

Universidade do Estado do Amazonas-UEA
Programa de Pós-graduação Mestrado em Biotecnologia e Recursos
Naturais da Amazônia.

Epitácio Cardoso Dutra de Alencar e Silva

Ação carrapaticida do extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* em
carrapatos da espécie *Boophilus microplus*

Manaus-Amazonas
2010.

Epitácio Cardoso Dutra de Alencar e Silva

Ação carrapaticida do extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* em carrapatos da espécie *Boophilus microplus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Ademir Castro e Silva

**Manaus-Amazonas
2010.**

Epitácio Cardoso Dutra de Alencar e Silva

**Ação carrapaticida do extrato bruto de *Pycnopus sanguineus* em
carrapatos da espécie *Boophilus microplus***

Dissertação de mestrado

Comissão examinadora:

Dr. Ademir Castro e Silva
Orientador

Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro
Membro

Dra. Claudete Catanhede do Nascimento
Membro

**Manaus-Amazonas
2010.**

Ao pai-poeta Alencar e Silva.
A rosa-mater Nair.
Ao meu esteio Rita.
Aos frutos do nosso amor:
Karina, Rodolfo e Virgínia.
Aos meus queridos irmãos.
É para vocês!

Agradecimentos

A Deus (G.A.D.U.) presente em todos os momentos e a cada instante da minha vida.

A querida Rita pelo companheirismo, amizade e amor dedicados, sempre apoiando e incentivando a minha busca por uma melhor realização profissional.

Aos nossos filhos: Karina, Rodolfo e Virgínia, razões da nossa jornada e que tiveram maturidade suficiente para entender as nossas falhas e ausências.

Os meus familiares que sempre acreditaram em mim e que sem eles eu nada seria. Meu pai Joaquim e minha mãe Nair; meus irmãos Rita (e sobrinhos), Cecília, Hilma e Saulo.

Ao IFAM – Campus Zona Leste, na pessoa do seu Diretor Geral, professor José Maurício do Rêgo Feitoza, agradeço a todo seu corpo docente, discente e administrativo.

À coordenação, na pessoa da professora Dr^a. Sandra Zanotto, do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais-MBT da Universidade do Estado do Amazonas-UEA.

Ao professor Dr. Ademir Castro e Silva, pelo incentivo, apoio, amizade e valiosa orientação.

Ao companheiro Emerson Bacelar pelo altruísmo e sensibilidade.

A todos os colegas do mestrado, em especial a Dolores Fonseca, pela ajuda imensurável.

A professora Dr^a. Helena Camarão Telles Ribeiro pelo apoio e confiança em mim depositados.

Aos professores e servidores administrativos do curso de mestrado em Biotecnologia, pelo aprendizado, paciência e troca de experiência.

E a todos que ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

O *Boophilus microplus* é um carrapato bovino com ampla distribuição mundial, onde buscou-se com esse trabalho, caracterizar a ação carrapaticida do fungo amazônico *Pycnopus sanguineus*. Foram testados solventes com diferentes polaridades para extração de biomoléculas do carpóforo do fungo *Pycnopus sanguineus*. Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações do extrato bruto de *Pycnopus sanguineus* sobre a sobrevivência de larvas de *Boophilus microplus*. Calculou-se o percentual da mortalidade das fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* nas diferentes concentrações do extrato bruto de *Pycnopus sanguineus*, bem como, a sua taxa de postura de ovos em relação à eficácia do produto testado. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biorgânica do Mestrado em Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, onde testou-se: a sensibilidade larval em papéis impregnados e a sensibilidade das fêmeas ingurgitadas em testes de imersão. De modo geral, nos bioensaios com larvas os experimentos com extrato aquoso foram os que apresentaram melhor taxa de mortalidade decorrida 144 horas de experimento. Neste extrato, a concentração de 50% já apresentou alta porcentagem de mortalidade nas primeiras 48 horas de teste (~86%) totalizando 100% de mortalidade 144 horas após o início do teste. Ao contrário do que ocorreu para a taxa de mortalidade no teste com larvas, no teste com fêmeas ingurgitadas, o extrato bruto etanólico foi o que apresentou melhor resultado. Na concentração de 12,5% desse extrato, a mortalidade alcançou 100% das teleóginas decorridos 120 horas do teste, enquanto que para a concentração de 6,25%, no mesmo espaço de tempo, provocou uma mortalidade de teleóginas de 80%. Nesta mesma concentração (6,25%), o extrato aquoso, apresentou somente 30% de letalidade para as fêmeas ingurgitadas, com 120 horas após o teste iniciado. De modo geral, o extrato etanólico apresenta eficácia superior àquele aquoso. Na concentração de 12,5%, por exemplo, de extrato etanólico a eficácia atinge 90%, enquanto que numa concentração duas vezes maior o extrato aquoso atinge somente 50% de eficácia. Na concentração de 6,25% o extrato etanólico mostra um eficiência cerca de 45% maior do que a do extrato aquoso. O desenvolvimento de produtos que possam ser testados a campo e comercializados a preços competitivos serão passos a serem seguidos. Os biocarrapaticidas têm um apelo comercial grande, permitindo controlar *B. microplus* de um modo menos agressivo ao meio ambiente.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*. *Pycnopus sanguineus*. Extrato etanólico. Teleóginas.

Carrapaticida

ABSTRACT

Boophilus microplus it is a bovine tick with ample world-wide distribution, where one searched with this work, to characterize the Acaricides action of fungus Amazonian *Pycnopus sanguineus*. They had been tested solvent with different polarities for extraction of biomolecules of carpophores of fungus *Pycnopus sanguineus*. The effect of different concentrations of the crude extract was evaluated of *Pycnopus sanguineus* on the survival of larvae of *Boophilus microplus*. The percentage of the mortality of the engorged females was calculated of *Boophilus microplus* in the different concentrations of the crude extract of *Pycnopus sanguineus*, well as, its tax of fertile ovule in relation to the effectiveness of the tested product. The experiments had been lead in the Bioorganic laboratory of the Master Degree in Biotechnology of the University of the State of Amazon, where it was tested: larval sensitivity in impregnated papers and the sensitivity of the females engorged in immersion tests. In general way, in the biotests with larvae the experiments with watery extract had been the ones that had presented tax of passed mortality better 144 hours of experiment. In this extract, the 50% concentration already after presented high percentage of mortality in first the 48 hours of test (~86%) totalizing 100% of mortality 144 hours the beginning of the test. In contrast of what the ethanolic crude extract occurred for the tax of mortality in the test with larvae, in the test with engorged females, it was what it presented better resulted. In the concentration of 12,5% of this extract, mortality reached 100% of the passed engorged female 120 hours of the test, whereas for the concentration of 6.25%, in the same time space, provoked a mortality of engorged females of 80%. In this same concentration (6, 25%), the watery extract, only presented 30% of lethality for the females engorged with 120 hours after the initiated test. In general way, the ethanol extract presents superior effectiveness to that watery one. In the 12,5% concentration, for example, of ethanolic extract the effectiveness reaches 90%, whereas in a bigger concentration two times the watery extract only reaches 50% of effectiveness. In the 6, 25% concentration of ethanolic extracts shows efficiency about 45% greater of what of the watery extract. The development of products that can be tested the field and be commercialized the competitive prices will be steps to be followed. The bioacaricides has one appeal great advertising, allowing controlling *B. microplus* in a less aggressive way to the environment.

Word-key: *Boophilus microplus*. *Pycnopus sanguineus*. Etanólico extract. Engorged female. Acaricides.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Classificação Zoológica	16
Tabela 02 – Classificação dos Fungos	18
Tabela 03 – Divisão dos Fungos e seus filios	19
Tabela 04 – Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 50%	34
Tabela 05 - Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 35%	35
Tabela 06 - Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 25%	35
Tabela 07 - Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 10%	35
Tabela 08 - Mortalidade larval no controle	36
Tabela 09 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 35%	36
Tabela 10 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 20%	37
Tabela 11 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 10%	37
Tabela 12 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 5%	37
Tabela 13 - Mortalidade larval no controle	38
Tabela 14 - Porcentagem de mortalidade em teste com papéis impregnados.	39
Tabela 15 - Mortalidade de em extrato aquoso na concentração de 25%	40
Tabela 16 – Postura de ovos na concentração de 25%	40
Tabela 17 - Mortalidade de em extrato aquoso na concentração de 6.25%	40
Tabela 18 - Postura de ovos na concentração de 6.25%	40

