



**Testes in vitro com fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* na formulação em pó**

Rachel Bernardes **Rothbarth**<sup>1</sup>; Fernanda Calvo **Duarte**<sup>2</sup>; Márcia Cristina **Mendes**<sup>3</sup>

**Nº 22833**

**RESUMO** – O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* possui grande importância veterinária uma vez que os prejuízos influenciam na produção de carne e leite. Os fungos enteropatogênicos estão sendo usados no controle de diversas pragas como o fungo *Metarhizium anisopliae*, essa espécie fúngica está entre as mais bem estudada e caracterizada, sendo utilizada em programas de controle biológico. Os objetivos deste estudo foi avaliar através de testes in vitro, em condições controladas, a eficácia de três concentrações fúngicas em pó do *Metarhizium anisopliae* e a partir da concentração mais eficaz avaliar em substrato terra o efeito em fêmeas do carrapato *R. microplus*. Amostras de fêmeas de *R. microplus* foram tratadas com o fungo *M. anisopliae* na formulação em pó foi dissolvido em caulim (silicato de alumínio hidratado) em 3 concentrações ( $2 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^{11}$  e  $2 \times 10^{13}$  conídios/há). No grupo controle usou-se somente caulim. Foram feitos três métodos, teste 1 sem papel filtro umedecido não fundo da placa e sem insulfilm fechando as placas durante três dias. Os teste 2 e 3 foram feitos com papéis filtros úmidos e com parafilm e o teste 4 foi feito em substrato terra. Os resultados obtidos mostraram que a média de eficácia encontrada no tratamento da maior concentração foi de 19,3% para o teste 1, 100% para os testes 2 e 3. A concentração fungica de *M. anisopliae* em pós que apresentou melhor eficácia (100%) foi a de  $2 \times 10^{13}$  conídios/ha. Esta concentração testada in vitro com substrato terra apresentou redução de aproximadamente de 50%. Os dados obtidos deste estudo serve como referência para utilização dos fungos a campo.

**Palavras-chaves:** Teste de eficácia; Controle biológico; Ectoparasita

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, USCS- Universidade Municipal de São Caetano do Sul São Paulo-SP; rachelro2002@gmail.com

2 Pesquisador do Instituto Biológico, São Paulo-SP.

3 Orientador: Pesquisador do Instituto Biológico, São Paulo-SP; marcia.mendes@sp.gov.br



**ABSTRACT** – The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* has great veterinary importance since the losses influence the production of meat and milk. Enteropathogenic fungi are being used to control several pests, such as the fungus *Metarhizium anisopliae*. This fungal species is among the best studied and characterized, being used in biological control programs. The objectives of this study were to evaluate, through *in vitro* tests, under controlled conditions, the effectiveness of three powdered fungal concentrations of *Metarhizium anisopliae* and, from the most effective concentration, to evaluate the effect on females of the tick *R. microplus* in soil substrate. Samples from females of *R. microplus* were treated with the fungus *M. anisopliae* in the powder formulation was dissolved in kaolin (hydrated aluminum silicate) in 3 concentrations ( $2 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{11}$  and  $2 \times 10^{13}$  conidia/ha). In the control group, only kaolin was used. Three methods were performed, test 1 without moistened filter paper at the bottom of the plate and without insulfilm, closing the plates for three days. Tests 2 and 3 were done with wet filter papers and parafilm and test 4 was done on earth substrate. The results obtained showed that the average efficacy found in the treatment of the highest concentration was 19.3% for test 1, 100% for tests 2 and 3. The fungal concentration of *M. anisopliae* in powders that showed better efficacy (100 %) was  $2 \times 10^{13}$  conidia/ha. This concentration tested with soil substrate showed a reduction of approximately 50%. The data obtained from this study serves as a reference for the use of fungi in the field.

