



## TESTES *IN VITRO* COM NEMATOIDE *STEINERNEMA RARUM* PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

Lucas Justino **Arantes**<sup>1</sup>; Elianai Ribeiro **Souza**<sup>2</sup>; Julie Giovanna Chacon **Orozco**<sup>3</sup>; Fernanda Calvo **Duarte**<sup>4</sup>; Márcia Cristina **Mendes**<sup>5</sup>

Nº 22823

**RESUMO** – O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é um carrapato monoxeno, tem como principal hospedeiro os bovinos e causam grandes prejuízos na pecuária brasileira. O controle biológico tem sido muito utilizado nos últimos tempos, dentre eles os nematódeos entomopatogênicos (NEPs) que têm se mostrado promissores para o controle do *R. microplus*. Este projeto tem como finalidade avaliar a ação do nematóide *Steinernema rarum* (PAM 25), através de dois testes *in vitro*, um em condições totalmente controladas, e outro realizado parte em temperatura ambiente com substrato terra, e parte em condições controladas. Para o primeiro teste 3 diferentes concentrações, 100, 200 e 300 jis/fêmea foram avaliadas, e para o segundo somente a concentração de 200 jis/fêmea, porém com 3 tipos de tratamentos, o primeiro as fêmeas ingurgitadas foram dispostas sobre o substrato e em seguida aplicada a suspensão (F+S), no segundo a suspensão foi aplicada 10 minutos antes da disposição das fêmeas (S+F) e no terceiro, as fêmeas foram colocadas em marcadores, sacos confeccionados com tecido de filó e fechados com barbante (M). Os resultados do teste em condições controladas, nas concentrações de 100, 200 e 300 jis/fêmea mostraram que as médias de inibição de postura foram de 84.03%, 93.10% e 95.80% e da eficácia do produto foram de 98.11%, 99.96% e 100%, respectivamente. Já os resultados do teste com substrato terra em temperatura ambiente para os tratamentos F+S, S+F e M, obteve médias de inibição de postura de 95.57%, 93.36% e 85.68% e médias de eficácia de 95.53%, 91.07% e 64.56%, respectivamente.

**Palavras-chaves:** entomopatogênico, substrato, teleóginas, bovinos.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, UNIP, São Paulo-SP; lucasarantesbr@hotmail.com.

2 Mestranda, Pós Graduação: Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico, São Paulo-SP.

3 Pesquisador do Instituto Biológico, Campinas-SP.

4 Pesquisador do Instituto Biológico, São Paulo-SP.

5 Orientador: Pesquisador do Instituto Biológico, São Paulo-SP; mendestick@gmail.com.



## **IN VITRO TESTS WITH NEMATODE *STERNEINEMA RARUM* FOR BIOLOGICAL CONTROL OF THE TICK *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

Lucas Justino **Arantes**<sup>1</sup>; Elianai Ribeiro **Souza**<sup>2</sup>; Julie Giovanna Chacon **Orozco**<sup>3</sup>; Fernanda Calvo **Duarte**<sup>4</sup>; Márcia Cristina **Mendes**<sup>5</sup>

**Nº 22823**

**ABSTRACT** – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, is a monoxentick, has cattle as its main host and causes great damage in Brazilian livestock. Biological control has been widely used in recent times, among them entomopathogenic nematodes (NEPs) that have shown promise for the control of *R. microplus*. This project aims to evaluate the action of nematode *Steinernema rarum* (PAM 25), through two in vitro tests, one under fully controlled conditions, and the other performed partly at room temperature with earth substrate, and partly under controlled conditions. For the first test 3 different concentrations, 100, 200 and 300 jis/female were evaluated, and for the second only the concentration of 200 jis/female, but with 3 types of treatments, the first engorged females were arranged on the substrate and then applied the suspension (F+S), in the second the suspension was applied 10 minutes before the arrangement of the females (S+F) and in the third, the females were placed on markers, bags made with filó fabric and closed with string (M). The results of the test under controlled conditions, at concentrations of 100, 200 and 300 jis/female showed that the means of posture inhibition were 84.03%, 93.10% and 95.80% and the efficacy of the product were 98.11%, 99.96% and 100%, respectively. On the other hand, the results of the ground substrate test at room temperature for the treatments F+S, S+F and M obtained posture inhibition averages of 95.57%, 93.36% and 85.68% and average efficacy of 95.53%, 91.07% and 64.56%, respectively.

