



**Utilização de
fungos
entomopatogênicos
para o controle
de carrapatos:
protocolos
experimentais**



*Marcos Valério Garcia
Leandro de Oliveira Souza Higa
Vinicius da Silva Rodrigues
Jacqueline Cavalcante Barros*



INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus, conhecido popularmente como carrapato-do-boi, está amplamente distribuído no mundo. O carrapato bovino pode ser encontrado nas diversas regiões do Brasil, sendo o controle deste ectoparasita realizado principalmente por meio de produtos químicos. Um dos principais entraves neste método de controle é a capacidade que o parasita tem em adquirir resistência aos tratamentos aplicados (controle químico), dificultando o controle do parasita.

Este carrapato causa prejuízos diversos à produção da cadeia bovina nacional, sendo responsável por danos diretos (perda de peso, diminuição na produção de leite, danos no couro, transmissão de patógenos) e indiretos (aquisição de acaricidas e mão-de-obra para aplicação dos produtos), somando perdas da ordem de 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014).

As principais bases químicas utilizadas atualmente no controle do carrapato são: organofosforados, piretróides, aminidínicos, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis (fipronil) (FURLONG; PRAIA, 2000) e o fluazuron (inibidor do crescimento).

A presença da resistência é constatada em todo mundo desde meados do século 20, sendo o Brasil um dos países com maior número de classes apresentando a condição de resistência por parte dos carrapatos.

Dentre as principais causas da resistência, temos a aplicação inadequada dos produtos químicos e o aumento no grau de sangue taurino, o que, geralmente, confere menor tolerância às infestações (ARANTES et al., 1995). Atualmente, no Brasil, já se tem relatos de resistência a basicamente todas as classes de acaricidas, incluindo cepas multirresistentes (RECK et al., 2014; HIGA et al., 2015).

Diante de tal situação, a necessidade de busca por novas metodologias de controle têm chamado a atenção das indústrias nos últimos anos, uma vez que estudos para desenvolver novas moléculas com ação acaricida são altamente onerosos. Dentre as formas de controle alternativo podemos citar: vacinas, produtos fitoterápicos e a utilização de microrganismos, controle este conhecido como microbiológico (bactérias, nematóides e fungos entomopatogênicos).

Nesse capítulo daremos foco principalmente aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* que, entre os entomopatogênicos, são os mais estudados (FERNANDES et al., 2012) e que exercem grande capacidade de controle desses artrópodes, principalmente quando testados em condições laboratoriais.

USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

O termo entomopatogênico é empregado a alguns organismos que possuem a capacidade de causar patogenicidade a um hospedeiro, geralmente insetos, nos quais a utilização deste fungo é amplamente conhecida e empregada como inseticidas. A ação inseticida se dá por meio da liberação de toxinas e outras substâncias (ALMENARA, 2011).

Alguns fungos atuam de forma mecânica, penetrando na cutícula do hospedeiro e lesando tecidos internos do carrapato sem, necessariamente, demonstrarem preferência por orifícios naturais (anus, orifício genital e o espiráculo respiratório) (BITENCOURT et al., 1999; GARCIA et al., 2004).

Para o controle de carrapatos, os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são os mais estudados (FERNANDES et al., 2012).

Um dos grandes problemas no uso de fungos como acaricidas é a influência de fatores abióticos (temperatura, radiação solar e umidade), reduzindo a persistência dos conídios e consequentemente diminuindo a eficácia (RANGEL et al., 2004; BRAGA et al., 2002).

Um dos fatores que auxiliam na eficácia dos fungos entomopatogênicos é o tipo de pastagem. Basso et al. (2005) aplicaram a calda contendo cultura de *M. anisopliae* em canteiros com gramíneas das espécies *Brachiaria brizantha* e *Cynodon* spp., que infestaram previamente com larvas de *R. microplus*. Estes autores consideraram os resultados satisfatórios para o controle de larvas em pastagens, com eficácia mais acentuada em pastagens de *Cynodon* spp. A maior eficácia no capim *Cynodon* spp. se deve ao tipo de microclima provido, uma vez que o crescimento do tipo estolão favorece a retenção de umidade no solo (SAUERESSIG, 1994).

Garcia et al. (2011) avaliaram a eficácia de *M. anisopliae* em pasto de *Brachiaria decumbens* e também por meio de bioensaios *in vitro* (teste de imersão com teleóginas de *R. microplus*). O pasto tratado foi pulverizado a cada 21 dias com suspensão conidial aquosa de *M. anisopliae*, somando um total de 12 aplicações, doze animais foram mantidos na pastagem durante as pulverizações. Neste estudo, não houve diferença estatística significativa na contagem de larvas no pasto tratado e teleóginas nos animais, em comparação com o pasto controle que foi pulverizado com o veículo da suspensão, sendo a eficácia comprovada apenas nos testes de imersão.