Tabela 19 - Mortalidade de em extrato aquoso na concentração de 4.75%	41
Tabela 20 - Postura de ovos na concentração de 4.75%	41
Tabela 21- Mortalidade de em extrato aquoso na concentração de 3.12%	42
Tabela 22 - Postura de ovos na concentração de 3.12%	42
Tabela 23 - Mortalidade de teleóginas no controle	42
Tabela 24 - Postura de ovos no controle	43
Tabela 25 - Mortalidade de em extrato etanólico na concentração de 12.5%	43
Tabela 26 - Postura de ovos na concentração 12.5%	43
Tabela 27 - Mortalidade em extrato etanólico na concentração de 6.25%	44
Tabela 28 - Postura de ovos na concentração 6.25%	45
Tabela 29 - Mortalidade de em extrato etanólico na concentração de 4.75%	45
Tabela 30 - Postura de ovos na concentração 4.75%	45
Tabela 31 - Mortalidade de em extrato etanólico na concentração de 3.12%	46
Tabela 32 - Postura de ovos na concentração 3.12%	46
Tabela 33 - Mortalidade de teleóginas no controle	46
Tabela 34 - Postura de ovos no controle	47
Tabela 35 - Porcentagem de mortalidade de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações e extratos.	48
Tabela 36 - Influência do tipo de extrato e concentração na ovipostura das fêmeas ingurgitadas.	49
Tabela 37 - Eficácia dos extratos	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Material coletado na Reserva Ducke	27
Figura 02 – Rebanho bovino do IFAM	28
Figura 03 – Coleta de Teleóginas em locais com boa irrigação sanguínea	28
Figura 04 - Sequencia produção de larvas	29
Figura 05 – Extrato aquoso e extrato etanólico de larvas	30
Figura 06 – Teste larval em extrato aquoso	31
Figura 07 – Teste larval em extrato etanólico	31
Figura 08 – Teste de imersão em extrato aquoso com Teleóginas	33
Figura 09 – Teste de imersão em extrato etanólico	33
Figura 10 - Repetição 2, na concentração 6.25%, em 120 horas	44
Figura 11 - Repetição 2, no controle, em 120 horas com 100% de teleóginas	47
Figura 12 -. Eficácia dos extratos em diferentes concentrações. (I) Extrato aquoso (II) Extrato etanólico	50
Figura 13 - Ovipostura inibida	51
Figura 14 - Ovipostura normal	51
Figura 15 - Comparação de mortalidade média geral (%) dos solventes sobre <i>Boophilus microplus</i> nos três métodos utilizados.	52
Figura 16 – Mortalidade causada por óleos essenciais em <i>Boophilus Microplus</i>	55
Figura 17 - Eficácia dos concentrados sobre <i>Boophilus microplus</i>	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Características dos carrapatos.....	16
3.2. Características dos fungos.....	17
3.3 O controle do carrapato.....	19
4 MATERIAL E MÉTODO.....	27
4.1.Obtenção do <i>Pycnopus sanguineus</i>	27
4.2 Obtenção do carrapato <i>Boophilus microplus</i>	28
4.3 - Preparação dos extratos.....	29
4.4 - Sensibilidade larval em papéis impregnados.....	30
4.5 - Sensibilidade das fêmeas em testes de imersão.....	32
5 RESULTADO	34
5.1 Teste Larval em Papéis Impregnados.....	34
5.1.1 Extrato bruto aquoso	34
5.1.2 Extrato bruto etanólico.....	36
5.2 Teste com fêmeas (Teleóginas).....	39
5.2.1 Extrato bruto aquoso	39
5.2.2 Extrato bruto etanólico.....	43
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO.....	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O *Boophilus microplus* é um carrapato com ampla distribuição mundial, estando presente na faixa contida entre os paralelos 32° N e 32° S. O carrapato bovino tem destacada importância nos países da América Latina, África e Oceania. O carrapato foi erradicado na América do Norte. No Brasil, esse carrapato foi introduzido com o gado trazido pelos primeiros colonizadores e atualmente encontra-se distribuído em quase todos os estados da federação. O carrapato parasita principalmente os bovinos por ser extremamente específico, mas pode esporadicamente parasitar outros animais, tais como eqüinos e ovinos (GONZALES, 1974). Seu nome deriva do grego, significando: Boo = boi; philus = amigo; microplus = menor; ou seja, o “menor amigo do boi”.

Os carrapaticidas têm sido o principal meio de controle do *B. microplus*, entretanto a capacidade desse parasita tornar-se resistente, tem prejudicado muito a aplicação dos carrapaticidas. Quando a resistência se instala, o produtor freqüentemente aumenta a dose do pesticida ou a freqüência das aplicações (THULLNER, 1997). O uso indiscriminado dos defensivos químicos afeta o ambiente, os animais e as pessoas, mas com o uso de produtos de origem natural, o desequilíbrio ecológico e a contaminação ambiental poderiam ser minimizados (HERNÁNDEZ et al., 1987).

Nesse aspecto, o interesse biotecnológico em fungos é na produção de compostos com atividade farmacológica, uma área explorada em biotecnologia por empresas de países industrializados. Os antibióticos são os produtos microbianos tradicionalmente

mais explorados nesta área. Entretanto, novos compostos têm sido investigados em escala industrial, como por exemplo: agentes antitumorais, inibidores enzimáticos e agentes cardiovasculares. A aplicação de microrganismos na produção de fármacos teve um desenvolvimento acelerado a partir da descoberta dos antibióticos, na década de 30 (LACAZ, 2002). No caso específico, é a capacidade biocida do fungo *Pycnoporus sanguineus*, que foi investigada.

A saúde animal, o melhoramento genético e a alimentação adequada constituem o tripé no qual se apóia o desenvolvimento de qualquer sistema de exploração dos animais. Sem estado de higidez, o animal, reduz seu rendimento, deixa de produzir economicamente ou simplesmente não produz, mesmo sob condições ambientais favoráveis e tecnologia zootécnica adequada. O baixo desempenho dos animais tem sido atribuído a diversos fatores, destacando-se as infestações pelo carrapato *Boophilus microplus*, considerado um problema para a bovinocultura nacional.

No Brasil, as condições climáticas permitem o desenvolvimento e a sobrevivência do carrapato durante o ano todo, em várias regiões, em níveis mais que suficientes para causar perdas. Este ectoparasito foi registrado em quase todos os estados da federação, num total de 2962 municípios (~60%).

2 OBJETIVOS

2.1 - Geral

Caracterizar ação carrapaticida do fungo amazônico *Pycnopus sanguineus*.

2.2 - Específico

- Testar solventes com diferentes polaridades para extração de biomoléculas do carpóforo do fungo *Pycnopus sanguineus*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato bruto de *Pycnopus sanguineus* sobre a sobrevivência de larvas de *Boophilus microplus*.
- Calcular o percentual da mortalidade das fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* nas diferentes concentrações do extrato bruto de *Pycnopus sanguineus*, bem como, a sua taxa de postura de ovos em relação à eficácia do produto testado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características dos carrapatos.

A subclasse Acari, da classe Arachnida, à qual pertencem os carrapatos e outros ácaros é um grupo muito heterogêneo, apresentando grande diversidade de hábitos e habitats (GUIMARÃES et al, 2001). Os carrapatos, particularmente, pertencem à ordem Ixodida. Esta ordem pode ser dividida em três famílias: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae. Os exemplares de *Boophilus* agrupam-se em cinco espécies, sendo o *Boophilus microplus* a mais difundida e única encontrada no Brasil, conforme Tabela 01.

Reino <i>Metazoa</i> Filo <i>Arthropoda</i> Sub-Filo <i>Chelicerata</i> Classe <i>Arachnida</i> Sub-classe <i>Acari</i> Super Ordem <i>Parasitiformes</i> Ordem <i>Ixodida</i>	Sub-ordem <i>Metastigmata</i> Família <i>Ixodidae</i> Grupo <i>Metastrata</i> Sub-família <i>Rhipicephalinae</i> Gênero <i>Boophilus</i> Espécie <i>Boophilus microplus</i>
--	--

Tabela 01 – Classificação Zoológica, Canestrini, 1887.

3.2 Características dos fungos.

Os fungos constituem o grupo mais diverso de eucariontes em ambiente terrestre depois dos insetos, devido à sua ampla distribuição e associação com substratos inorgânicos e orgânicos (GEWIN, 2002; HOLF et al., 2004). Fries, em 1825, estimou em 140 mil as espécies de fungos; no entanto, a partir de 1990, as estimativas variam de 1,5 a 13,5 milhões (LODGE et al. 1995, LODGE & CANTRELL 1995, LODGE 2001). A mais aceitável por micólogos e em trabalhos de biodiversidade global é de 1,5 milhão de espécies. Proposta por HAWKSWORTH (2001), desta estimativa menos de 7% das espécies estão descritas e identificadas.

Os fungos são geralmente considerados como uma classe de organismos altamente especializados. Estes seres, igualmente aos animais, não são capazes de sintetizar açúcar e amido a partir de dióxido de carbono presente na atmosfera, conseqüentemente, devem buscar outras matérias orgânicas para alimentarem-se. Praticamente, qualquer material orgânico obtido de plantas ou animais pode sustentar algumas espécies de fungos. Na sua grande maioria os fungos são filamentosos e multicelulares. Possuem o corpo formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas, e o seu conjunto recebe o nome de micélio. As hifas variam no diâmetro, espessura da parede e localização do pigmento (PUTZKE, 2004).

O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem a outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado. As estruturas reprodutivas são diferenciadas dos vegetais, o que constitui a base sistemática dos fungos (PUTZKE e PUTZKE, 1998). A variação morfológica é muito

grande, existindo espécies macro e microscópicas o que contribui para existência de muitos sistemas de classificação (Tabela 02) que ainda hoje sofrem adições e alterações (PUTZKE, 2004).