**Keywords:** entomopathogenic, substrate, teleogins, cattle.

1 Author, CNPq Scholarship Holder (PIBIC): Graduation in Veterinary Medicine, UNIP, São Paulo-SP; lucasarantesbr@hotmail.com.

2 Master's Student, Postgraduate: Health, Food and Environmental Safety in Agribusiness, Biological Institute, São Paulo-SP.

3 Researcher at the Biological Institute, Campinas-SP;

4 Researcher at the Biological Institute, São Paulo-SP;

5 Advisor: Researcher at the Biological Institute, São Paulo-SP; mendestick@gmail.com.

## 2. INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago que possui grande importância veterinária e econômica no mundo. Esse parasito pertence à família Ixodidae, cujos integrantes são conhecidos como “carrapatos duros”. Essa família possui mais de 600 espécies, e todas, apresentam dimorfismo sexual e capítulo terminal em todos os estágios (GUIMARÃES *et al.*, 2001). O *R. microplus*, assim como qualquer ectoparasita hematófago, precisa se alimentar de sangue para completar o seu desenvolvimento (GARCIA *et al.*, 2019). O ciclo dessa espécie é complexo e divide-se em duas fases: a parasitária e a de vida livre. Na fase parasitária o processo de alimentação, desenvolvimento, crescimento e reprodução decorre obrigatoriamente com o parasito fixado ao hospedeiro. Já na fase de vida livre, ocorre a queda das fêmeas ingurgitadas (teleóginas) ao solo, a postura equivale à metade do seu peso em ovos e em seguida a morte da teleógina (ANDREOTTI *et al.*, 2021).

Os carrapatos são responsáveis pela transmissão de uma variedade de agentes patogênicos, e cerca de 10% das espécies podem ser consideradas de importância médico-veterinária por estarem envolvidas na epidemiologia de zoonoses (BRITO *et al.*, 2006). O *R. microplus* é considerado um dos maiores responsáveis pela redução do desempenho dos bovinos, e com relação ao prejuízo econômico na pecuária brasileira calcula-se que esse carrapato provoque uma perda estimada em dois bilhões de dólares por ano (GRISI *et al.*, 2014).

Quando se trata do controle deste ectoparasita, a opção mais comum é o uso de carrapaticidas químicos. No entanto, o uso incorreto e indiscriminado desses produtos pode gerar indivíduos resistentes (PEREIRA *et al.*, 2010). Por conta dessa resistência, a eficácia do controle químico fica limitada, portanto, passou-se a usar métodos alternativos como o manejo utilizando a rotação de piquetes e o uso de raças bovinas resistentes ao *R. microplus* (SILVEIRA *et al.*, 2014).

A utilização de fungos, insetos, nematoides, vírus e bactérias para o controle biológico de parasitas, em geral, vem se destacando nos últimos anos. Há grande interesse pelo método devido à redução de aplicação de químicos, reduzindo a agressão ao meio ambiente e aos próprios animais, e consequentemente, diminuindo a contaminação dos produtos de origem animal (TURETA *et al.*, 2020).

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são produzidos comercialmente em vários países para o controle de diversas pragas. Em diversos estudos laboratoriais foi demonstrado que diferentes espécies de NEPs são patogênicos para as teleóginas ingurgitadas do *R. microplus* (MONTEIRO & PRATA, 2013).

Os NEPs atuam de maneira mais satisfatória durante a fase de vida livre deste parasito, pois é neste momento em que a fêmea ingurgitada encontra-se no solo para realizar a oviposição,



e para isso busca um ambiente com alta umidade e protegido de radiação solar, condições essas favoráveis para a sobrevivência dos nematoides (MONTEIRO, 2014).