**Keywords:** Efficacy test; Biological control; ectoparasite.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* são carrapatos pertencentes à ordem Ixodida e família Ixodidae. Estão relacionados à disseminação de diversas doenças em bovinos com preferência a raça *Bos taurus*. A espécie *R. microplus* é monoxeno, ou seja, realiza todo o ciclo em um só hospedeiro<sup>1</sup>. Seu ciclo de vida é dividido em duas etapas, a fase de vida livre e a fase parasitária. A fase parasitária se dá desde a fixação da larva em um hospedeiro sensível até chegar ao estágio adulto, com consequente desprendimento das teleóginas (fêmeas ingurgitadas). Em



seguida, se inicia a fase de vida livre, em que, após cair no solo, a teleógina busca um lugar sombrio, e inicia a postura dos ovos com consequente eclosão das larvas<sup>2</sup>.

O carrapato *R. microplus* possui grande relevância na medicina veterinária, uma vez que, os prejuízos são causados direta e indiretamente, através do desenvolvimento letárgico nos animais parasitados e são transmissores dos agentes etiológicos da “tristeza parasitária bovina”, doença causada por bactérias do gênero *Anaplasma* e protozoários do gênero *Babesia* que provoca debilidade, respectivamente. De acordo com GUGLIELMONE et al.,(2006) este carrapato proporciona grandes perdas na pecuária mundial.

O controle do carrapato dos bovinos tem sido feito através a aplicação de produtos químicos, que são usados como: tratamento curativo (administração do uso de carrapaticidas, quando se visualiza o parasita no animal), controle estratégico (usado na administração de produtos carrapaticidas a longo prazo e em determinada época do ano) e tratamento tático (tratamento aplicado dentro de um controle estratégico com vigilância constante sobre o nível de infestação) (PIRES et al., 2010).

Os principais grupos químicos utilizados como carrapaticidas são os organofosforados, piretróides, amitraz, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron (MARTINS, 2004; PEREIRA; LABRUNA, 2009). A maioria dos produtos age sobre o sistema nervoso do carrapato, levando-o à paralisia (BRITO, 2011). Única exceção é o fluazuron que inibe a síntese de quitina, impedindo a troca de ecdises pelo ácaro causando assim sua morte (VIEIRA, 2013).

Estudo realizado por Mendes et al., (2011) mostrou que o controle do carrapato, quando é feito com a utilização de carrapaticidas aplicados mais de 6 vezes em um ano, pode contribuir para o desenvolvimento de populações resistentes a esses produtos. A resistência aos acaricidas utilizados para controlar o carrapato *R. microplus* aumentou com muita rapidez na África, Austrália, Américas do Sul e do Norte, abrangendo diversas classes de produtos químicos. A frequência de carrapatos resistentes aos piretróides passou de 83%, em 2007, para 100%, em 2008; já para organofosforados, foi de 50% para 95%, no mesmo período (MENDES et al., 2011). É importante ressaltar que os organofosforados têm uso limitado na bovinocultura leiteira, uma vez que o leite oriundo desses animais não pode ser comercializado durante o período de carência desse produto que é de 3 dias para leite e 10 dias para abate.



Os fungos entomopatogênicos estão sendo usados para o controle de diversas pragas em escalas moderada em países como: China, Austrália, Rússia e Brasil (MILNER et al., 2000). Dentre eles, destacam-se *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, encontrados naturalmente em várias espécies de carrapatos e em diferentes estágios de desenvolvimento da praga (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2008).

Essas duas espécies fúngicas estão entre as mais bem estudadas e caracterizadas, sendo inclusive utilizadas em programas de controle biológico (ANGELO et al., 2012; CAMARGO et al., 2016). Especificamente, *M. anisopliae* vem se mostrando eficiente no controle do carrapato bovino *R. microplus* (BEYS- DA-SILVA et al., 2012), tanto em testes de laboratório como a campo, podendo ser uma das principais alternativas comerciais; apresenta vantagens como a diminuição do impacto ambiental, baixo custo de produção e não desenvolvimento de resistência por parte da praga alvo (FRAZZON et al., 2000; LEEMON; TURNER; JONSSON, 2008; OJEDA-CHI et al., 2010).

Os conídios do *M. anisopliae*, responsáveis pela infecção, em contato com a cutícula do hospedeiro suscetível, fixam-se e germinam, iniciando uma cascata de reconhecimento e ativação de reações enzimáticas, essenciais para transpor a barreira cuticular, causando a colonização completa do hospedeiro. Posteriormente, o ciclo se inicia novamente com emergência de hifas fúngicas, seguido pela produção e dispersão dos conídios (BEYS-DA-SILVA et al. 2005, 2009, 2010a, 2010b, 2014; SANTI et al. 2009, 2010a, 2010b; SILVA et al. 2005).