Alexopoulos et al (1996)	Hawksworth et al (1995)	Hawksworth et al (1983)
<p>Reino Stramenopila Filo Oomycota Filo Hyphochytridiomycota Filo Labyrinthulomycota</p> <p>Reino Protistas Filo Dictyosteliomycota Filo Acrasiomycota Filo Myxomycota Filo Plasmodiophoromycota</p> <p>Reino Fungi Filo Chytridiomycota Filo Zygomycota Filo Ascomycota Filo Basidiomycota</p>	<p>Reino Chromista Filo Hyphochytridiomycota Filo Labyrinthulomycota Filo Oomicota</p> <p>Reino Protozoa Filo Acrasiomycota Filo Dictyosteliomycota Filo Myxomycota Filo Plasmodiophoromycota</p> <p>Reino Fungi Filo Chytridiomycota Filo Zygomycota Filo Ascomycota Filo Basidiomycota</p>	<p>Reino Fungi Divisão Myxomycota Divisão Eumycota</p> <p>Subdivisões: Mastigomycotina Zygomycotina Ascomycotina Basidiomycotina Deuteromycotina</p>

Tabela 02 – Classificação dos Fungos

Os fungos apresentam-se como cosmopolitas, ou seja, encontram-se distribuídos em todas as regiões do planeta, porém de maior incidência em ambientes de clima tropical, quente e úmido. Podem ser encontradas no solo, águas, sobre animais e vegetais, em alimentos naturais e industrializados (TEIXEIRA et al., 2001; BONONI,1999)

A classificação dos fungos está baseada nas diversas formas de corpos frutíferos, que geralmente se desenvolvem na superfície externa do substrato de onde o fungo cresce. O reino fungi está dividido em cinco filios que estão representados na Tabela 03.

Tipos de fungos	Filos
Fungos aquáticos	Oomycota
Fungos terrestres	Zygomycota
Trufas, bolores verdes, amarelos e vermelhos	Ascomycota
Cogumelos, ferrugens e carvões	Basidiomycota
Fungos do tipo <i>Penicillium</i>	Deuteromycota

Tabela 03. Divisão dos fungos e seus filos.

Os fungos juntamente com as bactérias heterotróficas são os principais decompositores de materiais lignocelulósicos da biosfera. Vários fungos estão associados a degradar dejetos e detritos de esgotos até um grau em que possam ser considerados adubo ou substância equivalente. Ecologicamente podem ser considerados os lixeiros do mundo, por degradarem todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas (NEUFELD,1997; PUTZKE, 2002, 2004).

3.3 O controle do carrapato

O controle do *B. microplus* nos últimos anos tem tido um grande avanço, pelo estabelecimento de conhecimentos da biologia e dos modelos epidemiológicos deste

carrapato, do manejo dos rebanhos e das pastagens, da resistência racial e do desenvolvimento de carrapaticidas. Um controle eficiente do carrapato em uma propriedade depende de vários fatores relacionados com o rebanho (tamanho, raça, cruzamentos), pastagem (variedades e lotação), parasito (número de gerações, eficácia dos medicamentos), sistema de produção, clima, época do ano, etc. O controle deste artrópode se processa quase que exclusivamente pela utilização de produtos químicos durante a sua fase parasitária, o que corresponde apenas a 5% do total da população de carrapatos numa propriedade. A tentativa de controle nesta fase foi iniciada no século passado, com a aplicação de substâncias como azeite, parafina, petróleo, cal e tabaco, de forma absolutamente empírica, e a partir de 1895, na Austrália, foram utilizados compostos arsenicais, que passaram a ser empregados no Brasil na primeira década de 1900.

Existem vários tipos de solventes que fazem parte das formulações carrapaticidas ou que são utilizados em experimentos com extratos vegetais. Eles têm a principal finalidade de solubilizar o princípio ativo, proporcionando a distribuição homogênea do mesmo por toda a cutícula do artrópodo, ampliando sua área de ação. São poucos os trabalhos comparativos com relação à interferência dos diferentes solventes no resultado final de um experimento, ou ainda se diferentes estádios de um parasita reagem diferentemente na presença de um mesmo solvente. SHAW (1966) demonstra que a DL_{50} de "dioxathion" (fosforado) diluído em xilol é de 0,00015%, enquanto que em nafta aromática pesada passa a ser de 0,00035%. Segundo BEADLES et al. (1973), sempre é importante distinguir entre o efeito do produto como um todo e dos demais componentes da fórmula sem o princípio ativo, incluindo aí os solventes. Este é o procedimento que tem

sido preconizado pela Organização Mundial para a Alimentação e a Agricultura das Nações Unidas (FAO PLANT PROTECTION BULLETIN, 1971).

Com o desenvolvimento da resistência contra drogas antiparasitárias, a indústria tem hesitado em investir na pesquisa de novos defensivos químicos. O tempo de comercialização de um novo produto é de difícil cálculo, mas certamente limitado em função da rápida aquisição de resistência (UILENBERG, 1996). O uso de muitos dos carrapaticidas atuais afetam o meio ambiente e outros organismos, fazendo com que se busquem alternativas urgentes para os produtos químicos comerciais (DUNKEL, 1998). Os metabólitos secundários de plantas têm sido utilizados como pesticidas ou modelos para pesticidas sintéticos, como o toxafeno, as piretrinas, a nicotina e a rotenona (BALANDRIN et al. 1985; DUKE, 1998). Os monoterpenos são metabólitos secundários que podem causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas de insetos herbívoros (BRATTSTEN, 1998). No entanto, as maiorias dos monoterpenos são pouco tóxicas (dentro das primeiras 72h depois da aplicação) para os mamíferos (KLOCKE, et al., 1987; RICE, 1994). Alguns monoterpenos têm sido considerados, alternativas potenciais aos inseticidas comerciais sintéticos, já que geralmente são reconhecidos como seguros pela United States Food and Drug Administration, sendo utilizados em muitos produtos de uso humano: condimentos artificiais, perfumes e em inúmeras formulações de expectorantes, descongestionantes, analgésicos externos e anti-sépticos (TEMPLETON, 1998; WINDHOLZ, et al. 1998).

Os estudos com as plantas ainda estão no início, porém, um estudo sobre a ação biocida de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus staigeriana* no carrapato *Boophilus microplus*, buscando-se a produção de acaricidas menos agressivos

ao meio ambiente. Os óleos essenciais das três espécies e os concentrados emulsionáveis de *E. globulus* e *E. staigeriana* foram testados em cinco concentrações diferentes contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. Os óleos foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), a fim de se investigar sua composição. O citronelal é o principal componente do óleo de *E. citriodora*, sendo responsável por sua ação acaricida. O que age sinergicamente contra *B. microplus*. O óleo essencial de *E. citriodora* matou 100% dos carrapatos a uma concentração média de 17,5%, o de *E. globulus* a 15% e o de *E. staigeriana* a 12,5%. Os concentrados emulsionáveis de *E* mesmo ocorre com o 1,8-cineol em *E. globulus*. Em *E. staigeriana* existem várias substâncias. *globulus* mataram 100% dos carrapatos a uma concentração média de 9,9% e o de *E. staigeriana* a uma concentração de 3,9%. O desenvolvimento de produtos que possam ser testados a campo e comercializados a preços competitivos serão passos a serem seguidos. Os biocarrapaticidas têm um apelo comercial grande, permitindo controlar *B. microplus* de um modo menos agressivo ao meio ambiente (CHAGAS et al, 2002).

Os experimentos envolvendo o uso de acaricidas sintéticos ou naturais, geralmente necessitam da utilização de um solvente. Com a finalidade de verificar a sensibilidade do carrapato bovino *Boophilus microplus* a diferentes solventes, larvas e fêmeas ingurgitadas deste ectoparasito foram expostas a sete solventes em cinco diferentes concentrações, na ausência e presença de azeite de oliva. Os resultados mostraram que a utilização do azeite de oliva não produz resultados diferentes estatisticamente em testes de larvas com papel impregnado, fato não verificado em testes de imersão de adultos com compostos hidrofílicos. A mortalidade média causada pelos solventes foi menor nos testes com papel impregnado, aumentando nos testes de imersão de larvas e de adultos. Solventes de

baixo peso molecular e pouca viscosidade como o álcool metílico e o álcool etílico, não interferiram na mortalidade média em testes biológicos de *B. microplus*, principalmente em concentrações inferiores a 76% (CHAGAS et al, 2003).

A produção de vacinas, cujo principal efeito no controle progressivo do número de carrapatos é a redução na capacidade reprodutiva, surgiu na década de 30. Atualmente existem as vacinas recombinantes de tecnologias australiana e cubana. Estas vacinas utilizam proteínas purificadas da membrana das células do intestino do carrapato, denominadas Bm86 e Bm91, para imunizar os animais, que irão produzir anticorpos que lesam principalmente o intestino do carrapato. Estas vacinas não asseguraram ao rebanho o grau de proteção desejado. A vacina Gavac, comercializada no Brasil desde 1996, foi desenvolvida por pesquisadores cubanos e sua utilização se faz aplicando-se uma dose e repetindo-se após quatro semanas, seguida por aplicações semestrais, por apresentar proteção imune de apenas seis meses. A eficácia desta vacina variou de 60 a 80%. No Brasil, vários grupos de pesquisadores vêm trabalhando no desenvolvimento de vacinas recombinantes e sintéticas, contudo estas não são ainda comercializadas por falha na indução de proteção suficiente para o seu uso isolado no controle de carrapatos ou por falta de testes controlados em bovinos a campo. Proteínas de larvas (IBMTI) e de ovos (BYC) de *B. microplus* vêm sendo estudadas na tentativa de desenvolvimento de vacinas recombinantes. Uma vacina sintética, elaborada com o peptídeo sintético (SBm4912), foi testada em bovinos das raças Jersey, Holandês e Hereford apresentando uma eficiência de 80% na eliminação das populações de carrapatos.