A toxina 'destruxina A', produzida pelo fungo *M. anisopliae*, foi utilizada isoladamente para o tratamento dos carrapatos por Gólo et al. (2011). A produção dessa toxina parece estar ligada à virulência de *M. anisopliae* (PAL et al., 2007), mas não foi encontrado nenhum efeito sobre as teleóginas ou mesmo sobre seus parâmetros reprodutivos.

Quinelato et al. (2012) selecionaram três cepas de *M. anisopliae* dentre 30 isolados provenientes de todo Brasil, mostrando eficácia de até 100% em algumas cepas nos testes *in vitro* no vigésimo dia pós tratamento. Tal achado constitui fato importante para o desenvolvimento de formulações que apresentem virulência direcionada para o controle de *R. microplus*.

Monteiro et al. (2013) realizaram estudo na tentativa de otimizar a eficácia de fungos utilizando nematóides também entomopatogênicos. Nematóides (*Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP) e fungos (*Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986) foram testados separadamente e em conjunto. Em condições *in vitro* os autores encontraram eficácia parcial dos fungos (31% a 55%) e dos nematóides isoladamente (90%). O uso conjunto dos patógenos alcançou eficácia de 100%, sendo um importante achado para futuros testes no campo e para o desenvolvimento de novas tecnologias.

Diante dos avanços nas pesquisas, o interesse na produção de formulações comerciais tem aumentado muito por parte das indústrias. Algumas formulações baseadas na ação de fungos entomopatogênicos já podem ser encontradas, porém sua grande maioria foi desenvolvida para controle de pragas agrícolas (FARIA; WRAIGHI, 2007).

Camargo et al. (2014) realizaram o primeiro teste com uma formulação comercial, o Metarril SP orgânico. Neste estudo, foram utilizados três litros da formulação fúngica

em cada bovino infestado com larvas de *R. microplus*. O tratamento apresentou aumento gradual na eficácia durante o decorrer do experimento, alcançando 67,39% na terceira semana. Outra informação importante no estudo envolve a ausência de reações adversas nos bovinos por efeito do tratamento.

Um fator que pode auxiliar na ação dos fungos é a utilização de óleos de origem vegetal na solução de água e suspensão conidial (SAMISH et al., 2014). Esses autores utilizaram o *Metarhizium brunneum* contra o carrapato *Rhipicephalus annulatus*, encontrando resultados significativos na variável 'eclodibilidade' das larvas em tratamentos contendo o óleo.

Os autores acima realizaram também teste em baldes, encontrando diferença significativa entre populações de carrapatos tratados e não tratados no verão e no inverno com o referido fungo. Na estação do verão, 93% das fêmeas expostas aos fungos morreram em uma semana, e no inverno, a eficácia caiu para 62,2% em três semanas. Essas informações somam importantes relatos para a formulação de produtos comerciais e futuros testes no campo.

Em um trabalho realizado na China, Sun et al. (2013) comprovaram também a eficácia do fungo *B. bassiana* no controle do carrapato bovino. Em condições laboratoriais foi comprovada a ação patogênica de três isolados do fungo, nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL, constituindo mais uma importante alternativa como forma de controle e objeto de futuros estudos para testes no campo.

O patógeno *B. bassiana*, juntamente com *M. anisopliae* também foi testado em ninfas de *Amblyomma cajennense*. Os relatos foram feitos por Lopes et al. (2007), que utilizou Boveril WP PL63 e Metarril SC 1037. O produto à base de *B. bassiana* foi testado nas concentrações de 2×10^7 e 4×10^7 conídios/mL (4.000 e 8.000g p.c./100L, respectivamente) e o produto à base de *M. anisopliae* nas concentrações de 1×10^7 , $1,5 \times 10^7$, 2×10^7 , 3×10^7 e 5×10^7 conídios/mL (1.000; 1.500; 2.000; 3.000 e 5.000 mL p.c./100L, respectivamente). O tratamento à base de *B. bassiana* atingiu 40% apenas na formulação com maior concentração, enquanto que o produto à base de *M. anisopliae* atingiu até 100% de eficácia após seis dias de tratamento, nas duas formulações com maiores concentrações.

Mais recentemente, Webster et al. (2015) avaliaram a utilização do *M. anisopliae* associado com produtos acaricidas. Diversas formulações de acaricidas foram diluídas de acordo com a indicação comercial. Cada composto acaricida foi adicionado às suspensões de *M. anisopliae* (concentração final de 1×10^8 conídios/mL) e deixados em contato por oito diferentes intervalos (1, 5, 10, 24, 48, 72, 96 e 120 horas).

Todos os acaricidas testados por Webster et al. (2015) (amitraz, cipermetrina, diazinon, cipermetrina + clorpirifós + butóxido de piperonila) reduziram a viabilidade dos fungos em pelo menos um dos tempos, com exceção da formulação cipermetrina + clorpirifós.