A aplicação à campo em pastagens, para o controle do *Amblyomma sculptum* com o fungo *M. anisopliae* em solução aquosa na concentração de  $2 \times 10^{13}$  conídios/ha obteve mortalidade de 100%, 56,9% e 100% para carrapatos adultos, ninfas e larvas, respectivamente. (ARAÚJO, 2019). Alves (1998) observaram eficácia utilizando formulações de fungos preparados em base oleosa no controle do carrapato *R. microplus*. Novas pesquisas visando empregar formulações práticas e eficazes para o controle do carrapato usando fungos são necessárias e, portanto, propõe-se nesse estudo verificar a eficácia do *M. anisopliae* na formulação em pó para o controle do *R. microplus*.

Os objetivos deste estudo foi avaliar *in vitro*, em condições controladas, a eficácia três concentrações fúngica em pó do fungo *M. anisopliae* em fêmeas do carrapato *R. microplus* e da melhor concentração obtida, avaliar a eficácia em substrato terra.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *M. anisopliae* (isolado IBCB 425) foi adquirido da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, Campinas.

O fungo *M. anisopliae* fornecido estava na concentração de  $3,02 \times 10^{XX}$  e foi aplicado em pó sobre os carrapatos disposto nas placas de Petri. Foram testadas 3 concentrações:  $2 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{11}$  e  $2 \times 10^{10}$  conídeos/há. Para preparar as formulações nas 3 concentrações foi utilizado pó inerte caulim (silicato de alumínio hidratado) da seguinte forma: concentração  $2 \times 10^{13}$ , 8,75g de caulim + 1,25g de fungo *M. anisopliae*, concentração  $2 \times 10^{11}$ , 0,125g de caulim + 99,88g de fungo *M. anisopliae*, e concentração  $2 \times 10^{10}$ , 0,025g de caulim + 199,78g de fungo *M. anisopliae*. Nas placas do grupo controle foi aplicado somente o mesmo volume de caulim que foi colocado em cada placa do testes da menor concentração.

Carrapatos *R. microplus* foram obtidos da Fazenda Experimental do Polo Regional do Desenvolvimento Tecnológicos dos Agronegócios do Vale do Paraíba, sediado no município de Pindamonhangaba, SP.

### 2.1 Teste in vitro

#### 1º Teste

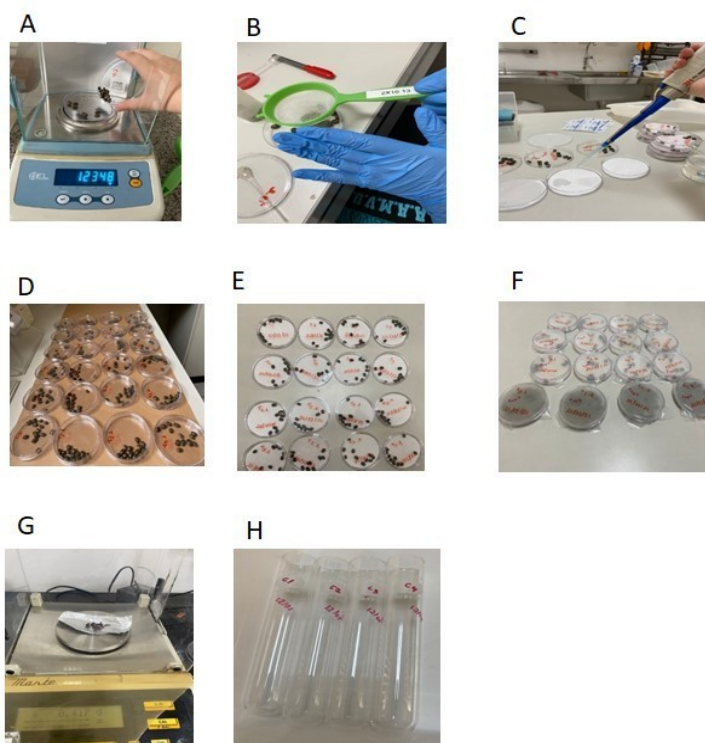
As fêmeas ingurgitadas são selecionadas para cada placa com número de 10 fêmeas e em seguida foram pesadas para cada concentração ( $2 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{10}$ /conídeos/ha) e para o controle (seis repetições para o grupo). Nas placas de Petri foram colocados papéis filtro de oito centímetros e meio de diâmetro, as fêmeas foram colocadas nas placas e com o auxílio de uma peneira, o fungo foi peneirado sobre as fêmeas. Após este processo, as placas foram colocadas na estufa à 28°C- 80% de umidade por 24 horas. Depois desse período, os papéis filtro foram retirados e as placas permaneceram na estufa por 15 dias até a postura de ovos (Fig. 1). Após esse tempo os



