



Fotos: Alessandro Minho

COMUNICADO
TÉCNICO

110

São Carlos, SP
Julho, 2022



Metodologia para avaliação da eficácia de antiparasitários na pastagem: carrapatos de interesse médico veterinário

Alessandro Pelegrine Minho
Gustavo Avelar Sousa
Leonardo Aparecido Lima Dos Santos
Luís Adriano Anholetto
Ana Carolina De Souza Chagas

Metodologia para avaliação da eficácia de antiparasitários na pastagem: carrapatos de interesse médico veterinário¹

¹ Alessandro Pelegrine Minho, Médico Veterinário, Dr., pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Gustavo Avelar Souza, Médico Veterinário, aluno de mestrado da UNESP. Leonardo Aparecido Lima dos Santos, Biólogo, aluno de mestrado da UNESP; Luís Adriano Anholetto, Biólogo, pós-doc/FAPESP; Ana Carolina de Souza Chagas, Bióloga, Dra., pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

Introdução

Todas as espécies de carrapatos de interesse em saúde pública e pecuária utilizam-se do ambiente para completar fases de seus ciclos de vida. A população destes parasitas no ambiente é notoriamente maior do que a população em fase parasitária. Cerca de 95% desses parasitas encontram-se dispersos no ambiente e, apenas 5%, fixados nos hospedeiros (Furlong, 2005).

O controle a campo utilizando acaricidas não é expressivamente praticado, tanto por falta de conhecimento de protocolos que sejam realmente efetivos para tal uso, como também pela escassez de produtos comerciais que tenham indicação para esta finalidade.

A pressão para o desenvolvimento de pesquisas visando o emprego de novas metodologias para combate a campo destes ixodídeos é crescente. Assim, são necessárias metodologias que avaliem a eficácia dos produtos testados primeiramente em laboratório e em condições controladas de semicampo

(Araújo et al., 2015), visando uma maior acurácia na validação desses protocolos. Na maioria das vezes, os protocolos partem dos testes *in vitro* diretamente para os testes a campo propriamente ditos, ou são feitos em condições de semicampo, porém sem uma padronização das etapas e procedimentos.

São escassas as descrições de metodologias para testes em campo e semicampo que proponham um modelo prático a ser seguido. A aplicação de carrapaticidas no ambiente, especificamente nos locais de repouso dos hospedeiros e de maior infestação do parasita, pode ser uma alternativa eficaz no manejo integrado visando o controle do carrapato estrela (*Amblyomma sculptum*), diminuindo significativamente os estágios de vida livre do ciclo deste artrópode, principal entrave no controle da Febre Maculosa Brasileira (FMB) (Labruna, 2008).

Observou-se na literatura que várias metodologias foram desenvolvidas para a avaliação de produtos em semicampo,

porém não seguem um padrão definido para a realização dos ensaios. Com base nisso, buscou-se padronizar uma metodologia para a avaliação de produtos acaricidas no controle de ixodídeos, na procura de um modelo que simulasse as condições de campo, o mais fielmente possível.

Bittencourt et al. (2003) avaliaram o fungo *Metharhizium anisopliae* no controle do carrapato bovino (*Rhipicephalus microplus*) na pastagem. Para isso formaram 12 canteiros de um m², distribuídos em quatro fileiras com dois metros de distância uns dos outros, em condições naturais de campo aberto, sendo plantadas em cada canteiro cinco mudas de *B. decumbens* e mantidas à altura da gramínea a 60 cm. Foram utilizados para cada bioensaio 12 canteiros, e para cada um dos três tratamentos foram utilizados quatro canteiros distribuídos em sorteio, sendo cada canteiro infestado com 10 mil larvas de carrapatos (oriundas de 500 mg de ovos). A coleta das larvas foi realizada sete dias após a aplicação das suspensões por meio da técnica da flanela, colocada sobre o canteiro durante 15 minutos, sendo feitas duas contagens, com um intervalo de 15 dias, para o primeiro e segundo bioensaios, e três contagens, com intervalos de uma semana, para o terceiro bioensaio.