A espécie de nematoide *Steinernema rarum* penetra os carrapatos na fase de juvenil infectante (J3) por orifícios naturais, atuando como veículo carreador de bactérias entomopatogênicas que provocam a morte das teleóginas, realizando assim o controle biológico do carrapato (MONTEIRO, 2014).

Encontra-se no mercado alguns produtos à base de nematoides para aplicação em solo, esses produtos são diluídos em água e aplicados através de bombas de aspersão e sistemas de irrigação. Uma das técnicas de aplicação dos NEPs que vem ganhando espaço é a formulação em cadáveres de insetos, na qual os próprios insetos são colocados sobre o solo com o intuito de dispensar os nematoides no ambiente, e consequentemente controlar a praga alvo (MONTEIRO, 2014).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Nematoides *Steinernema rarum* (PAM25)**

As amostras de nematódeos foram cedidas pela Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, Campinas – SP.

### **2.2 Cepa de carrapato**

Amostras de carrapato *R. microplus* foram coletadas na Fazenda Experimental do Polo Regional de Pindamonhangaba – SP.

### **2.3 Local**

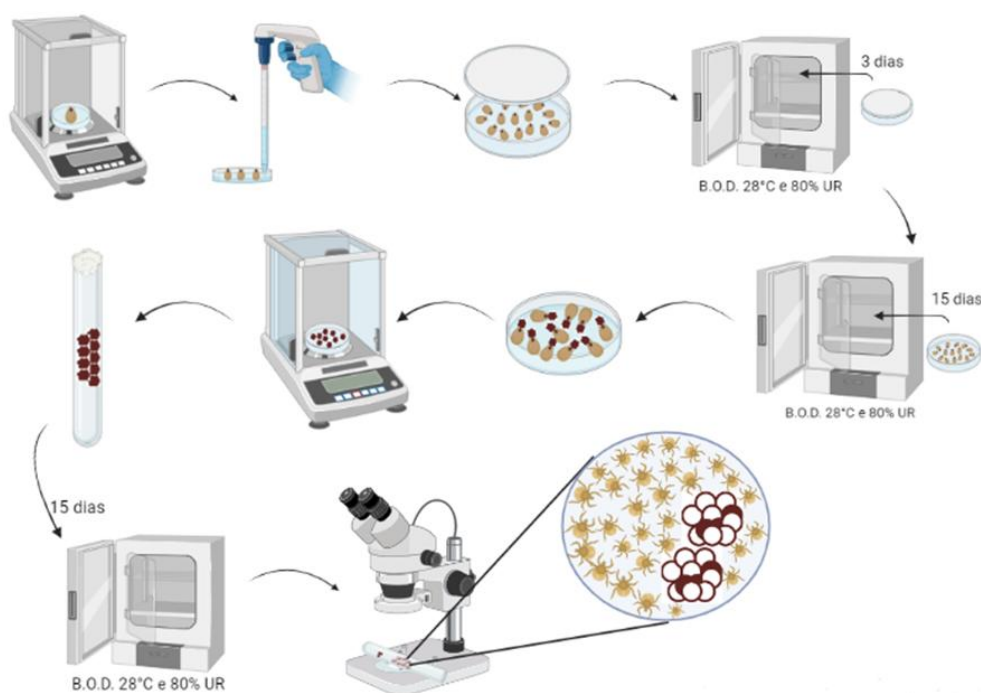
Os testes foram realizados no Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

### **2.4 Ensaio biológico**

#### **2.4.1 Teste *in vitro* em condições controladas**

Para cada unidade amostral foram utilizadas 1mL de nematoides em suspensão e quinze fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Essas unidades foram preparadas em placas de Petri, nas quais foram colocados recortes circulares de papel filtro e sobre estes as fêmeas após a pesagem. Em seguida aplicou-se os nematoides em suspensão com 3 diferentes concentrações: 100, 200 e 300 jis/fêmea. Nas unidades do grupo controle foi aplicado 1 ml de água destilada. O teste foi realizado com 3 repetições.