ovos foram pesados e colocados em tubos de ensaio com algodão umedecido na ponta e os tubos foram postos na estufa por mais 15 dias até a eclosão das larvas. No final do processo foi avaliado a porcentagem de eclosão das larvas, com esse dado, além dos valores de peso da fêmeas e peso dos ovos calculou-se a porcentagem de postura de ovos e a eficácia do fungos testado de acordo com método proposto por Drummont et al., (1973).

## **2º e 3º Testes**

Estes testes se diferenciaram do primeiro no que se refere a aplicação de 0,5 microlitros de água no papel filtro dispostos na base das placas de Petri e após a pulverização dos fungos foi colocado parafilm em cada placa e foi mantida em estufa à temperatura de 27°C e umidade de 80% durante 3 dias. Após esse tempo os ovos foram pesados e colocados em tubos de ensaio com algodão umedecido na ponta e os tubos foram postos na estufa por mais 15 dias até a eclosão das larvas. No final do processo foi avaliado a porcentagem de eclosão das larvas, com esse dado, além dos valores de peso da fêmeas e peso dos ovos, calculou-se a porcentagem de postura de ovos e a eficácia do fungo testado de acordo com método proposto por Drummont et al., (1973). Estes testes foram realizados com quatro repetições.



**Figura 1.** Imagens da sequência dos testes 1, 2 e 3 com fêmeas do carrapato *R. microplus* tratadas com fungo *M. anisopliae* em formulação em pó.

A: pesagem das fêmeas; B: Pulverizando o fungo sobre as fêmeas; C: Umedecendo o papel filtro com água; D: Fêmeas em placas de Petri sem papel filtro; E: Fêmeas em placas de Petri com papel filtro; F: Placas de Petri com parafilm; G: Pesagem dos ovos; H: Tubos de ensaios onde foram colocados os ovos pesados.