Basso et al. (2005) também realizaram experimento de semicampo para avaliação do potencial de controle de larvas de *R. microplus* pelo fungo *M. anisopliae* em pastagens de *Urochloa*

brizantha e Tifton 85 (*Cynodon spp.*). Para isso, em cada uma das duas pastagens foram preparados 30 canteiros divididos em cinco blocos (repetições), formados por seis canteiros com um m² de área, dispostos em três pares dentro do bloco. Os canteiros ficaram lateralmente separados por 6,5 m e frontalmente por 10 m. Cada canteiro teve identificação, manutenção de altura da planta em 25 cm e, em sua volta, manteve-se uma borda limpa de 1,5 m. Em cada forrageira, 15 canteiros foram pulverizados com esporos do fungo e 15 não (controles), constituindo cinco repetições de cada tratamento. Foram infestados artificialmente com número e peso padronizados de 15 fêmeas ingurgitadas do ácaro. A aplicação da solução foi realizada na concentração de $1,8 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ em três situações: pulverização antes da infestação com o carrapato, após a infestação e, posteriormente, à emergência das primeiras larvas nas forrageiras. A contagem de larvas recuperadas foi realizada no 35°, 38°, 41°, 48°, 55° e 61° dia pós-infestação.

Jordan et al. (2011) realizaram a supressão de ninfas dos carrapatos *Ixodes scapularis* e *Amblyomma americanum* fazendo duas aplicações de acaricidas compostos de produtos naturais (solução aquosa contendo 2% do composto nootkatone) por meio de pulverização nas áreas de mata infestadas pelos parasitas em regiões de ocorrência da doença de Lyme em Nova Jersey.

Muniz (2018) realizou bioensaios em condições de semicampo utilizando 28 vasos com medidas de 11 cm de altura e 14 cm de diâmetro para o plantio de mudas de *Brachiaria ruziziensis*. Os vasos do grupo controle foram mantidos à distância mínima de dois metros dos grupos tratamento e à distância de 60 cm de um vaso ao outro, sendo utilizados para avaliação de formulação a base de carvacrol no controle de larvas de *R. microplus*; fitas adesivas foram colocadas em volta das bordas de cada vaso para evitar a fuga das larvas. A soltura das larvas foi realizada na base das plantas (número equivalente a 100 mg de ovos de *R. microplus*), sendo feita a aplicação das concentrações-teste após 24 horas. A contagem e a avaliação das gramíneas foram realizadas 24 horas após a pulverização, para tal, as lâminas de folhas foram cortadas e levadas a laboratório para contagem das larvas com auxílio de uma bomba a vácuo.

Silva (2020) realizou teste de semicampo para avaliação da eficácia de associações de óleos essenciais sobre larvas de *A. sculptum*, que foram colocadas em 24 pequenas parcelas de capim do gênero *Panicum maximum*, estas medindo aproximadamente sete centímetros de raio e 50 cm de altura, espaçadas por um metro umas das outras, sendo divididas em oito parcelas para cada um dos dois tratamentos e oito parcelas controle. Cada uma das parcelas recebeu aproximadamente 500 larvas de carrapato e realizaram a pulverização após uma hora da infestação, com o volume de 35 mL

por parcela. A contagem das larvas foi realizada 24 horas após a pulverização, sendo o capim das parcelas cortado e posteriormente avaliado para contagem de larvas remanescentes. Também foi realizado o arraste de flanela branca nas parcelas após o corte, conforme recomendado por Oliveira et al. (2000).

A frequência e a eficiência da aplicação de acaricidas no ambiente dependem diretamente do grau de infestação, do local e da frequência de uso das áreas pelos hospedeiros naturais, visto que os mesmos circulam livremente no ambiente.

O efeito residual do carrapaticida também é um fator limitante, pois o uso indiscriminado e sem medidas de segurança pode ocasionar contaminação ambiental e toxicidade, tanto para a fauna local quanto para humanos (Torres; Marcondes, 2008; Araújo et al., 2015). Dito isto, as aplicações de acaricidas no ambiente devem ser criteriosamente avaliadas e planejadas, visando, principalmente, o controle de carrapatos que transmitem zoonoses e sistemas de produção em situação crítica quanto à contaminação das pastagens com carrapatos, buscando minimizar ao máximo os impactos ambientais. Assim, este trabalho teve por objetivo sistematizar uma metodologia de testes de semicampo para a avaliação de produtos acaricidas químicos, naturais ou biológicos no controle de ixodídeos de interesse na saúde pública e na medicina veterinária de ruminantes.