Após a aplicação, as placas foram vedadas com Parafilm, identificadas e colocadas em estufa B.O.D à temperatura de 28°C e 80% de umidade por um período de três dias. Passado este período foi removido o papel filtro e o Parafilm e as placas foram mantidas na estufa com a mesma temperatura e umidade citadas anteriormente. Depois de 15 dias os ovos foram removidos, pesados, colocados em tubos de ensaio devidamente identificados e vedados com algodão umedecido. Os tubos foram colocados em estufa por mais 15 dias para a eclosão das larvas. Posteriormente a porcentagem de eclosão de cada unidade amostral foi observada (Fig. 1).



**Figura 1.** Ilustração do teste *in vitro* para avaliar a eficácia do nematoide *S. rarum* em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Fonte: Arantes, L.J., 2022.

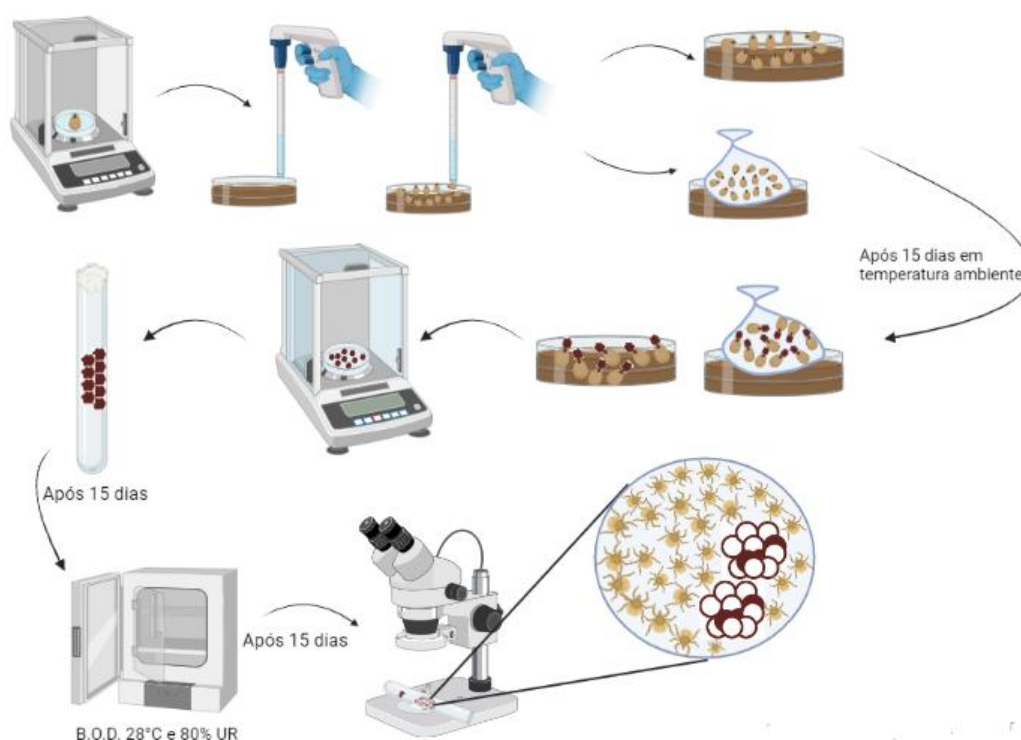
#### 2.4.2 Teste *in vitro* com substrato terra em temperatura ambiente

Neste teste cada unidade amostral foi preparada em frascos plásticos com 12cm de diâmetro no qual foi colocado terra estéril até uma altura de 2cm. Como no teste anterior foram utilizadas 15 fêmeas para cada unidade e 1ml de nematoides em suspensão. A concentração utilizada neste teste foi de 200 jis/fêmea (1mL), e foram testados três tipos de tratamento. Em um dos tratamentos as fêmeas ingurgitadas foram dispostas sobre o substrato e em seguida aplicada a suspensão (F+S), em outro tratamento a suspensão foi aplicada 10 minutos antes da disposição das fêmeas (S+F) e no terceiro, as fêmeas foram colocadas em marcadores, sacos confeccionados com tecido

de filó e fechados com um barbante. Os marcadores (M) foram colocados sobre o substrato após a aplicação da suspensão.