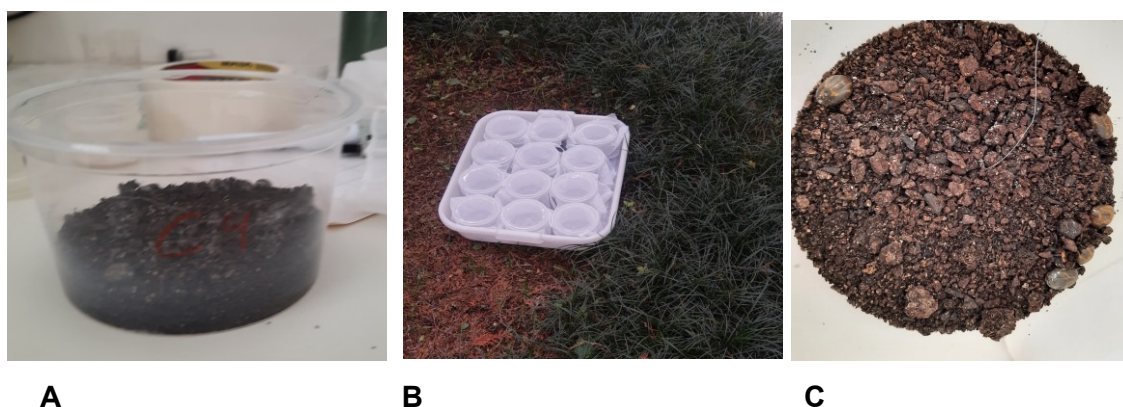
Fonte: Rachel Bernardes Rothbarth

#### 4º Teste

O quarto teste diferentemente dos testes anteriores, foi realizado somente com a maior concentração do fungo *M. anisopliae* ( $2 \times 10^{13}$ ); para tanto, 10 fêmeas foram selecionadas e colocadas em potes com substrato terra esterelizada, onde o fungo foi pulverizado da mesma forma que nas placas de Petri e mantidas em temperatura ambiente por 22 dias para a postura dos ovos. Após esse processo, os ovos foram pesados e colocados em tubos de ensaio com algodão umedecido na ponta



e colocados na estufa à 28°C por 15 dias. No final do processo foi avaliado a porcentagem de eclosão das larvas, com esse dado, além dos valores de peso das fêmeas e peso dos ovos, calculou-se a porcentagem de inibição de postura e a eficácia do fungo. Esse teste foi realizado com seis repetições para o tratado e controle.



**Figura 2.** Imagens A: substrato terra no pote; B: amostras no meio ambiente e C: terra com fêmeas do carrapato *R. microplus*

Fonte: Ana Rodrigues (2022)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de média da porcentagem de inibição de postura e eficácia da aplicação do fungo *M. anisopliae* na formulação em pó para os três testes estão apresentados nas tabelas 1 e 2 respectivamente. De um modo geral houve grande variação nos valores dos testes de acordo com os valores elevados de desvio padrão.

Observa-se que a média da porcentagem de inibição de postura para os três testes na primeira concentração ( $2 \times 10^{10}$ ) o resultado foi zero, sendo que, na segunda concentração ( $2 \times 10^{11}$ ) apenas



o teste 3 apresentou zero. Na terceira concentração ( $2 \times 10^{13}$ ) percebe-se que a maior inibição de postura foi no teste 2 seguidos dos testes 3 e 1. (Tab.1)

Em relação à média de porcentagem de eficácia (Tab.2) verifica-se que o teste 1 foi superior aos testes 2 e 3 nas concentrações  $2 \times 10^{10}$  e  $2 \times 10^{11}$ . No entanto, na concentração  $2 \times 10^{13}$  a média de porcentagem de eficácia do teste 1 foi bem menor do que os testes 2 e 3.

Os dados obtidos do teste 1, onde não foi colocado o papel filtro umedecido, confirma que há necessidade de umidade na placa de Petri e possivelmente a ação do fungo, neste teste, se deve à umidade da estufa.

Os resultados do teste 4 (Tab.3) realizado com o fungo em pó no substrato terra, apresentaram baixo potencial de inibição de postura, com média de 30% entre os 6 tratados, porém o fungo foi capaz de diminuir a eclosão de ovos, pois a eficácia média de produto entre os 6 tratamentos apontam um percentual de 49%, ou seja, apesar do fungo não ser capaz de inibir a oviposição das fêmeas ingurgitadas, ele demonstra a capacidade de inibir a eclosão destes ovos.

Testes realizados por Santos (2021) em duas propriedades no interior de São Paulo usando o fungo *M. anisopliae* na concentração  $5 \times 10^{13}$  conídios/ha em formulação líquida apresentou média anual de eficácia de 36% e 48% para os respectivos municípios, Pindamonhangaba e Nova Odessa. Comparado com resultados de eficácia encontrado neste estudo, ainda que seja *in vitro*, mostra que na concentração menor ( $2 \times 10^{13}$  conídios/ha) em formulação em pó a eficácia foi de 100% (Fig. 2), dado promissor para uso em campo.

Experimento realizado por Nchu, et al., (2008) com o carrapato do gênero *Amblyomma* em que os autores usaram três formulações diferentes de *M. anisopliae* como adjuvante em armadilhas de CO<sub>2</sub> para diminuir a população de *Amblyomma variegatum*, os resultados variaram entre 54,7% e 46,5% com a solução em emulsificante em estações chuvosas e secas, respectivamente; seguido por 32,0% e 23,8% com a formulação em óleo e 38,0 e 24,4% com a formulação em pó, resultado semelhante encontrado no presente trabalho.