Material e métodos

Esse trabalho foi oriundo de ensaios experimentais de projeto Embrapa (SEG 20.18.03.017.00.00), cadastrado no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SIGGEN nº A2B3CA6) e na Comissão de Ética no Uso de Animais do CPPSE (CEUA nº 01/2019).

- Preparo das parcelas de forrageiras

Os experimentos foram desenvolvidos no campo experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos – SP (Latitude: 21°57'42" (S) Longitude: 47°50'28" (W)). Foram formadas 36 parcelas de 1 m² de três espécies diferentes de forrageiras mais comumente utilizadas nas pastagens brasileiras, sendo 12 parcelas de cada gramínea: (I) BRS Zuri, representando o gênero *Panicum maximum*, (II) *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) *brizantha* cv. Marandú, representando o gênero *Urochloa spp* e (III) Tifton 85, sendo representante do gênero *Cynodon*.

- Distribuição das Parcelas

A distância entre as parcelas e a distribuição destas na área destinada ao ensaio experimental foram definidas de acordo com a necessidade de manejo das forrageiras, a fim de facilitar o manuseio, a manutenção e as recuperações de larvas do ambiente, evitando assim

a migração de larvas entre parcelas. Para isso, priorizou-se a distância entre parcelas de dois metros, para que quando as gramíneas crescessem, o corredor ao redor das parcelas ficasse livre para a circulação e manuseio. As parcelas foram estruturadas em três fileiras (uma para cada gramínea), contendo 12 canteiros cada (Figura 1). O entorno da área destinada à formação das parcelas foi cercado com tela para evitar a entrada de animais.

A área do experimento foi previamente preparada com arado e grade niveladora. Na sequência, as parcelas foram demarcadas com estacas de madeira para início do plantio, realizado em fevereiro de 2020, durante a estação chuvosa. As cultivares BRS Zuri e *U. brizantha* cv. Marandú foram plantadas por semeadura, utilizando o espaçamento de 20 cm por linha, totalizando cinco linhas de plantio dentro de cada parcela e a semeadura foi realizada nos sulcos com adubação 20-0-20 (NPK). O Tifton 85 foi plantado por plantio direto de mudas, utilizando cerca de cinco mudas por parcela e adubo 20-0-20 (NPK). Após as gramíneas estabelecidas, foi mantido o manejo de capina e/ou aplicação de herbicida nos corredores, além do corte/desbaste das laterais das parcelas para evitar a migração de larvas e facilitar a circulação da equipe nas coletas.

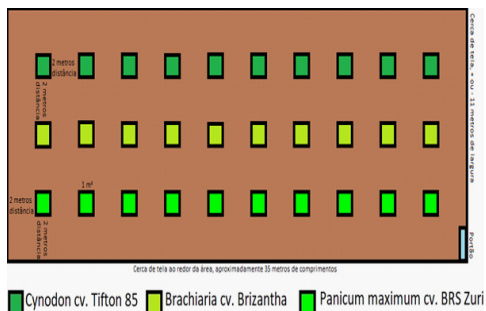


Figura 1. Croqui exemplificando a distribuição das gramíneas e metragem da área do experimento de semicampo na Embrapa Pecuária Sudeste.

As figuras 2, 3 e 4 representam a demarcação das parcelas com estacas de madeira, as gramíneas já plantadas e a área do experimento cercada, e o manejo de capina dos corredores, respectivamente.

Foto: Gustavo A. Sousa



Figura 2. Demarcação das parcelas com estacas de madeira.



Foto: Gustavo A. Sousa

Figura 3. Manejo de capina dos corredores entre as parcelas.



Foto: Gustavo A. Sousa

Figura 4. Gramíneas em crescimento e o entorno da área cercada com tela de mangueiro.

- Variáveis climáticas

As variáveis climáticas foram acompanhadas em nível de macroclima (umidade relativa do ar e temperatura) e microclima (temperatura e umidade do ar e do solo dentro das parcelas de capim). Os dados do macroclima foram obtidos por meio da estação meteorológica da Embrapa Pecuária Sudeste com as respectivas coordenadas - Latitude: 21°57'42" (S) Longitude: 47°50'28" (W) Altitude: 860m. Com base nos relatórios,

foram obtidas as médias semanais de temperatura, as temperaturas máximas e mínimas, a umidade relativa do ar (UR, %), a precipitação (mm³), vento (m/s), radiação solar (MJ. m⁻²) e evapotranspiração (Eto/mm). As informações sobre o microclima foram obtidas a partir de oito sensores higrômetros da marca Prezzi®, modelo TDR 100, dois para cada grupo tratado e dois para cada grupo controle, instalados nas parcelas dos três tipos de forrageiras. Os sensores higrômetros captavam informações sobre a temperatura e umidade do solo (expressa em cm³ de água/cm³ de solo). Também foram feitas médias semanais para cada uma das variáveis.