Quanto aos predadores naturais, verifica-se que vários predadores vertebrados (aves, ratos, camundongos e sapos) e invertebrados (formigas, aranhas, "tesourinhas")

foram apontados como predadores potenciais de fêmeas, parcial ou totalmente ingurgitadas, e ovos de *B. microplus*. Desses inimigos naturais, destacam-se aves, tais como a "garça vaqueira" (*Egretta íbis*) e as galinhas domésticas (*Gallus domesticus*).

A seleção para resistência entre insetos ou doenças leva a uma dependência por novos princípios ativos e/ou maiores dosagens dos produtos utilizados no seu controle. Isso aumenta os riscos de intoxicação e de contaminação do ambiente e alimentos produzidos. A elaboração de novos biocidas (defensivos sanitários vegetais ou animais) atravessa dificuldades devido ao gradual aumento de custo e demora em se chegar a novas fórmulas que se comprovem eficazes. Um produto homeopático para controle do *B. microplus* vem sendo comercializado no Brasil, contudo existe a necessidade de testes controlados por pesquisadores especializados em carrapatos para avaliação da sua eficiência. O produto possui veículo alcoólico contendo parasitas. Por isso, algumas pesquisas nessa área estão voltando-se à busca de substâncias naturais, contidas em outros organismos vivos, como os fungos (BIANCHIN et al., 1999; DANTAS et al., 2000).

O controle biológico do carrapato por meio da utilização de fungos entomopatogênicos (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*), e plantas com poderes acaricidas tem sido foco de pesquisas por todo o Brasil. Os fungos estão sendo, inclusive, comercializados, porém, os resultados de pesquisa com bovinos estabulados com o *Metarhizium* indicam uma eficácia em torno de 50% (CASTRO et al., 1997).

O aparecimento de *B. microplus* resistentes a diversas gerações de acaricidas foi notificado em diversas regiões do Brasil, em consequência do manejo incorreto, especialmente a freqüente exposição aos medicamentos e banhos com concentrações baixa do produto. Dos sete grupos de carrapaticidas registrados no Brasil, o ácaro já tem

resistência total ou parcial a cinco deles. O fenômeno de resistência é a capacidade que determinados artrópodes apresentam para tolerar doses de medicamentos que seriam letais para a maioria dos indivíduos em uma população da mesma espécie. Esta capacidade para "inativar" produtos químicos é devido à seleção de indivíduos que possuem fatores genéticos para resistência em baixa frequência, que são elevados com a pressão da utilização dos carrapaticidas. O primeiro sinal do aparecimento da resistência é quando um produto, aplicado de forma correta, não causa a morte dos carrapatos. A resistência pode acontecer com qualquer base carrapaticida e é revelada pelo biocarrapaticidograma, que deve ser realizado por veterinário especializado no assunto. Uma vez estabelecida a resistência a um grupo químico, devemos considerar as seguintes alternativas: aumentar a concentração do produto; usar intervalos curtos de banhos (quatro a seis dias) para atingir estágios mais jovens do carrapato; uso de associações entre princípios ativos ou a troca do grupo químico. Ressalta-se, que as duas primeiras opções podem possibilitar a intoxicação dos animais e aumentar o custo do tratamento. A crescente preocupação com a contínua introdução de produtos químicos no meio ambiente, o seu alto custo, toxidez e o aparecimento da resistência, demandou a busca de outros métodos de controle do *B. microplus*.

Os carrapatos ixodídeos são ectoparasitas obrigatórios, cuja sobrevivência depende de mecanismos para se localizar, fixar-se e alimentar-se em hospedeiros vertebrados. Por sua total dependência do sangue e tecidos de seus hospedeiros, os carrapatos atuam como vetores de uma série de agentes infecciosos como protozoários, vírus, bactérias e riquétsias para o homem e animais. A transmissão de patógenos nestes ácaros pode ser transestadial e transovariana. É importante lembrar que os carrapatos só perdem para os mosquitos como transmissores de agentes infecciosos para o homem.

Além de sua competência como vetores, causam danos diretos por hematofagia, traumas locais e paralisia via toxinas.

Em termos econômicos, os carrapatos são responsáveis por prejuízos de grande monta. É estimada uma perda global anual de oito bilhões de dólares. Segundo estimativas do Ministério da Agricultura, eles causam prejuízos ao rebanho brasileiro de mais de dois bilhões de dólares ao ano, levando-se em conta retardo no desenvolvimento dos animais pela inoculação de toxinas nos hospedeiros, promovendo diversas alterações e conseqüências fisiológicas, como a inapetência alimentar; diminuição na produção de leite e carne; mortalidade; consumo de carrapaticidas; investimentos em equipamentos e mão de obra para o controle e a qualidade do couro. Ainda não há um estudo completo sobre a perda de peso e produção de leite, contudo, em algumas raças, os bovinos chegam a perder 0,24 kg de peso vivo/carrapato/ano e diminuir sua produção de leite em 8,9 mL/dia. Isso tudo associado à transmissão de agentes patogênicos, principalmente os responsáveis pela babesiose e anaplasmose (Tristeza Parasitária Bovina) provocando uma letargia nos animais parasitados. Devem-se ter cuidados especiais no controle a esse carrapato, por se apresentar como uma fonte de prejuízo à criação bovina, principalmente nos núcleos de raças européias de corte e leite. Entretanto, nas regiões onde se explora o zebuíno, esse parasito não deve deixar de ser considerado, pois em situações especiais de manejo que levam ao estresse, tais como a deficiência alimentar, as altas concentrações por hectare, e desmame interrompido ou precoce, sua presença torna-se importante não só como agente espoliativo ou tóxico, como também pela transmissão da TPB.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biorgânica do Mestrado em Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, em Manaus, entre os meses de abril a setembro de 2009.

4.1 – Obtenção do *Pycnoporus sanguineus*.

Para a realização deste trabalho, o fungo *Pycnoporus sanguineus* pertencente a classe basidiomycetes, foi obtido nas imediações de Manaus (AM): pastagens do IFAM(zona leste de Manaus), Reserva Ducke (AM-010, km 25) (Fig. 1) e ramal do Pau Rosa (BR-174, km 21), bem como, no município de Parintins (AM), distante 369 km de Manaus.



FIGURA 1 – Fungo coletado na Reserva Ducke

4.2 - Obtenção do carrapato *Boophilus microplus*

Para a obtenção das larvas de *B. microplus*, utilizou-se fêmeas ingurgitadas provenientes do rebanho bovino (*Bos taurus*) leiteiro do Instituto Federal do Amazonas (IFAM) – Campus Zona Leste, antiga Escola Agrotécnica Federal de Manaus (EAFM). A coleta (09/05/2009) de fêmeas ingurgitadas (teleóginas) foi feita no período em que o rebanho bovino não sofreu nenhuma pulverização de carrapaticidas (Figuras 2 e 3). Utilizou-se somente larvas com 14 a 21 dias de idade, ou seja, eclosões ocorridas na 2ª quinzena de maio de 2009 (Figura 4).



FIGURA 2 – Rebanho bovino do IFAM



FIGURA 3 – Coleta de teleóginas em locais com boa irrigação sanguínea.



FIGURA 4 – Sequência da produção de larvas.

4.3 - Preparação dos extratos

Serão testados dois extratos do fungo obtidos a partir de solventes com diferentes gradientes de polaridade, para a retirada dos componentes ativo do carpóforo do fungo. Estes serão triturados em moinho de facas e passados em peneira de 60 mesh.

Para 53 gramas do material triturado foram acrescentado 1000 ml do solvente, no caso água destilada e filtrada em sistema Milliq (0,022 μm), com rendimento de 500 ml em cada uma das três extrações a frio, a cada 48 horas. O extrato foi submetido à

temperatura de 50 °C por 48 horas, sendo obtidos 3,85 gramas do produto. A mesma metodologia foi aplicada em 58 gramas de material triturado, na extração com álcool etílico (95 GL), sendo obtidos 2,64 gramas do produto. Estes produtos foram utilizados nos bioensaios com larvas.

Nos bioensaios com fêmeas ingurgitadas, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima. Obteve-se de 44.3 gramas de material triturado, após duas extrações aquosa, 3.55 gramas do produto. Após três extrações alcoólica a frio, obteve-se de 44.3 gramas de fungo triturado, 2.33 gramas do produto (Figura 5).



FIGURA 5 – Extrato aquoso (esquerda) e extrato etanólico (direita).

4.4 - Sensibilidade larval em papéis impregnados

Foram feitas duas repetições para cada concentrado de álcool etílico, água, além do controle contendo água. Estas substâncias são consideradas de fácil aquisição. Os

extratos foram testados nas concentrações de 50, 35, 25 e 10% (água destilada e filtrada) e 35, 20,10 e 5% (álcool etílico 95 GL).