Foi estabelecido um grupo controle para os dois primeiros tratamentos no qual as fêmeas foram dispostas sobre o substrato e em seguida aplicado 1ml de água destilada, e um outro grupo controle para o tratamento M, no qual os marcadores foram colocados nos frascos onde havia sido aplicado 1ml de água destilada. Todos os frascos dos tratamentos F+S e S+F foram cobertos com um pedaço de tecido (filó) até que ocorresse a postura dos ovos, os frascos foram mantidos em temperatura ambiente (11,2°C a 21°C).

Após a remoção dos ovos, eles foram pesados, colocados em tubos de ensaio devidamente identificados e vedados com algodão umedecido. Os tubos foram colocados em temperatura ambiente (13°C a 20°C) por 15 dias e mais 15 dias em estufa B.O.D. à temperatura de 28°C e 80% UR para a eclosão das larvas (Fig. 2). Posteriormente a porcentagem de eclosão foi observada. Cada tratamento e controle foi feito em triplicata.



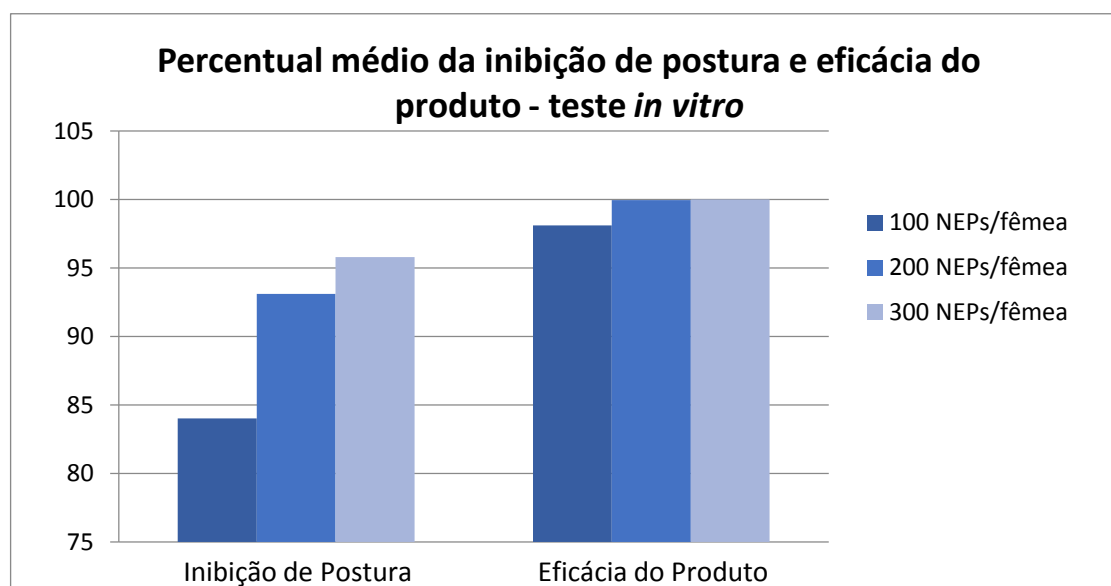
**Figura 2.** Ilustração do teste *in vitro* com substrato para avaliar a eficácia do nematoide *S. rarum* em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.  
Fonte: Arantes, L.J., 2022.