- Larvas de ixodídeos

A quantidade de larvas utilizadas nos ensaios de semicampo foi padronizada visando garantir que as parcelas tivessem quantidades de larvas suficientes até a última das três coletas previstas no ensaio. Por isso optou-se pela utilização de, aproximadamente, 60 mil larvas de *R. microplus* e 49,2 mil larvas de *A. sculptum*, equivalentes a três gramas de postura das teleóginas de cada espécie, com taxa de eclosão acima de 85%. A taxa de eclosão dos ovos incubados na estufa foi estimada visualmente, sempre pela mesma pessoa, a fim de evitar vies na avaliação. Os ovos foram incubados dentro de seringas descartáveis com a ponta cortada e vedada com algodão. A incubação foi realizada sem iluminação

para inibir a diapausa das larvas de *A. sculptum* e garantir sua viabilidade nos experimentos.

- Testes *in vitro* para definição das CL₉₉ a serem utilizadas no semicampo

Para a definição das menores doses eficazes contra larvas de ixodídeos *in vitro*, foram realizados Testes de Pacote de Larvas (TPL), utilizando o método de diluição seriada, a fim de detectar a menor dose de cada produto que proporcionasse 100% de mortalidade das larvas em laboratório. Após definidas as menores doses eficazes em 100%, estas foram selecionadas para serem testadas no bioensaio de semicampo.

- Padronização com as soluções teste por gênero de forrageira

Para a definição do volume de calda necessário para a aplicação em cada uma das espécies de capins, foram realizados testes prévios de vazão cronometrada das bombas costais elétricas utilizadas durante o experimento (Fig. 5). A vazão da bomba foi calculada por meio de uma simulação de aplicação com água, em potência máxima, em três das parcelas de um m² de cada capim, em tempo cronometrado, de modo que avaliássemos o tempo necessário para que as parcelas ficassem molhadas por completo. Após os testes obtiveram-se os tempos de 10" (segundos) para Tifton 85, 15" para *Brachiaria* cv Marandú e

20” para BRS Zuri. Definido o tempo de aplicação, foi validado o volume aplicado dentro deste tempo, utilizando-se uma proveta de vidro graduada e um cronômetro nos tempos pré-estabelecidos para umidificar toda a parcela teste. Os volumes obtidos foram de 300 mL para Tifton 85, 450 mL para *Brachiaria* cv. Marandú e 600 mL para BRS Zuri, sendo os respectivos volumes suficientes para molhar toda a superfície das três forrageiras em um m² de área (Figura 5). Com base nesses volumes, foram calculadas e preparadas as diluições dos produtos a serem testados no ensaio de semicampo.

Foto: Gustavo A. Sousa



Figura 5. Pulverização cronometrada das parcelas do controle negativo (água) utilizando bomba costal elétrica.

- Recuperação das larvas nas parcelas

A recuperação das larvas nas parcelas foi realizada segundo Sonenshine; Roe (1993) nos dias 4, 7 e 10 do experimento, utilizando-se um

pano branco (tipo flanela de algodão) de 80 x 80 cm para captura das larvas em cada parcela. O pano era fixado com fita crepe em uma haste de bambu de, aproximadamente, 1,5 metros, a fim de facilitar sua passagem sobre a extremidade do capim de modo a evitar que as larvas subissem nos membros da equipe de coleta (Figura 6).



Foto: Gustavo A. Sousa

Figura 6. Coleta das larvas na extremidade do capim utilizando flanela branca.

Os tecidos foram colocados em sacos plásticos transparentes de 70 x 50 cm, identificados com o número de cada parcela, e então levados ao laboratório para congelamento em freezer (-20 °C) e posterior contagem das larvas.

