertação de

Mestrado. Programa Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico de São Paulo. 2015.

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

DOLINSKI, C & A. MOINO JR. 2006. Utilização de nematoides entomopatogênicos Nativos ou Exóticos: O Perigo das Introduções. *Nematologia Brasileira*. v. 30, p. 139-149.

DOLINSKI, C. Uso de entomopathogenic nematodes para o controle de pragas. In: Venzon, M.; Paula JR, T.J.; Pallini, A. (Org.). *Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças*, p. 261-289, 2005.

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; AANDALÓ, V.; LEITE, L. G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. *Nematoda*, v. 4, 2017. DOI: 10.4322/nematoda.01017.

DRUMMOND, R.O., ERNST, S.E., TREVINO, J.L., GLADNEY, W.J., GRAHAM, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66,130–133. <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>.

EL-SADAWY, H.A.E.; HABEEB, S.M. Testing some entomopathogenic nematodes for the biocontrol of *Hyalomma dromedarii* Koch (Acarina: Ixodidae). *Journal of the Union of Arabian Biologists*. v., p. 1–11, 1998.

FERRAZ, L.C.C.B. Nematoides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FAPESP & FEALQ. 1998. p.541-569.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL strain (*Steinernema*: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

FILGUEIRAS, M. D. G, Matos RS, Barreto LP, Mascarin GM, Rizzo PV, Freitas FMC, de Azevedo Prata MC, Monteiro C, Fernandes ÉKK. From the laboratory to the field: efficacy of entomopathogenic nematodes to control the cattle tick. *Pest Manag Sci*. 2023 Jan;79(1):216-225.

FURLONG, J. (Org.). *Carrapatos: problemas e soluções*. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005, v. 1, 65 p.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVE, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, v. 129, 2004. 353-366 p.

GREWAL, P. S. et al. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. *Journal of Nematology, Marceline*, v. 35, n. 2, p. 146–156, 2003.

GREWAL, P. S. et al. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. *Journal of Nematology, Marceline*, v. 35, n. 2, p. 146–156, 2003.

- GREWAL, P.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*. v. 19, p. 245-253, 1994.
- GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R., BARROS, A. T., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H., LEÓN, A. A., PEREIRA, J. B., VILLELA, H. S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 23:150–156.
- GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, v. 2528, p. 1-28, 2010. Disponível.
- HASSANAIN, M.A.; DERBALA, A.A.; ABDEL-BARRY, N.A. EL-SHERIF, M. A. & EL-SADAWY, H. A. E. (1999). Biological control of ticks (Argasidae) by entomopathogenic nematodes. ***Egyptian Journal of Biological Pest Control***. v.7, p. 41–46.
- HAZIR, S.; KAYA, H.K.; STOCK, P.; KESKIN, N. Entomopatogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*. v. 27, p. 181-202, 2003.
- HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. *Medicine Chemistry*, v. 5, 2015. 326-333 p.
- HILL, D.E. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Parasitology*. v. 84, p. 1124–1127, 1998.
- KAYA, H.K. Soil Ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (ed). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, CRC Press. 1990. p. 93-115.
- KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B. D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; De La CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 8, n. 1, 2017. 73-80 p.
- KOLLER, W.W.; HIGA, S.O.L.; ZIMMERMANN, P.N.; OSHIRO, M.L.; ANDREOTTI, R. Resistência dos carrapatos aos acaricidas, p. 148-150 *Revista EMBRAPA. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinas, Campo Grande – MS, 2019.*
- KOLLER, W.W.; HIGA, S.O.L.; ZIMMERMANN, P.N.; OSHIRO, M.L.; ANDREOTTI, R. Resistência dos carrapatos aos acaricidas, p. 148-150 *Revista EMBRAPA. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinas, Campo Grande – MS, 2019.*
- KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; TAORMINO, S. P. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 65, n. 2, p. 193-199, mar. 1995. DOI: 10.1080/09583159631280.



KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in Southern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 52, n. 1, 2015. 28-37 p.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, 2016. 1-15 p.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AGUILHERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI JR. 2003. Patogenicidade de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (NEMATODA: 90 RHABDITIDA) a ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-acucar (Mahanava fimbriolata). *Revista de Agricultura*. v. 78, p.139-148, 2003.

LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; BOTELHO, P. S. M.; BATISTA FILHO, A.; POLANCZYK, R. A.; SCHIMIDT, F. S. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leuxothyreus* sp. em cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 42, n. 1, p. 40-48, 2012.

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

MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica. 2. ed. São Paulo: Gráfica-Editora Michalany, 1990. p.40-112.

MICHEL, T.; SOUZA, U.; DALL'AGNOL, B.; WEBSTER, A.; PETERS, F.; CHRISTOFF, A.; LUZA, A. L.; KASPER, N.; BECKER, M.; FIORENTIN, G.; KLAFKE, G.; VENZAL, J.; MARTINS, J. R.; JARDIM, M. M. M.; OTT, R.; RECK, J. *Ixodes* spp. (Acari: Ixodidae) ticks in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Systematic and Applied Acarology*, v.22, 2017. 2057-2063 p.

MONTEIRO, C.M.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; SOARES, A.E.; BATISTITA, E.S.P.; DOLINSKI, C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. v. 170, p. 355–358, 2010.