## 2.5 Avaliação da eficácia

Com os dados de peso das fêmeas, peso dos ovos e porcentagem de eclosão das larvas calculou-se a porcentagem de inibição de postura e eficácia do produto de acordo com Drummond *et al.* (1973).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

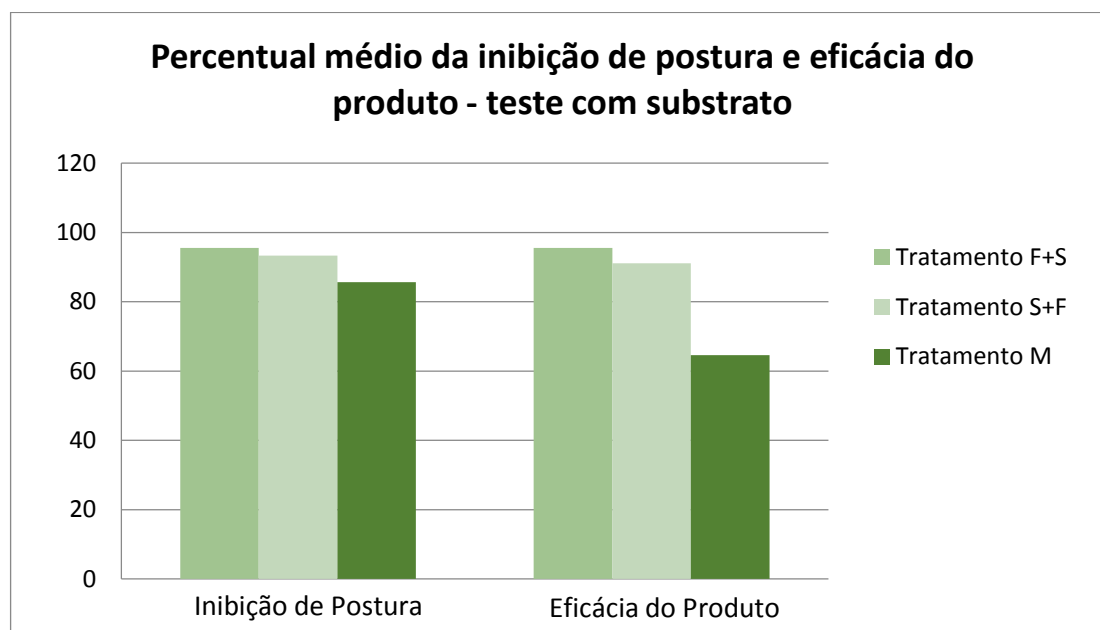
Os resultados do teste *in vitro* em condições controladas, nas concentrações de 100, 200 e 300 jis/fêmea mostraram que as médias de inibição de postura foram de 84,03%, 93,10% e 95,80% e da eficácia do produto foram de 98,11%, 99,96% e 100%, respectivamente (Fig. 3). Já os resultados do teste com substrato terra em temperatura ambiente para os tratamentos S+F, F+S e M, obteve médias de inibição de postura de 95,57%, 93,36% e 85,68% e médias de eficácia de 95,53%, 91,07% e 64,56%, respectivamente (Fig. 4). A eclosão das larvas ocorreu em 30 dias (quinze dias na temperatura ambiente e 15 dias em estufa na temperatura 20°C e 80% de umidade). Na figura 5 é possível observar as alterações inflamatórias no carrapato em comparação com uma teleógina saudável.



**Figura 3.** Porcentagem das médias de inibição de postura e eficácia da ação do nematoide *S. rarus* nas concentrações de 100, 200 e 300 NEPs/fêmea sobre o carrapato *R. microplus*.

Fonte: Arantes, L.J., 2022.





**Figura 4.** Porcentagem das médias de inibição de postura e eficácia do nematoide *S. rarum* nas concentrações de 200 NEPs/fêmea sobre o carrapato *R. microplus* com substrato terra.

Tratamento F+S: fêmeas dispostas sobre o substrato e em seguida a aplicação da suspensão com nematódeos.

Tratamento S+F: aplicação da suspensão e após 10 min a inserção das teleóginas.

Tratamento M: aplicação da suspensão e após 10min a utilização de marcadores, tecido de filó que envolve as fêmeas.