- Contagens das larvas

Após o congelamento e morte das larvas, os sacos plásticos contendo os panos foram abertos sobre uma bancada branca, a fim de facilitar a visualização

e separação das larvas, bem como a remoção de resíduos de vegetação, fragmentos de solo e outros insetos que eventualmente se aderiam ao pano no momento da coleta. As contagens das larvas foram feitas manualmente utilizando bomba a vácuo com uma ponteira e filtro acoplada para a sucção individual das larvas e contagem com auxílio de contadores manuais (Figura 7).

Foto: Gustavo A. Sousa



Figura 7. Contagem manual das larvas utilizando bomba a vácuo.

- Avaliação de ecotoxicidade das formulações acaricidas

Alguns dos produtos avaliados (acaricidas ou inseticidas) podem ter característica *off label*, ou seja, ter seu potencial acaricida avaliado para o controle de ectoparasitos que não constavam em sua bula, ou, pelo menos, não foi registrado inicialmente para controle ambiental. Com isso, foi proposta neste trabalho uma avaliação de impacto ambiental *in vitro* utilizando-se a mortalidade de *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental.

- Ensaio de toxicidade com *C. elegans*

O *C. elegans* é um nematoide de vida livre no solo. Ele alimenta-se de bactérias e é encontrado principalmente em habitats ricos em microrganismos, como material em decomposição (ex: plantas), mas também em sedimentos de água doce, ricos em nutrientes. Testes de toxicidade com *C. elegans* são usados para avaliar a toxicidade de amostras aquosas, sedimentares e de solo, utilizando parâmetros de toxicidade, alterações de crescimento e de reprodução.

- Testes preliminares

Os indivíduos adultos de *C. elegans* foram sincronizados 24 horas antes da realização do ensaio. As larvas

de *C. elegans* com 24 horas de vida foram então suspensas em meio EPA previamente autoclavado. Em cada placa teste foram adicionados pelo menos 10 organismos, sendo registrado o número inicial por placa. As placas foram incubadas a 20°C no escuro, em estufa incubadora com fotoperíodo. O número de indivíduos vivos após a exposição aos produtos acaricidas ou inseticidas em cada placa foi avaliado após 24 horas. Os valores obtidos foram usados como norteadores para os valores das concentrações empregados no ensaio crônico.

- Ensaio de toxicidade crônica

Os ensaios foram conduzidos em placas descartáveis de poliestireno com 24 poços com capacidade de aproximadamente 2,5 mL cada. Em cada poço foram colocados pelo menos 10 indivíduos J2 (*C. elegans* juvenis de segundo estágio), além de suspensão de *E. coli* OP50-1 (alimento) em meio EPA e a suspensão *C. elegans* em todos os poços. Em seguida, adicionados 500 µL das diferentes soluções testes dos antiparasitários (acaricidas e/ou inseticidas) e colocado apenas o meio de crescimento nos poços de controle, preparando quatro poços por concentração dada, totalizando no mínimo 40 organismos por concentração-teste. As concentrações usadas (mg.L⁻¹) seguiram as CL99 determinadas nos testes de Pacote de Larvas. As placas foram mantidas em

sala com temperatura controlada ou BOD. A exposição foi realizada num período de 96 horas a uma temperatura controlada de 20 ± 1°C, no escuro. Após 96 horas de exposição, foi adicionado 0,5 mL da solução de Rosa Bengala (300 mg.L⁻¹) em cada poço.

A seguir, as placas com tampa foram aquecidas em uma estufa de secagem, durante 10 minutos, a 80°C para finalizar o teste. O uso de Rosa Bengala e aquecimento foram usados para facilitar a mensuração dos organismos. As amostras foram armazenadas em 8 ± 2°C graus até o respectivo processamento em até oito semanas.

Os seguintes parâmetros foram avaliados de acordo com ISO 10872:2010: ISO 10872:2010 - International Organization for Standardization. 2010. Water quality—Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) Geneva, Switzerland.

Recuperação: após 96 horas, o número de indivíduos adultos em cada poço foi contado e foi calculada a recuperação por meio da divisão do número de adultos pelo número de organismos introduzidos no início do teste e multiplicados por 100. A recuperação deve estar entre 80 a 120%. Fertilidade: foi determinada a presença de um ou mais ovos no interior do corpo de cada indivíduo exposto com o auxílio de um microscópio no aumento de 25 vezes. Foi calculada a porcentagem

de fertilidade dividindo-se o número de organismos testes com ovos em relação ao número total de organismos recuperados multiplicados por 100. A fertilidade deve ser maior que 80%.

