

Evaluación del control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vivo con *Metarhizium anisopliae* y extracto de *Annona muricata*

Sônia Maria Forti Broglio¹; Diego Olympio Peixoto Lopes²; Djison Silvestre dos Santos¹; Nivia da Silva Dias-Pini³; Katherine Girón-Pérez⁴; Lúgia Broglio Micheletti¹

¹Universidade Federal de Alagoas, UFAL, BR 104N 57100-000, Rio Largo-AL, Brasil. E-mail: soniamfbroglio@gmail.com

²Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n (São Paulo), 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil;

³Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Bairro Pici, 60511-110, Fortaleza, CE, Brasil;

⁴Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

Resumen: La necesidad de métodos más seguros y menos agresivos para el hombre y el medio ambiente, ha estimulado la búsqueda de nuevo acaricida de productos vegetais y hongos entomopatógenos. Así se evaluó el desempeño del *Metarhizium anisopliae* (10^8 conidios.mL⁻¹) y el extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* (1%) sobre la garrapata bovina *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Se estableció un experimento en condiciones de establo, seleccionando 15 vacas lecheras, las cuales estaban infestadas naturalmente por *R. (B.) microplus*. Cada repetición se compuso por 5 animales, para un total de 3 repeticiones para ambos tratamientos. Los tratamientos se aplicaron por medio de baños de aspersión (4 L) con la ayuda de un pulverizador de espalda manual (20 L). El tratamiento control recibió baños con agua destilada. Transcurridas 24 horas, se colectaron 30 hembras ingurgitadas del ácaro por animal de manera aleatoria. Los parámetros evaluados en el laboratorio fueron mortalidad de las hembras, el índice de conversión de los huevos, peso de los huevos, porcentaje de eclosión y eficiencia de los tratamientos. *M. anisopliae* tuvo mejor desempeño relativo a la mortalidad, el peso del huevo y la eficiencia con 43,9%, 33,8 mg y 53,5%, respectivamente. El aislado *M. anisopliae* (10^8 conidios.mL⁻¹) es potencialmente útil para controlar *R. (B.) microplus* in vivo.

Palabras clave: garrapata, extracto vegetal, hongo entomopatógeno

Avaliação do controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vivo com *Metarhizium anisopliae* e extrato de *Annona muricata*

Resumo: A necessidade de métodos mais seguros e menos agressivos ao homem e ao meio ambiente, tem estimulado a busca de novos produtos vegetais e fungos entomopatogênicos. Assim, avaliou-se o desempenho de *Metarhizium anisopliae* (10^8 conidios.mL⁻¹) e de extrato etanólico de sementes de *Annona muricata* (1%) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Estabeleceu-se um experimento em condições de estábulo, selecionando-se 15 vacas leiteiras. Elas estavam naturalmente infestadas com *R. (B.) microplus*. Cada repetição teve 5 animais, para um total de três repetições para ambos os tratamentos. Os tratamentos foram aplicados em banhos (4L), utilizando um pulverizador manual (20L). O tratamento controle recebeu pulverização com água destilada. Após 24 horas, foram coletadas 30 fêmeas ingurgitadas por animal de forma aleatória. Os parâmetros avaliados em laboratório foram mortalidade das fêmeas, índice de conversão em ovos, peso de ovos, percentual de eclosão e eficiência dos tratamentos. *M. anisopliae* teve melhor desempenho em relação à mortalidade, peso de ovos e eficiência com 43,9%, 33,8 mg e 53,5%, respectivamente. *M. anisopliae* (10^8 conidios.mL⁻¹) é potencialmente útil para controlar *R. (B.) microplus* in vivo.

Palavras chave: carrapato, extrato vegetal, fungo entomopatogênico

Introducción

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) es una especie que causa grandes pérdidas a la bovinocultura brasilera, que van desde la reducción en la producción de carne y leche, hasta la transmisión de patógenos afectando la salud de los bovinos (MELO et al., 2006).

Su control es realizado principalmente a través de la aplicación de productos químicos convencionales sobre los cuales se sabe que el uso excesivo acarrea dos problemas principales: aumento de poblaciones resistentes al principio activo del producto y contaminación debido a la acumulación de residuos en los subproductos obtenidos a partir de los animales tratados, de manera que la búsqueda de alternativas nuevas y compatibles con el medio ambiente es una prioridad para los entes gubernamentales e investigadores. Dentro de ese panorama las plantas son reconocidas fuentes de sustancias con diversas estructuras químicas que controlan poblaciones de artrópodos (CATTO et al., 2009; ANDREOTTI, 2010; ANDREOTTI et al., 2011; BORGES et al., 2011).