Para a realização do teste utilizou-se a técnica adaptada por LEITE (1988): aproximadamente 60 larvas foram colocadas entre 02 pedaços de papel-filtro, com 6 cm de diâmetro, impregnados pelo solvente (0,4mL para cada repetição). Este "sanduíche" foi colocado em placas de Petri (PS 60x15 mm) e lacradas com papel-filme, adaptação feita baseando-se em FAO PLANT PROTECTION BULLETIN (1971). As placas foram colocadas em estufa climatizada ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e UR > 80%) e o registro de larvas vivas e mortas foi realizado após 48, 96 e 144 horas (Figuras 6 e 7). Para calcular a mortalidade das larvas usaram-se as fórmulas abaixo:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de indivíduos mortos} \times 100}{\text{Total de indivíduos}}$$

$$\text{Mortalidade média (\%)} = \frac{\text{Mortalidade Rep. 1} + \text{Mortalidade Rep. 2}}{2}$$

2



FIGURA 6 – Teste larval em extrato aquoso



FIGURA 7 – Teste larval em extrato etanólico

4.5 - Sensibilidade das fêmeas ingurgitadas em testes de imersão

Seguindo-se metodologia semelhante à descrita por DRUMMOND et al. (1973), grupos de 10 fêmeas foram imersas por cinco minutos nos mesmos solventes. Sendo feitas duas repetições para cada um deles: álcool etílico, água, além do controle contendo água.

Os extratos foram testados nas concentrações de 25, 6.25, 4.75 e 3.12% (água) e 12.5, 6.25, 4.75 e 3.12% (álcool etílico). Foram colocadas em placas de Petri (PS 60x15 mm) e lacradas com papel-filme, sendo a seguir, acondicionadas em estufa climatizada ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e UR > 80%).

O registro das fêmeas vivas e mortas foi realizado após 48, 72 e 120 horas. Tiveram sua taxa de postura de ovos (oviposição) estimada visualmente, nos mesmos intervalos de tempo (Figuras 8 e 9).

A mortalidade das fêmeas ingurgitadas foi calculada a partir da mesma fórmula usada para as larvas, já a taxa de postura em relação a eficácia do produto, foi calculada a partir da fórmula adaptada de DRUMMOND et al. (1973):

$$EP = \frac{TP \text{ grupo controle} - TP \text{ grupo tratado} \times 100}{TP \text{ grupo controle}}$$

Onde:

EP = Eficácia do Produto (%)

TP = Taxa de Postura (%)

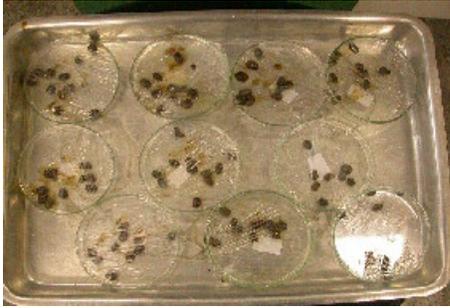


FIGURA 8 – Teste de imersão em extrato aquoso com teleóginas



FIGURA 9 – Teste de imersão em extrato etanólico com teleóginas.

5. RESULTADOS

5.1 Teste Larval em Papéis Impregnados:

5.1.1 Extrato bruto aquoso

Foram utilizadas 60 (sessenta) larvas em cada amostra.

Concentração: 50 %

Repetição (02/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	18	82	-	-	0	100
2	15	85	-	-	0	100
3	10	90	-	-	0	100
MÉDIA	14.3	85.7	-	-	0	100

Tabela 04 - Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 50%

Concentração: 35%

Repetição (02/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	87	13	-	-	0	100
2	84	16	-	-	0	100
3	76	24	-	-	0	100
MÉDIA	82.3	17.7	-	-	0	100

Tabela 05 - Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 35%

Concentração: 25%

Repetição (02/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	100	0	44	56
2	100	0	100	0	41	59
3	100	0	100	0	0	100
MÉDIA	100	0	100	0	28.3	71.7

Tabela 06 - Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 25%

Concentração: 10%

Repetição (02/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	0	100	0	100
2	100	0	0	100	0	100
3	100	0	100	0	95	5
MÉDIA	100	0	33	67	31.6	68.4

Tabela 7 - Mortalidade larval em extrato aquoso na concentração de 10%

Controle:

Repetição (02/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	100	0	100	0
2	100	0	100	0	100	0
3	100	0	100	0	100	0
MÉDIA	100	0	100	0	100	0

Tabela 8 - Mortalidade larval no controle

5.1.2 Extrato bruto etanólico

Foram utilizadas 60 (sessenta) larvas em cada amostra.

Concentração: 35%

Repetição (03/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	-	-	100	0
2	100	0	-	-	100	0
3	100	0	-	-	100	0
MÉDIA	100	0	-	-	100	0

Tabela 9 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 35%

Repetição (03/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	-	-	100	0
2	100	0	-	-	100	0
3	100	0	-	-	100	0
MÉDIA	100	0	-	-	100	0

Tabela 10 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 20%

Concentração: 10%

Repetição (03/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	90	10	-	-	90	10
2	100	0	-	-	92	8
3	100	0	-	-	100	0
MÉDIA	96.6	3.4	-	-	94	6

Tabela 11 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 10%

Concentração: 5%

Repetição (03/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	-	-	100	0
2	100	0	-	-	90	10
3	100	0	-	-	100	0
MÉDIA	100	0	-	-	96.6	3.4

Tabela 12 - Mortalidade larval em extrato etanólico na concentração de 5%

Controle:

Repetição (03/06/09)	48 horas		96 horas		144 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	-	-	95	5
2	100	0	-	-	100	0
3	90	10	-	-	90	10
MÉDIA	96.6	3.4	-	-	95	5

Tabela 13 - Mortalidade larval no controle

De modo geral, nos bioensaios com larvas os experimentos com extrato aquoso foram os que apresentaram melhor taxa de mortalidade decorrida 144 horas de experimento (Tabela14) Neste extrato, a concentração de 50% já apresentou alta porcentagem de mortalidade nas primeiras 48 horas de teste (~86%) totalizando 100% de mortalidade 144 horas após o início do teste. Ressalta-se, por outro lado, que o tratamento controle neste mesmo intervalo de tempo, não ocorreu mortes de larvas. Decorrido o tempo total do teste, na concentração de 10%, a taxa de mortalidade já alcançou uma taxa relativamente alta (68,4%) em comparação aquela mesma concentração para o extrato etanólico que apresentou somente 6% de mortalidade (Tabela 14)

Na realidade, a mortalidade das larvas no teste extrato etanólico alcançou somente algum percentual nas concentrações mais baixas testadas, como na de 5%, onde ocorreu 3,4% de mortalidade observada após 144 horas do início do teste. Interessantemente, para o extrato etanólico, nas concentrações mais altas (20% e 35%), não ocorreu mortalidade larval mesmo decorrido o período total de observação. Ao contrário do que ocorreu para o extrato aquoso, o controle do extrato etanólico apresentou uma taxa de

mortalidade de 5%, similar aquela da concentração de 10%, que causou 6% de letalidade, evidenciando que os componentes ativos desse extrato não atuam de maneira satisfatória para eliminar as larvas do carrapato bovino.

Concentração (%)	Extrato Aquoso		Concentração (%)	Extrato Etanólico	
	48h	144h		48h	144h
50	85.7%	100%	35	0%	0%
35	17.7%	100%	20	0%	0%
25	0%	71.7%	10	3.4%	6%
10	0%	68.4%	5	0%	3.4%
Controle	0%	0%	Controle	3.4%	5%

TABELA 14- Porcentagem de mortalidade de larvas em teste com papéis impregnados.

5.2 Teste com fêmeas ingurgitadas (Teleóginas):

5.2.1 Extrato bruto aquoso

Foram utilizadas 10 (dez) teleóginas em cada tratamento.

Concentração: 25 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	90	10	70	30	10	90
2	90	10	60	40	60	40
MÉDIA	90	10	65	35	35	65

Tabela 15 - Mortalidade de teleóginas em extrato aquoso na concentração de 25%

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	40	60 (normal) 10 (inibida)
2	0	10	30 (inibida)
MÉDIA	0	25	50

Tabela 16- Postura de ovos na concentração de 25%

Eficácia do Produto = 50 %

Concentração: 6,25 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	70	30	70	30
2	100	0	80	20	70	30
MÉDIA	100	0	75	25	70	30

Tabela 17 Mortalidade de teleóginas em extrato aquoso na concentração de 6.25%

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	10	40 (normal) 30 (inibida)
2	0	10	70 (inibida)
MÉDIA	0	10	70

Tabela 18- Postura de ovos na concentração de 6.25%

Eficácia do Produto = 30 %

Concentração: 4,75 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	100	0	90	10
2	100	0	80	20	80	20
MÉDIA	100	0	90	10	85	15

Tabela 19 - Mortalidade de teleóginas em extrato aquoso na concentração de 4.75%

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	10	50 (inibida)
2	0	30	80 (inibida)
MÉDIA	0	20	65

Tabela 20 Postura de ovos na concentração de 4.75%

Eficácia do Produto = 35 %

Concentração: 3,12 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	100	0	100	0
2	100	0	100	0	70	30
MÉDIA	100	0	100	0	85	15

Tabela 21 - Mortalidade de teleóginas em extrato aquoso na concentração de 3.12%

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	10	50 (normal) 50 (inibida)
2	0	0	10 (normal) 60 (inibida)
MÉDIA	0	5	65

Tabela 22 - Postura de ovos na concentração de 3.12%

Eficácia do Produto = 35 %

Controle:

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	100	0	100	0
2	100	0	100	0	100	0
MÉDIA	100	0	100	0	100	0

Tabela 23 - Mortalidade de teleóginas no controle

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	10	60	100 (normal)
2	10	50	100 (normal)
MÉDIA	10	55	100

Tabela 24 - Postura de ovos no controle

5.2.2 Extrato bruto etanólico:

Foram utilizadas de 08 (oito) a 10 (dez) teleóginas em cada tratamento.