Também foi avaliado o crescimento. Para tanto, o comprimento do corpo dos indivíduos adultos expostos foi medido em uma lâmina de microscópio com escavação sob câmera Optika 4083B3 acoplada a estereomicroscópio. Para isso, foi usada uma escala de medida com aumento de seis vezes com auxílio do software Optika View. O comprimento médio do corpo foi calculado para cada réplica avaliada da diferença do comprimento do corpo médio medido ao final e o comprimento médio do corpo de 30 indivíduos J2 no início do teste.

- Análise estatística

Indicamos que os dados dos experimentos de semicampo sejam submetidos a uma análise de variância pelo Procedimento Mixed do SAS (SAS Institute, 2016), considerando nos modelos os efeitos de Tratamento, Dia e a interação TRAT*DIA, seguindo uma estrutura de split-plot com medidas repetidas no tempo (DIA). Na seleção da melhor estrutura da matriz de variância e covariância, deve-se adotar o critério de informação Smaller is Better - Akaike's Information Criterion (AIC). Para comparação múltipla de médias usa-se o teste de Tukey (adjust Tukey), ao nível de significância de 5%.

Considerações finais

A sistematização da metodologia aqui proposta obteve sucesso na avaliação do efeito acaricida de diferentes compostos químicos em diversas forrageiras, sendo de fácil execução e praticidade durante os experimentos, proporcionando maior reprodutibilidade nos resultados e aproximação da realidade do ambiente a campo. Foram determinados os volumes das soluções antiparasitárias de acordo com as características de cada forrageira. Além disso, também se realizou o estabelecimento do número de larvas de *R. microplus* e de *A. sculptum*, de forma que a contagem posterior fosse viável. O monitoramento do microclima em cada forrageira também foi um diferencial da presente sistematização. Esse modelo experimental mostra-se como um norteador para experimentos em condições de semicampo, visto que na literatura são escassas as metodologias padronizadas e recomendadas para este tipo de bioensaio.

Referências

ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R. S.; SENRA, T. O. S.; MATURANO, R.; PRATA, M. C. de A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3271-3276, 2015.

- BASSO, L. M. de S.; MONTEIRO, A. C.; ANDRADE BELO, M. A. de; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 595-600, jun. 2005.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; SOUZA, E. J. de. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 38-42, 2003.
- FURLONG, J. (ed.). **Carrapato: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 65 p.
- JORDAN, R. A.; DOLAN, M. C.; PIESMAN, J.; SCHULZE, T. L. Suppression of host-seeking *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) nymphs after dual applications of plant-derived acaricides in New Jersey. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 659-664, apr. 2011.
- LABRUNA, M. B. As gerações anuais. In: PEREIRA, M. DE C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus**: biologia, controle e resistência. São Paulo: MedVet, 2008. 169 p.
- MUNIZ, N. C. **Efeito do carvacrol sobre larvas de Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) em condições seminaturais e citogenotoxicidade sobre Brachiaria ruziziensis R. Germain & Evrard (Poacea)**. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LOPES, C. M. L.; LEITE, R. C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 295-301, 2000.
- SAS INSTITUTE. **SAS/Access® 9.4 Interface to ADABAS**: reference. Cary, NC: SAS Institute, 2016.
- SILVA, F. L. V. da. **Associações binárias de timol, carvacrol e eugenol para o controle de fases imaturas de vida livre de Amblyomma sculptum**. 2020. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. (ed.). **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1993. v. 2.
- TORRES, F. D.; MARCONDES, C. B. Fighting neglected tropical diseases in the postgenomic era. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 156-157, Apr. 2008.

Embrapa Pecuária Sudeste
Rod. Washington Luiz, km 234,
Caixa Postal 33,
13560-290 , São Carlos, SP
Fone: (16) 34115600
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Pecuária Sudeste

Presidente
André Luiz Monteiro Novo
Secretário-Executivo
Luiz Francisco Zafalon

Membros
Gisele Rosso, Mara Angélica Pedrochi
Maria Cristina Campanelli Brito,
Silvia Helena Piccirillo Sanchez

Revisão de texto
Gisele Rosso

Normalização bibliográfica
Mara Angélica Pedrochi

Editoração eletrônica
Maria Cristina Campanelli Brito

CGPE 017532