En Brasil, algunos resultados producto de las investigaciones en laboratorio realizadas con azadiractina presente en plantas de la familia Meliaceae (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2010) y acetogeninas de la familia Annonaceae (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2009a,b), han sido promisorios en el control del ectoparásito, disminuyendo el riesgo de intoxicación en mamíferos, debido a la rápida degradación ambiental.

Además de las plantas, existen microorganismos considerados importantes agentes de reducción de poblaciones de artrópodos, que ocurren de manera natural o que pueden ser introducidos en un determinado ambiente (BAHIENSE et al., 2007; Quinelato et al., 2012). Los hongos *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) Sorokin, 1883 (Ascomycota: Nectriaceae) y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Ascomycota: Clavicipitaceae) son considerados algunos de esos agentes (ALVES, 1998).

Delante de este escenario, se espera que el uso de otras estrategias de control disminuya el surgimiento acelerado de poblaciones resistentes

y sean menos contaminantes. Es así como el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* y el extracto vegetal de semillas de *A. muricata*, son el foco del presente trabajo cuyo objetivo fue estudiar *in vivo* la mortalidad (%), el índice de conversión en huevos (%), peso de los huevos (mg), porcentaje de eclosión y eficiencia del producto sobre hembras ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

Material y Métodos

Previamente se seleccionaron los extractos vegetales y las cepas del hongo a testar según los resultados obtenidos de ensayos *in vitro* (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2009a) los cuales fueron: (i) Extracto etanólico de semillas de *A. muricata* al 1% y (ii) la cepa de *M. anisopliae* aislada de la garrapata bovina *R. (B.) microplus*, en la concentración de 10^8 conidios.mL⁻¹.

La obtención del extracto etanólico se realizó a partir de cinco kg de semillas de *A. muricata* colectadas en cultivos orgánicos plantados en el municipio de Maceió (AL), la confirmación taxonómica de la especie se realizó en el Instituto del Medio Ambiente (IMA, AL-EXICATA MAC 34903). En seguida, las semillas se secaron en una estufa a 40-45° C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se trituraron en un molino de cuchillas a fin de obtener un polvo fino, el cual se mezcló en alcohol etílico hidratado (92,80 INPM), (1:3) por 48 horas para después evaporar la suspensión dos veces con la ayuda de un rotaevaporador y así para obtener la mayor cantidad de principios activos posibles. Finalmente el extracto se almacenó en nevera ($\pm 5^\circ$ C) para evitar la proliferación de agentes contaminantes.

En el caso de la cepa del hongo aislada de individuos de *R. (B.) microplus*, se empleó el material perteneciente al laboratorio Fitossan (Asistencia Fitosanitaria y Control Biológico Ltda). La viabilidad de la cepa se evaluó utilizando dos placas de Petri con PDA+A dentro de las cuales se depositaron 0,1 mL de la suspensión correspondiente a 10^8 conidios.mL⁻¹, distribuyéndola con una asa de Drigalsky. Las lecturas se realizaron por medio de la determinación del porcentaje de conidios germinados y no germinados, contando 100

conidios por placa después de 24 horas, dando como resultado viabilidad superior a 95%.

Para evaluación de la eficacia del extracto de *A. muricata* y de *M. anisopliae* se seleccionaron 15 vacas lecheras, de la raza Holandesa, mantenidas en establo infestadas naturalmente por *R. (B.) microplus* y exentas de tratamiento químico por aproximadamente dos meses. Se establecieron tres grupos cada uno compuesto por cinco animales, con carga parasitaria similar, cada cual equivalente a una repetición. Cada grupo se asperjó con la ayuda de una bomba de espalda (4L/animal) con las siguientes soluciones representando los tratamientos a evaluar: 1) suspensión conidial del hongo *M. anisopliae* (10^8 conidios.mL⁻¹); 2) Extracto etanólico de semillas de *A. muricata* al 1%, solubilizado en dimetilsulfóxido (DMSO) (p/v) al 1%; y 3) Agua destilada (control). Veinticuatro horas después se realizaron las colectas de las hembras ingurgitadas de manera aleatoria, retirando 30 hembras por animal, mayores a 4 mm de longitud, totalizando 150 hembras por grupo, las cuales se transportaron hasta al laboratorio de Entomología del Centro de Ciencias Agrarias de la Universidad Federal de Alagoas, dentro de placas de Petri almacenadas en cajas térmicas de icopor con hielo, para evitar la oviposición prematura y reducir la movilidad del parásito. Cada hembra se pesó en una balanza analítica BG 400 (Quimis®), con precisión de 0,001g y se aisló y se colocaron individualmente en placas de Petri.