Concentração: 12,5 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	70	30	0	100
2	100	0	70	30	0	100
MÉDIA	100	0	70	30	0	100

Tabela 25 - Mortalidade de teleóginas em extrato etanólico na concentração de 12.5%

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	0	10 (inibida)
2	0	0	10 (inibida)
MÉDIA	0	0	10

Tabela 26 - Postura de ovos na concentração 12.5%

Eficácia do Produto = 90 %

Concentração: 6,25 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	50	50	40	60
2	100	0	90	10	0	100
MÉDIA	100	0	70	30	20	80

Tabela 27 - Mortalidade de teleóginas em extrato etanólico na concentração de 6.25%



FIGURA 10 – Repetição 2, na concentração 6.25%, em 120 horas com 100% de mortalidade, onde houve 10% de postura inibida (tabelas 27e 28).

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	0	20 (normal) 20 (inibida)
2	0	10	10 (inibida)
MÉDIA	0	5	25

Tabela 28 - Postura de ovos na concentração 6.25%

Eficácia do Produto = 75 %

Concentração: 4,75 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	75	25	62	38
2	100	0	100	0	40	60
MÉDIA	100	0	87.5	12.5	51	49

Tabela 29 - Mortalidade de teleóginas em extrato etanólico na concentração de 4.75%

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	0	60 (inibida)
2	0	0	20 (inibida)
MÉDIA	0	0	40

Tabela 30 - Postura de ovos na concentração 4.75%

Eficácia do Produto = 60 %

Concentração: 3,12 %

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	75	25	75	25
2	100	0	80	20	20	80
MÉDIA	100	0	77.5	22.5	47.5	52.5

Tabela 31 - Mortalidade de teleóginas em extrato etanólico na concentração de 3.12%

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovopistura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	0	0	37.5 (normal) 37.5 (inibida)
2	0	0	20 (inibida)
MÉDIA	0	0	47.5

Tabela 32 - Postura de ovos na concentração 3.12%

Eficácia do Produto = 52.5 %

Controle:

Repetição (10/08/09)	48 horas		72 horas		120 horas	
	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %	Vivos %	Mortos %
1	100	0	100	0	100	0
2	100	0	100	0	100	0
MÉDIA	100	0	100	0	100	0

Tabela 33 - Mortalidade de teleóginas no controle



FIGURA 11 – Repetição 2, no controle, em 120 horas com 100% de teleóginas vivas, com 100% de postura normal (tabelas 33 e 34).

Repetição (10/08/09)	48 horas Ovipostura (%)	72 horas Ovipostura (%)	120 horas Ovipostura (%)
1	10	10	100 (normal)
2	0	10	100 (normal)
MÉDIA	5	10	100

Tabela 34 - Postura de ovos no controle

Ao contrário do que ocorreu para a taxa de mortalidade no teste com larvas, no teste com fêmeas ingurgitadas, o extrato bruto etanólico foi o que apresentou melhor resultado (Tabela 35). Na concentração de 12,5% desse extrato, a mortalidade alcançou 100% das teleóginas decorridos 120 horas do teste, enquanto que para a concentração de 6.25%, no mesmo espaço de tempo, provocou uma mortalidade de teleóginas de 80%. Nesta mesma concentração (6.25%), o extrato aquoso, apresentou somente 30% de letalidade para as fêmeas ingurgitadas com 120 horas após o teste iniciado.

A mortalidade das fêmeas ingurgitadas somente foi observada após 72 horas do início do teste, com exceção do extrato aquoso que numa concentração elevada (25%) observou-se 10% de mortalidade das teleóginas. Ressalta-se, entretanto, que não

testamos àquela concentração de 25% para o extrato etanólico e, portanto, não temos elementos suficientes para afirmar se nesse extrato e mesma concentração ocorre qualquer mortalidade após 48 horas. Podemos afirmar, por outro lado, que na concentração de 6.25% o extrato etanólico apresenta uma percentagem de mortalidade cerca de 50% maior do que o extrato aquoso, decorridos 120 horas de testes.

Concentração (%)	Extrato Aquoso			Concentração (%)	Extrato Etanólico		
	48h	72h	120h		48h	72h	120h
25	10%	35%	65%	12.5	-	30%	100%
6.25	-	25%	30%	6.25	-	30%	80%
4.75	-	10%	15%	4.75	-	12.5%	49%
3.12	-	-	15%	3.12	-	22.5%	52.5%
Controle	0%	0%	0%	Controle	0%	0%	0%

Tabela 35 Percentagem de mortalidade de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações e extratos.

Em relação a influência de diferentes concentrações dos extratos na ovopostura, o extrato aquoso mostra uma menor influência na inibição da postura de ovos pelas fêmeas ingurgitadas (Tabela 36). A postura no extrato aquoso chega a 70%, enquanto que para o extrato etanólico esse percentual atinge um máximo próximo de 48% após 120 horas de teste.

De modo geral, há uma tendência do percentual de postura aumentar a medida que diminui a concentração nos dois extratos, no entanto, no extrato etanólico essa tendência é menor que no extrato aquoso (Tabela 36).

Concentração (%)	Ovipostura em Extrato Aquoso			Concentração (%)	Ovipostura em Extrato Etanólico		
	48h	72h	120h		48h	72h	120h
	25	0	25%		50%	12,5	0
6.25	0	10%	70%	6.25	0	5%	25%
4.75	0	20%	65%	4.75	0	0	40%
3.12	0	5%	65%	3.12	0	0	47.5%
Controle	10%	55%	100%	Controle	5%	10%	100%

Tabela 36 - Influência do tipo de extrato e concentração na ovipostura das fêmeas ingurgitadas.

Na tabela 37 podemos verificar a eficácia do produto em diferentes concentrações nos dois extratos é inversamente proporcional à postura de ovos.

Extrato	Concentração (%)	Eficácia (%)
Aquoso	25	50
	6.25	30
	4.75	35
	3.12	35
Extrato	Concentração (%)	Eficácia (%)
Etanólico	12.5	90
	6.25	75
	4.75	60
	3.12	52.5

Tabela 37 Eficácia dos extratos.

A Figura 12 mostra a eficácia dos extratos em relação a ovipostura. De modo geral, o extrato etanólico apresenta eficácia superior àquele aquoso. Na concentração de 12,5%, por exemplo, de extrato etanólico a eficácia atinge 90%, enquanto que numa concentração duas vezes maior o extrato aquoso atinge somente 50% de eficácia. Na concentração de 6,25% o extrato etanólico mostra um eficiência cerca de 45% maior do

que a do extrato aquoso. Para o extrato etanólico a eficácia apresenta uma relação linear com a concentração, diminuindo a medida que esta também diminui (Figura 12, II) ao contrário do extrato aquoso onde a eficácia aumenta a medida que a concentração diminui (Figura 12, I).

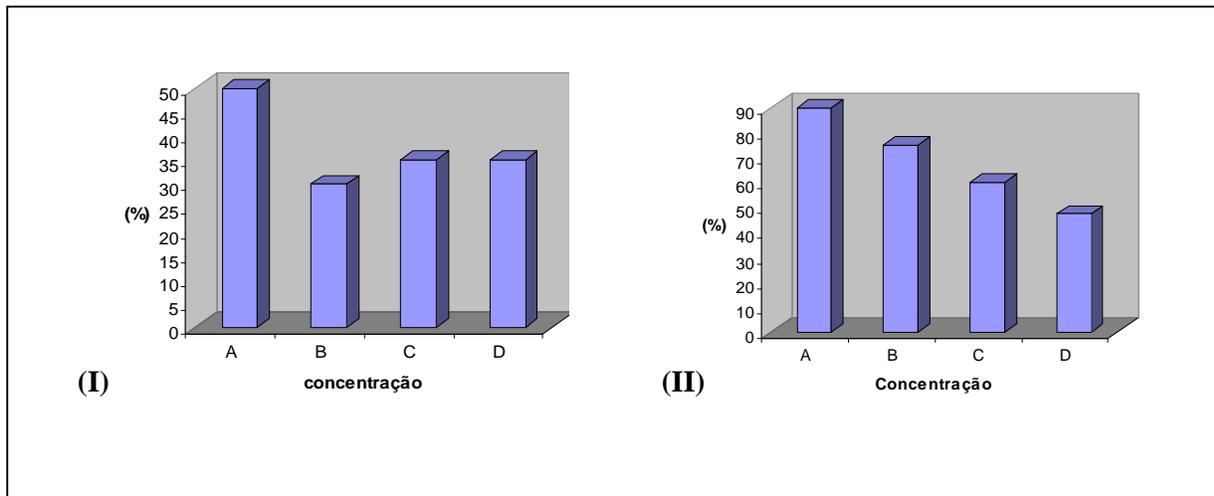


FIGURA 12. Eficácia dos extratos em diferentes concentrações. **(I)** Extrato aquoso: A= 25%, B= 6,25%, C= 4,75%, D= 3,12%. **(II)** Extrato etanólico A= 12,5%, B= 6,25%, C= 4,75%, D= 3,12%.

Nos bioensaios com teleóginas feitos em extrato aquoso, com observação feita aos 10 dias (240 horas), verificou-se não haver diferença do controle para os demais tratamentos, pois, ainda acontecia postura em todos eles.