Este é o primeiro teste in vitro testando o fungo *M.anisopliae* na formulação em pó no carrapato *R. microplus* que pode ser mais uma forma de aplicação de fungos no pasto para o controle de larvas e fêmeas ingurgitadas que estão no solo, pois com a aplicação do fungo na forma líquida corre o risco de perda do produto e na formulação em pó o produto se espalha pelo capim e no solo, assim as larvas que sobem-no capim entrarão em contato com o fungo e o microclima próximo ao solo é mais úmido favorecendo assim a ação do fungos.

Tabela 1. Média de porcentagem de inibição de postura dos carrapatos *R microplus* testados com fungo *M. anisopliae* na formulação em pó.

| Testes  | Concentração $2 \times 10^{10}$ |         | Concentração $2 \times 10^{11}$ |        | Concentração $2 \times 10^{13}$ |         |
|---------|---------------------------------|---------|---------------------------------|--------|---------------------------------|---------|
|         | Média (desvio padrão)           |         | Média (desvio padrão)           |        | Média (desvio padrão)           |         |
| Teste 1 | 0                               | (13,64) | 4,12                            | (13,5) | 14,29                           | (11,61) |
| Teste 2 | 0                               | (6,78)  | 7,92                            | (5,89) | 87                              | (8,2)   |
| Teste 3 | 0                               | (10,3)  | 0                               | (8,28) | 64,63                           | (28,43) |

Tabela 2. Média de porcentagem de eficácia dos carrapatos *R microplus* testados com fungo *M. anisopliae* na formulação em pó.

| Testes  | Concentração $2 \times 10^{10}$ |        | Concentração $2 \times 10^{11}$ |         | Concentração $2 \times 10^{13}$ |      |
|---------|---------------------------------|--------|---------------------------------|---------|---------------------------------|------|
|         | Média (desvio padrão)           |        | Média(desvio padrão)            |         | Média(desvio padrão)            |      |
| Teste 1 | 38,6                            | (37,5) | 14                              | (19,14) | 19,3                            | (13) |
| Teste 2 | 0                               | (9,33) | 6,75                            | (8,66)  | 100                             | (0)  |
| Teste 3 | 10,35                           | (20)   | 0                               | (10,36) | 100                             | (0)  |



**Figura 3.** Fêmeas de carrapatos *R. microplus* tratadas com o fungo *M. anisopliae* na concentração  $2 \times 10^{13}$  conídios /ha em formulação em pó.

Fonte: Rachel Bernardes Rothbarth

Tabela 3. Média de porcentagem de eficácia inibição de postura dos carrapatos *R. microplus* testados com fungo *M. anisopliae* na formulação em pó em substrato terra

| Teste 4  | Concentração $2 \times 10^{13}$ |
|----------|---------------------------------|
| Inibição | 30%                             |
| Eficácia | 49%                             |

#### 4. CONCLUSÃO

A concentração fungica de *M. anisopliae* em pós que apresentou melhor eficácia (100%) foi a de  $2 \times 10^{13}$  conídios/ha. A mesma concentração testada in vitro com substrato terra apresentou redução de aproximadamente de 50%. Os dados obtidos deste estudo serve como referência para utilização dos fungos a campo.



## 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida.

## 6. REFERÊNCIAS

BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. **The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* oil formulations to desert locusts at low humidities**. Annals of Applied Biology, v. 122, p.145-152, 1993.

NCHU, F; MANIANIA, N.K; TOURÉ, A.; HASSANALI, A.; ELOFF, J.N. **The use of a semiochemical bait to enhance exposure of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) to *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales)**. Veterinary Parasitology, [S. l.], p. 1-6, 5 nov. 2008

Furlong J. **Carrapato: problemas e soluções**. 1o ed. Furlong J, organizador. Juiz de Fora: Embrapa; 2005. 65 p.

GARCIA, M.V.; SILVA, R.V; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. **Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***, [S. l.], p. 1-12, 24 jan. 2019.

SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. **Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions**. Veterinary Parasitology, v. 206, p. 258–266, 2014.

SANTOS, M.L. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação da resistência a organofosforados e piretroides e controle biológico empregando fungos entomopatogênicos**. Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, 2021.