Las colectas de los datos se realizaron a partir del tercer día de montado el experimento cada tres días hasta que iniciaron las primeras eclosiones larvas. Se registró la mortalidad de las hembras, el índice de conversión en huevos (ICH) [(peso de la masa de los huevos/peso del grupo de hembras) x 100], peso de los huevos (mg), porcentaje de eclosión (14 días después de la última pesada de los huevos) y porcentaje de control (% eficiencia del producto). Para calcular la eficiencia del producto (EP) se utilizaron las ecuaciones prescritas por Drummond et al. (1973). El diseño experimental fue completamente al acaso. Los datos se sometieron a análisis de variancia (Test de F) y las medias comparadas a través del test de Tukey (p≤ 0,05). Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico R.

Resultados y Discusión

Según los resultados obtenidos en condiciones *in vivo* se constató que la mortalidad de las teleóginas fue maior cuando tratadas con conidios de *M. anisopliae* ya el extracto de semillas de *A. muricata* no fue tan eficiente sobre la mortalidad de las hembras, alcanzando valores estadísticamente iguales al testigo (Tabla 1).

En respecto al índice de conversión de huevos (ICH) no hubo diferencia significativa entre los tratamientos *M. anisopliae* (32,2%) y el extracto de semillas de *A. muricata* (33,6%), excepto el testigo, el cual alcanzó valores superiores (50,9%). El peso medio de los huevos de las hembras tratadas con el hongo fue menor (33,8%) al hacer la comparación con el testigo (47,8%) y con el extracto de *A. muricata* (41,7%) (Tabla 1).

Tanto el hongo como el extracto alcohólico de *A. muricata* provocaron efectos similares en la eclosión de las larvas. Reducciones hasta de 25% en comparación con el testigo fueron registradas. La eficiencia de ambos tratamientos osciló alrededor 50%, la eficiencia máxima obtenida fue de $53,5 \pm 6,23\%$ correspondiente a la cepa de *M. anisopliae* y de $47,9 \pm 6,14\%$ para *A. muricata* (Tabla 1).

El hecho de *M. anisopliae* ser un organismo vivo de alta proliferación en condiciones adecuadas y su alta capacidad infectiva pudo contribuir con los resultados anteriormente descritos, diferente del extracto vegetal el cual pudo sufrir algún tipo de degradación ambiental, pues en condiciones *in vitro*, Broglio-Micheletti et al. (2009a,b) observaron que el extracto de *A. muricata* al 1% y 2% tuvo eficiencia de 100% de las hembras tratadas. Esa diferencia nos resultados (*in vivo/in vitro*) puede estar relacionada con fotosensibilidad del extracto, o al efecto de degradación debido a la temperatura o humedad relativa. Además, las hembras *in vitro* se sumergieron en los tratamientos para los cinco minutos; el tiempo de exposición así como la eficiencia de aplicación también pueden influir.

Bahiense et al. (2007) realizando experimentos con *M. anisopliae* en animales confinados en establo, verificaron 33% de mortalidad de *R. (B.) microplus* en el grupo tratado con la cepa del hongo ESALQ-959 ($8,0 \times 10^8$ conidios. mL⁻¹ mas 0,1% de Tween 80),

aislada de individuos de la familia Cercopidae, en relación al testigo (agua y 0,1% de Tween 80). Por lo tanto, el valor obtenido es superior (43,9%). También, Boldo et al. (2012) informado de que *M. anisopliae* con la cepa E6 (1×10^8 conidios. mL⁻¹ mas 0,01% de Tween 80) (v/v) mortalidad causada (hasta 60.61%) en las hembras ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, también interferir con su ciclo biológico, lo que reduce la oviposición y eclosión de las larvas.