Nos bioensaios com teleóginas feitos em extrato alcoólico, com observação feita aos 10 dias (240 horas), a diferença do grupo controle é visível, pois ainda se encontravam indivíduos vivos, enquanto que nos demais tratamentos já estavam todos mortos.

O que denominamos de ovipostura inibida, é quando verificamos que houve uma interrupção no processo normal de postura, em relação ao observado nos grupos controle (Figuras 13 e 14).



FIGURA 13 – Ovipostura inibida



FIGURA 14 – Ovipostura normal

6. DISCUSSÃO

No teste com papel impregnado, as larvas de *B. microplus* não sofreram ação letal superior a 5% diante do álcool etílico, na concentração de 100%. A imersão de fêmeas causou mortalidade média geral de 55,1%, a imersão de larvas de 40,5% e na metodologia de papéis impregnados para larvas, causou mortalidade de 30,4% (Figura 15). A mortalidade média causada por solventes é menor nos testes com papéis impregnados em larvas, aumentando nos testes de imersão de fêmeas. As fêmeas ingurgitadas são mais sensíveis aos solventes do que as larvas. (CHAGAS et al, 2003).

Tabela 3 - Comparação de mortalidade média geral (%) dos solventes sobre *Boophilus microplus* nos três métodos utilizados.

Solventes	Contato larva	Imersão larva	Imersão fêmea
Álcool metílico	2,3 a	3,9 a	19,5 a
Álcool etílico	3,5a	1,0 a	24,6 a
Acetona	2,2 a	3,9 a	40,1 b
DMSO	100 b	76,4 b	64,6 c
Acetato de etila	2,7 a	85,3 b	71,9 c
Triton	2,4 a	30,7 c	66,9 c
Xilol	100 b	82,6 b	98,1 d
Média	30,4	40,5	55,1

*Média com a mesma letra, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,005$)

FIGURA 15 – Comparação de mortalidade média geral (%) dos solventes sobre *Boophilus microplus* nos três métodos utilizados.

A mesma situação foi observada neste trabalho, onde foi verificado que a mortalidade de larvas em papel impregnados foi maior no extrato aquoso do que no extrato etanólico.

De uma maneira geral, as fêmeas se mostraram mais sensíveis aos solventes do que as larvas, embora estas ficassem 5 minutos a mais em contato com os mesmos no teste de imersão (CHAGAS et al, 2003).. Segundo ODHIAMBO (1982), no início do processo de alimentação a espessura da cutícula aumenta, mas depois ela é esticada e se torna de espessura igual ou parecida à da larva. Durante a alimentação nos ixodídeos, a síntese cuticular aumenta bastante, mas quando a cutícula está esticada ao final deste processo, ela volta praticamente à sua espessura original (GEROLT, 1970). Pouca informação foi encontrada a respeito desse processo especificamente em *B. microplus*, mas tudo indica que a espessura da cutícula não justificaria a maior sensibilidade das fêmeas aos solventes (CHAGAS et al, 2003).

Mesmo com a carência de informações do processo descrito acima, verificamos em nosso trabalho que realmente há uma sensibilidade maior de fêmeas ingurgitadas a solventes, haja vista, que a mortalidade em extrato etanólico, neste experimento, foi de 100% após 120 horas de teste, na concentração de 25%.

Através da Figura 16, observa-se que os óleos essenciais foram potencializados quando transformados em concentrados emulsionáveis, principalmente para larvas. Para um bioativo funcionar, ele precisa ser hidrofílico e lipofílico para ser absorvido, pois todos os artrópodos têm esses dois meios de absorção. Quando um produto como um óleo natural está muito concentrado, ocorre o fenômeno físico chamado apassivação, onde o produto é inicialmente absorvido, mas depois forma um filme apassivador, barrando a

passagem do óleo. Quando ele está mais diluído, este filme não se forma e a penetração ocorre mais lentamente, porém de maneira muito mais devastadora. O óleo puro de eucalipto é somente lipolítico possuindo assim menor absorção. Como concentrado emulsionável, tornou-se lipolítico e hidrofílico, sofrendo um equilíbrio eletrônico através de dois tensoativos. Estes reduzem o tamanho das partículas do óleo e modificam as forças entre as moléculas da água, permitindo que as moléculas dos monoterpenos penetrem facilmente na água, formando o concentrado emulsionável. Este é mais agressivo que o óleo, pois as partículas estão menores, tornando-se mais biodisponíveis para penetrar e agir sobre *B. microplus*. Os concentrados emulsionáveis contendo 25% de óleo foram mais eficazes contra as fêmeas em função da presença de um solvente, que amplia a área de ação do produto, distribuindo os bioativos homoganeamente na cutícula. Com relação à Figura 16, observa-se que os concentrados contendo 90% do óleo têm uma variação maior na eficácia ao longo das concentrações, mas ao mesmo tempo agem em concentrações menores nas larvas. Já os concentrados com 25% de óleo, têm sua ação mais homogênea, mas produzem eficácia máxima sobre as fêmeas ingurgitadas somente em concentrações maiores (CHAGAS et al, 2002).

Tabela 1

Mortalidade (mort.) causada pelos óleos essenciais puros e concentrados emulsionáveis (conc. 90 e 25%) das três espécies de eucalipto, sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* (média ± desvio padrão), em diferentes concentrações (Juiz de Fora, 2001)

Espécie	LARVA				FÊMEAINGURGITADA			
	óleo puro (%)	mort. (%)	conc. 90% (%)	mort. (%)	óleo puro (%)	mort. (%)	conc. 25% (%)	mort. (%)
<i>E. citriodora</i>	1	0 = 0	*	*	5	45 ± 12,3	*	*
	5	47 ± 3,7	*	*	10	73 ± 9,7	*	*
	10	100 ± 0	*	*	15	94 ± 5,9	*	*
	20	100 ± 0	*	*	20	99 ± 0,9	*	*
	30	100 ± 0	*	*	25	100 ± 0	*	*
<i>E. globulus</i>	1	0 = 0	4	63 ± 6,2	5	98,5 ± 2,2	0,12	36 ± 12,6
	5	0,7 = 0,5	4,9	85 ± 9,4	10	100 ± 0	1,2	64,5 ± 6,8
	10	48 ± 4,9	5,7	96 ± 0,3	15	100 ± 0	3,1	74 ± 11,1
	20	100 ± 0	6,5	99 ± 0,3	20	100 ± 0	6,2	97,5 ± 2,1
	30	100 ± 0	7,3	100 ± 0	25	100 ± 0	12,5	100 ± 0
<i>E. staigeriana</i>	1	40 ± 5,1	0,2	0 ± 0	5	91 ± 5,1	0,12	24 ± 16,3
	5	96 ± 2,6	0,4	6,5 ± 2,9	10	94 ± 5,9	1,2	81 ± 8,6
	10	100 ± 0	0,8	91 ± 3,4	15	100 ± 0	3,1	98 ± 1,5
	20	100 ± 0	1,6	100 ± 0	20	100 ± 0	6,2	100 ± 0
	30	100 ± 0	2,5	100 ± 0	25	100 ± 0	12,5	100 ± 0
	controle	5,5 ± 1,8	controle	0 ± 0	controle	0 ± 0	controle	0 ± 0

* teste não realizado

FIGURA 16 – Mortalidade causada por óleos essenciais em *Boophilus microplus*

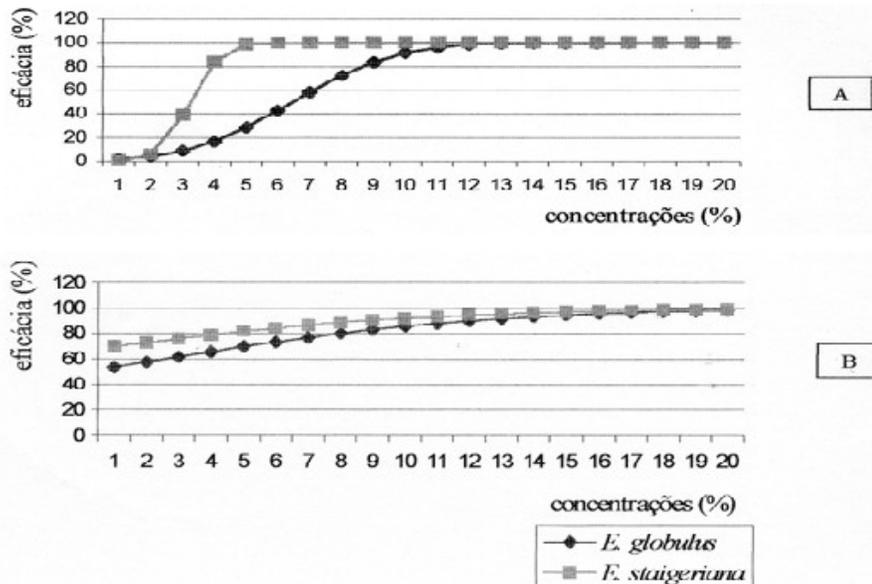


Figura 1

Eficácia média estimada dos concentrados emulsionáveis de *E. globulus* e *E. staigeriana* sobre de *B. microplus*, em diferentes concentrações (%): em A, a ação do concentrado emulsionável a 90% sobre larvas e, em B, ação do concentrado emulsionável a 25% sobre fêmeas ingurgitadas

FIGURA 17 – Eficácia dos concentrados sobre *Boophilus microplus*

Talvez possamos explicar, através dos processos descritos acima, que um bioativo para funcionar, precisa ser lipolítico e hidrofílico para ser melhor absorvido pelos artrópodes. As biomoléculas do carpóforo do fungo *Pycnoporus sanguineus*, provavelmente possuam estas características. De qualquer forma, podemos comprovar que, em fêmeas ingurgitadas prevaleceu a ação do extrato etanólico e em larvas o extrato aquoso. Quanto à eficácia do produto testado para fêmeas ingurgitadas, no caso, extrato etanólico, é inversamente proporcional a postura de ovos e diretamente proporcional a diminuição da concentração testada.