Fonte: Arantes, L.J., 2022.



**Figura 5.** Na esquerda está representada um fêmea de *R. microplus* infectada por *S. rarum* apresentando sinais de inflamação e na direita uma teleógina de *R. microplus* saudável.

Fonte: Arantes, L.J., 2022.

Os resultados dos testes *in vitro* em condições controladas apresentaram eficácia próxima de 100% já na dosagem de 200 jis/fêmea, o que representa, neste caso, 3000 jis/por placa de Petri, portanto a cepa *S. rarum* (PAM25) demonstra ser mais eficaz que a cepa a *Steinernema*





*glaseri* que apresentou redução de 90% de postura quando aplicada na concentração de 5000 jis/por placa de Petri em estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (2004). Outro ponto relevante é o resultado obtido com a concentração de 100 jis/fêmea que reduziu a postura em 84% e teve eficácia acima de 90%, estes dados não foram semelhantes aos resultados de Monteiro & Prata (2013) que verificaram uma superioridade muito acentuada das espécies do gênero *Heterorhabditis* sobre as de outros gêneros, esses autores descrevem que para uma eficácia de 90% foi necessária uma concentração de 75 jis/fêmea de NEPs do gênero *Heterorhabditis* em contraste a necessidade de milhares para obter resultado semelhante com outros isolados.

A eficácia do teste utilizando substrato terra também foi expressiva, visto que em dois dos tratamentos testados (S+F e F+S) foi acima de 90%. Os resultados obtidos com tratamento utilizando marcadores apresentou eficácia inferior comparada aos demais tratamentos, mas ainda assim apresentou eficácia de aproximadamente 65%. Este fato demonstra que o tecido pode ser uma barreira, impedindo o acesso dos NEPs ao carrapato e que a técnica pode ser utilizada em casos específicos em que seja necessário proteger os carrapatos para alguma outra proposta de estudo.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho apontam que a espécie de nematoide *S. rarum* (PAM 25) pode ser considerada mais um agente de controle do carrapato *R. microplus* e que novos testes *in vivo* e no pasto podem ser desenvolvidos a partir do presente estudo.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida.

#### 6. REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R; GARCIA, M.V; PAIVA F. Carrapatos com importância em Saúde Única e produção animal no Brasil. **Carrapatos com importância em Saúde Única e produção animal no Brasil**, [S. l.], p. 1-35, 1 nov. 2021.

BRITO, L.G; NETTO, F.G.S; OLIVEIRA, M.C.S; BARBIERI, F.S. Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***, [S. l.], p. 1-24, 1 ago. 2006.



GARCIA, M. V; RODRIGUES, V.S; 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.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. **Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil**. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 23, p. 150-156, 2014.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001. 217 p.

MONTEIRO, C.M.O. **Controle de *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) com nematoides entomopatogênicos: aplicação em formulação inseto cadáver e compatibilidade com outros agentes de controle**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade federal rural do rio de janeiro instituto de veterinária curso de pós-graduação em ciências veterinárias, [S. l.], 2014.

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

PEREIRA, C.D; SOUZA, G.R.L; BAFFI, M.A. Carrapato dos Bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas. **Carrapato dos Bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas.**, [S. l.], p. 1-28, 1 jan. 2010.

SILVEIRA, W.H; CARVALHO, G.D; PECONICK, A.P. Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão. **Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão**, Londrina, v. 8, p. 1-31, 1 maio 2014.

TURETA, E.F; PINTO VARGAS, G; FIORIO, M.S; WORTMANN, B.B; OLIVEIRA, L.R.S; ROSA, R.L; SOUZA, E.M; SANT, L; SILVA, W.O.B. Métodos alternativos e sustentáveis de controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. **Métodos alternativos e sustentáveis de controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus***, [S. l.], v. 21, p. 1-12, 19 jun. 2020.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. ***Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (*Rhabditida: Steinernematidae*) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (*Rhabditida: Heterorhabditidae*) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)**. Parasitology Research. v. 94, p. 201–206, 2004.