MONTEIRO, C.M.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; SOARES, A.E.; BATISTITA, E.S.P.; DOLINSKI, C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. v. 170, p. 355–358, 2010.

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; FAZZA, A.P.; SILVA, A.M.R.; ANDALÓ, V.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. v. 106, p. 821–826, 2010b.

MONTEIRO C,M, PRATA MC, FURLONG J, FAZA AP, MENDES AS, ANDALÓ V, MOINO-JUNIOR A. Heterorhabditis amazonensis (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). Parasitol Res. 2010 Mar;106(4):821-6. doi: 10.1007/s00436-010-1720-6. Epub 2010 Feb 3. PMID: 20127363.

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. Controle biológico do carrapato dos bovinos Rhipicephalus microplus com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e desafios. In: Controle do carrapato do boi. Controle no pasto, 2013, Nova Odessa. Controle do carrapato do boi. Controle no pasto, 2013.

MONTEIRO C, COELHO L, DE PAULA LGF, FERNANDES ÉKK, DOLINSKI C, BITTENCOURT VREP, FURLONG J, PRATA MCA. Efficacy of entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulation against engorged females of Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) in semi-field conditions. Ticks Tick Borne Dis. 2020 Jan;11(1):101313.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL strain (Steinernema: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

NANZER, S. L.L. Assessment of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria to control the stink bugs *Euschistus heros* and *Dichelops melacanthus* in the soybean-corn succession system: Dissertação de Mestrado. Programa Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico de São Paulo. 2022.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the Taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the Description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and Reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). Ticks and Tick-borne Diseases, v. 5, p. 252–276, 2017.

NGUYEN, K. B., SHAPIRO-ILAN, D. I., FUXA, J. R., WOOD, B. W., BERTOLOTTI, M. A., & ADAMS, B. J. (2006). Taxonomic and Biological Characterization of *Steinernema rarum* Found in the Southeastern United States.

OLIVEIRA, C. J.; CAVASSANI, K. A.; MORÉ, D. D.; GARLET, G. P.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. International Journal for Parasitology, v.38, n.6, p.705-716, 2008.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU) objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) São Paulo,2023 <https://www.un.org/en/academic-impact/spanish-language-taller-unai-sobre-los-ods-la-agenda-2030-y-la-contribuci%C3%B3n-de-las>. Acesso em 15 de março de 2024.

RATH, S., SCHRODER, C. H. K., SILVA, C. R., DE OLIVEIRA FERREIRA, F., DIONIZIO, A. C., & DAL BOSCO, S. M. (2016). Avermectinas no agronegócio brasileiro: uma solução ou um problema? *Veterinária e Zootecnia*, 23(1), 8-24.

RODRIGUES, D.C. (2023) ATIVIDADE CARRAPATICIDA DO FLURALANER SOBRE *Rhipicephalus microplus* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E DE CAMPO. Tese de doutorado. Programa Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos. 2023.

SAMISH, M. & I. GLAZER. 2001. Entomopatogenic nematodos for the bioncontrol of ticks. *Trends in parasitology*, Londres, 17 (8): 368-371.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (Eds). *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. p. 447-469.

SAMISH, M.; GLAZER, I. Entomopatogenic nematodos for the bioncontrol of ticks. *Trends in Parasitology*. v. 17, p. 368-371, 2001.

SCHMITT, A. T.; GOWEN, S. R.; HAGUE, N. G. M. Baiting techniques for the control of *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae) by *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematropica*, v. 22, n. 2, p. 159-163, Dec. 1992.

SHAPIRO-ILAN, D.; DOLINSKI, C. Entomopathogenic nematode application technology. In: CamposHerrera, R. (Ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. [S.l.]: Springer International Publishing, 2015. p. 231-254.

SIDAN NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL (SIDAN) Representatividade por classe terapêutica. São Paulo, 2021. Disponível em <[https://sindan.org.br/wp-content/uploads/2022/06/Fechamento-Mercado2021\\_div.pdf](https://sindan.org.br/wp-content/uploads/2022/06/Fechamento-Mercado2021_div.pdf)>. Acesso em 15 de março de 2024.

SILVA, M.S.O, *Steinernema rarum* para o controle de *Sphenophorus levis*, *Hyponeuma taltula* e *Leucothyreus* sp. na cultura da cana-de-açúcar e sua compatibilidade com vinhaça. Dissertação de Mestrado. Programa Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico de São Paulo. 2021.

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Biological Control*. v. 62, p. 140-143, 2012.

SOUSA, D. P.; OLIVEIRA, M. P. B.; FAUSTINO, M. A. G.; Avaliação “in vitro” da atividade do extrato de andiroba (*Carapa guianensis*) sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). In: JORNADA DE ENSINO, 192 MARIA IZABEL CAMARGO-MATHIAS (ED.) PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 5., 2005, Recife. Anais. Recife, 2005.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora*

CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. v. 94, p. 201–206, 2004.

VERÍSSIMO, C. J.; SILVA, R. G.; OLIVEIRA, A. A. D.; RIBEIRO, W. R.; ROCHA, U. F. Contagens de ínstares do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos mestiços. *Boletim de Indústria Animal*, v. 54, n.2, 1997. 21-26 p.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel Babesia and Hepatozoon agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 3, 2016. 449-456 p.