7. CONCLUSÃO

Nos bioensaios com larvas podemos concluir que:

- a melhor recomendação para o controle, nesta fase, é o extrato aquoso;
- em todas as concentrações testadas houve uma taxa de mortalidade superior a 68%, neste caso específico na concentração de 10%;
- ficando a sugestão para se testar uma concentração letal, mais econômica, abaixo desta;
- nos tratamentos a base extrato etanólico, a taxa de mortalidade não foi superior a 6%.
- Nos bioensaios com fêmeas ingurgitadas (teleóginas) podemos concluir que:
 - a melhor recomendação para o controle nesta fase do ciclo de vida do carrapato, é o produto a base do extrato etanólico;
 - em todas as concentrações testadas houve uma taxa de mortalidade associada a eficácia do produto aplicado, superior a 52.5%;
 - nos experimentos em que foi usado extrato aquoso, somente na concentração de 25% foi observada uma eficácia do produto de 50% e uma taxa de mortalidade igual a 65%,
 - nas outras concentrações tanto a taxa de mortalidade quanto a eficácia do produto não foram superior a 35%.

Para testes de campo, poderia ser recomendado o controle de teleóginas com extrato etanólico à concentração de 3.12%, pois além de ser mais econômico, é nesta fase que o produtor nota a infestação do rebanho.

O desenvolvimento de produtos que possam ser testados a campo e comercializados a preços competitivos serão passos a serem seguidos. Os biocarrapaticidas têm um apelo comercial grande, permitindo controlar *B. microplus* de um modo menos agressivo ao meio ambiente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALANDRIN, M.F. et al. *Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials*. Science, v.228, p. 1154-1160, 1985.

BEADLES, M.L.; DRUMMOND, R.O.; WHETSTONE, T.M. *Tropical horse tick: effects of solvents on oviposition*. J Econ Entomol, v. 66, p. 125-127, 1973.

BONONI, V.L.R. Zigomicetos, Bazidiomicetos e Deuteromicetos. Noções básicas de taxonomia e aplicações Biotecnológicas. Instituto de Botânica, secretaria do Estado de Meio Ambiente. São Paulo-SP. 1999.

BRATTSTEN, L.B. Cytochrome *P-450* involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores. In: DUNKEL, F.V. & SEARS, L.J. *Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, Artemisia tridentata Nutt. Ssp. vaseyana (Rydb.) beetle for stored grain insects*. Journal of Stored Products Research, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

CASTRO, A.B.A. de, BITTENCOURT, V.R.E.P., DAEMON, E., VIEGAS, E.C. *Eficácia do fungo Metarhizium anisopliae sobre o carrapato Boophilus microplus em teste de estábulo*. Rev. Univ.Rural, Sér. Ciênc. Vida, v.19, n.1-2, p.73-82, 1997.

CHAGAS, ACS; PASSOS,WM; PRATES,HT; LEITE,RC; FURLONG,J; FORTES,ICP. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.39 n.5 São Paulo 2002.

CHAGAS, ACS; PASSOS,WM; PRATES,HT; LEITE,RC; FURLONG,J. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. Cienc. Rural v.33 n.1 Santa Maria jan./fev. 2003.

DANTAS, D.A.; MAGANHA, M.; BERETTA, T. E.; NOZU, P.; PEREIRA, G. da S.; MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.; KOLLER, W. W.; GOMES, A. *Estudo fitoquímico dos frutos de Melia azedarach L. (Cinamomo, Meliaceae)*. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIDERP, 2., Campo Grande, 2000. Anais... Campo Grande: UNIDERP, 2000. p. 119-120. Resumo expandido.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. Journal of Economic Entomology, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

DUKE, S.O.; PAUL, R.N.; LEE, S.M. Biologically active natural products – Potencial use in agriculture. In: PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. *Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (Melinis minutiflora Beauv.) and their activity against cattle-tick (Boophilus microplus)*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 9, n. 2, p. 193-197, 1998.

DUNKEL, F.V. & SEARS, L.J. *Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, Artemisia tridentata Nutt. sp. vaseyana (Rydb.) beetle for stored grain insects*. Journal of Stored Products Research, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

FAO PLANT PROTECTION BULLETIN. *Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative methods for larvae of cattle tick Boophilus spp.* FAO method n.º 7, v.19, p.15-18, 1971.

FRIES, E. M. Systema Mycologicum. Vol. 1. Johnson Reprint Corporation, Nova York, 520p. 1821.

GEROLT, P. The mode of entry of contact insecticides. Pestic Sci, v.1, p.209-212, 1970.

GEWIN V. All living things, online. Nature 418: 362-364. 2002.

GONZALES, J.C. *O controle do carrapato dos bovinos*. Porto Alegre : Sulina, 1974. 103p.
GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. *“Ectoparasitos de importância veterinária”* 1 ed. São Paulo. FAPESP – Editora Plêiade. 2001.

HERNÁNDEZ, L. E.; PARRA, D. G.; MARIN, A. C. *Accion repelente y acaricida del Melinis minutiflora sobre el Boophilus microplus*. Rev Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas, v.16, p.17-21, 1987.

HOLF JA, KLOPFENSTEIN NB, TONN JR, MCDONALD GI, ZAMBINO PJ, ROGERS JD, PEEVER TL, CARRIS LM. Roles of Woody Root-Associated Fungi in Forest Ecosystem Processes: Recent Advances in Fungal Identification. USDA Forest Service RMRS-RP-47, Rocky Mountain Research Station. 2004.

KLOCKE, J.A.; DARLINGTON, M.V.; BALANDRIN, M.F. *1,8 cineole (eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of Hemizonia fitchii (Asteraceae)*. Journal of Chemical Ecology, v.13, p.2131-2141, 1987.

LACAZ, C.L. Tratado de Micologia Médica. 9ª ed. São Paulo: ARVIER. 2002.

LEITE, R.C. *Boophilus microplus (Canestrini, 1887): susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiogeográficas da baixada do Grande-Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica*. 1988, 151 f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1988

LODGE DJ. Diversidad Mundial y regional de hongos. 291-304, in Hernández HM, Aldrete HAF, Álvarez F, Ulloa M. Enfoques contemporâneos para el estudio de la biodiversidad. México, Instituto de Biología, UNAM. 2001.

LODGE DJ, CANTRELL S. Fungal communities in wet tropical forest: variation in time and space. Canadian Journal Botany 73(1): 1391-1398. 1995.

LODGE DJ, CHAPELA I, SAMUELS G, UECKER FA, DESJARDIN D, HORAK E, MILLER OK, HENNEBERT GL, DECOCK AA, AMMIRATI J, BURDSALL HHJ, KIRK PM, MINTER DW, HAILING R, LAESSOE T, MUELLER G, HUHNDORF S, OBERWIENKLER F, PEGLER DN, SPOONER B, PETERSEN RH, ROGERS JD, RYVARDEN L, WATLING R, TURNABULL E, WHALLEY AJS. A Survey of Patterns of Diversity in Non-Lichenized Fungi. Mitt. Eidgenöss. Forsh.anst. Wald Schnee Landsch 70(1): 157-173. 1995.

NEUFELD, P. Micologia. Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro - RJ. 1997.

ODHIAMBO, T.R. Current themes in tropical science: physiology of ticks. Oxford : Pergamon, 1982. V.1, 508p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T.L. Os Reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul, Rs: EDUNISC. 1998.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os Reinos Dos Fungos. Vol. 2. 2ed . Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2004.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os Reinos Dos Fungos. Vol. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2002.

RICE, P.J.; COATS, J.R. *Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae).* Journal of Economic Entomology, v. 87, p. 1172-1179, 1994.

SHAW, R.D. *Culture of an organophosphorus-resistant strain of Boophilus microplus (Can.) and an assessment of its resistance spectrum.* Bull Ent Res, v.56, p.389-405, 1966.

TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; ROCHA, W. C. & FERNANDES, O. C. C. Produção de Compostos Bioativos de Interesse Industrial. Universidade do Amazonas. Fundação UNISOL. Manaus – AM. 2001.

TEMPLETON, W. *An introduction of the chemistry of terpenoids and steroids. In: DUNKEL, F.V. & SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, Artemisia tridentata Nutt. Ssp. vaseyana (Rydb.) bettle for stored grain insects.* Journal of Stored Products Research, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

THULLNER, F. *Impact of pesticide resistance and network for global pesticide resistance management based on a regional structure.* World Anim Review, R M Z, v.89, p.41-47, 1997.

UILENBERG, G. *Integrated control of tropical animal parasitoses. Tropical Animal Health and Production, v. 28, p. 257-65, 1996.*

WINDHOLZ, M. et al. The Merck Index. *In: DUNKEL, F.V.; SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, Artemisia tridentata Nutt. Ssp. vaseyana (Rydb.) bettle for stored grain insects.* Journal of Stored Products Research, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.