El impacto del tratamiento *M. anisopliae* sobre el potencial reproductivo de las hembras (ICH) se reflejó en la disminución del número de huevos. De lo contrario, Broglio-Micheletti et al. (2009a,b) reportaron que en observaciones *in vitro* el extracto de semilla de *A. muricata* al 1% y 2%, afectó la oviposición y el peso de los huevos al comparar con el testigo. Acción de tratamiento

en ovoposición permite efecto en las generaciones siguientes, tal como Catto et al. (2009) demostraron que individuos tratados con extractos de la raíz de *Annona dioica* L. (Annonaceae) a partir de la concentración 2,5% disminuyó significativamente la producción de huevos, llegando hasta cero al aplicar la concentración 20%, puesto que el potencial reproductivo de las hembras y el peso de los huevos se verá afectado (disminución).

A pesar de que el efecto directo sobre la mortalidad de las hembras haber sido *in vivo* 43,9% para *M. anisopliae*, hay interferencia en la reproducción de las hembras expuestas, expresada en la disminución del número de huevos y el porcentaje de eclosión de las larvas, lo que se traduce en reducción de la población a lo largo de las generaciones.

Tabla 1 - Mortalidad media¹ ± (ES), índice de conversión en huevos (ICH); peso de los huevos, porcentaje de eclosión y eficiencia del producto sobre hembras de *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887).

Tratamiento	Mortalidad (%)	ICH (%)	Peso huevos (mg)	Eclosión (%)	Eficiencia Producto (%)
Testigo	26,8±0,07b	50,9±1,60 ^a	47,8±1,93a	83,4±3,58a	-
<i>M. anisopliae</i>	43,9±0,07a	32,2±1,99b	33,8±2,63b	58,3±4,47b	53,5±6,23
<i>A. muricata</i>	28,8±0,08b	33,6±2,27b	41,7±2,56a	68,2±4,33b	47,9±6,14

Medias seguidas pela misma letra en las columnas no difieren estadísticamente entre si según el test de Tukey (p< 0,05).

-No aplica

Fonte: Dados da Pesquisa

Conclusión

O aislado *M. anisopliae* (10^8 conidios.mL⁻¹) es potencialmente útil para controlar *R. (B.) microplus in vivo*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes entidades: FAPEAL (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e

Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por la financiación del proyecto y a los propietarios de animales de permiso para llevar a cabo el trabajo.

Referencias

- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Ed. Manole, 1998. 407p.
- ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F.D.; SOARES, M.A.; BARROS, J.C.; MILLER, R.J.; LÉON, A. P. de. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of

Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p. 127-133, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000200007>>

ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010, 36p. (Documento, 180).

BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I. da C.; PERINOTTO, W. M. de S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação do potencial de controle biológico de *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.4, p.243-245, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612007000400012>>.

BOLDO, J. T.; CAMPOS, R.A.; VARGAS, L.R.B.; AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M. de. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* towards *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* under laboratory and field conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n.27, p. 5650-5656, 2012. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJMR>> doi: 10.5897/AJMR12.435.

BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.; BARBOSA, C.S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n.2, p. 89-96, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000200001>>

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; DIAS, N. S.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; LOPES, D.O.P.; Santos, J.M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.46-50, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01901008>>

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; DIAS, N.S.; ARAÚJO, A.M.N. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista**

Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.18, n.4, p.44-48, 2009a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01804008>>

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; DIAS, N.S.; GIRÓN-PÉREZ, K.; TRINDADE, R.C.P. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) com extractos vegetales. **Revista Colombiana de Entomologia**, v.35, n.2, p.145-149, Disponível em 2009b.<http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012004882009000200006&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 22 ago. 2013.

CATTO, J.B.; BIANCHIN, I.; SAITO, M.L. **Efeito acaricida *in vitro* de extratos de plantas do pantanal no carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, MS, 2009. 26p (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 26).

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLAUDNEY, W. J.; GRAHAM, H. O. *Boophilus annulatus* and *B. microplus* laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/ez278.periodico.s.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.882004&url_ctx_fmt=>

MELO, D.R. de; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.4, p.157-162, 2006. Disponível em: <http://cbpv.org.br/rbpv/documentos/1542006/c154157_162.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2013.

QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v.190, n. 3-4, p. 556-565, 2012. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/vetpar>

Recebido em: 15/10/2013

Aceito em: 12/11/2014