Os autores acima realizaram ainda experimentação no campo, utilizando 20 bovinos (*Bos taurus taurus*) com os seguintes tratamentos: formulação acaricida (cipermetrina + clorpirifós); suspensão conidial de *M. anisopliae*; formulação acaricida + suspensão conidial; grupo controle sem tratamento. Não houve diferença estatística nos tratamentos com acaricida e suspensão conidial isoladamente (71,1% e 56,3%, respectivamente), porém a associação entre os dois produtos apresentou 97,9% de eficácia.

Protocolo utilizado experimentalmente para obtenção da suspensão de conídios puros do fungo *M. anisopliae* visando o controle do carrapato *R. microplus* na pastagem

- O fungo *M. anisopliae* pode ser cultivado em placas de Petri contendo como substrato uma mistura de batata, dextrose e ágar (BDA), mantida em estufa a $27 \pm 0,5$ °C, sem fotoperíodo (na ausência de luz).
- Recuperação da virulência do fungo: a partir de placas colonizadas, pode-se realizar bioensaios para recuperação da virulência do isolado. Recomenda-se utilizar três grupos de dez fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas. Para tal é empregado o Teste de Imersão de Adultos (IIA), onde as teleóginas são imersas na suspensão conidial do fungo na concentração de 10^8 conídios/mL, durante três minutos. O mesmo procedimento deve ser aplicado no grupo testemunha ou controle, no qual é utilizado apenas o veículo da suspensão.
- Após a morte das fêmeas e extrusão do patógeno, o fungo é reisolado em placas de Petri contendo o meio BDA.
- Este processo ocorre até que a ação do fungo sobre as teleóginas alcance um percentual de eficácia (morte) maior do que 90%.
- Posteriormente o fungo é novamente reisolado e a cultura pura é destinada a uma empresa especializada na produção em massa do fungo, segundo metodologia descrita por Leite et al. (2003).
- A produção se dá em sacos contendo 1 kg de arroz seco com o fungo crescido, os quais são mantidos a -20 °C até o momento do uso.

Preparo da suspensão conidial

- Aproximadamente dois dias antes da data da pulverização, coleta-se uma amostra dos sacos de arroz com o fungo, para formar amostras menores. Para tanto, desta amostra se coleta alíquotas de 1 g que são transferidas em tubos de ensaio contendo nove mL de solução de Tween 80. Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubo para separar os conídios do arroz e desagregar as cadeias de conídios, faz-se a contagem em câmara de Neubauer para determinação da quantidade de conídios por grama de arroz.
- Estas mesmas suspensões são usadas para determinação da viabilidade dos conídios, segundo metodologia descrita por Marques et al. (2004).
- No dia da pulverização, os sacos de estocagem do fungo são retirados do freezer e colocados em geladeira para descongelar. Cerca de 3 a 4 horas antes da pulverização o arroz de cada saco (1 kg) é transferido para um saco de plástico com capacidade para cinco litros. Estes sacos recebem três litros de solução aquosa de Tween 80® a 0,1% (v/v), sendo, em seguida, submetidos a uma vigorosa manipulação externa para separação dos conídios do arroz e desagregação das cadeias de conídios (Figura 9.1). Logo após, a suspensão obtida é coada em pano fino de algodão para evitar o entupimento do bico do pulverizador durante a aplicação (Figura 9.2).
- As suspensões de cada saco de arroz são misturadas e diluídas em água para obtenção da suspensão conidial a ser pulverizada na pastagem (Figura 9.3). Coleta-se, então, uma alíquota da suspensão para determinar a sua concentração em câmara

de Neubauer e, concomitantemente, para avaliação da atividade do fungo “in vitro”. Essa verificação é importante na determinação de eventual necessidade de correção da quantidade de conídios a ser pulverizada.

Aplicação da suspensão

- São utilizados em média cinco a seis quilogramas de arroz com o fungo, para produzir 400 L de suspensão conidial, que é a quantidade suficiente para pulverizar em média 66,7 mL de suspensão por metro quadrado de pastagem.

FIGURA 9.1. Remoção dos conídios de *Metarhizium anisopliae* do arroz.
Foto: Marcos Valério Garcia.



FIGURA 9.2. Coagem da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* em tecido de algodão.
Foto: Marcos Valério Garcia.



- Em pastagens nas quais é possível o uso de trator a aplicação é realizada com pulverizador de barra, com bico tipo cônico, a 50 cm de altura do solo (figura 9.4). É recomendável que as pulverizações sejam efetuadas a partir das 17 horas, em dias nublados, ou no início da manhã. Durante o horário de verão pulverizar depois das 18 horas. A aplicação também pode ser feita por aviões agrícolas, quando a pastagem for muito extensa e/ou não permitir o uso de tratores.



FIGURA 9.3. Acondicionamento da suspensão de *Metarhizium anisopliae* para transportar até o local da pulverização.
Foto: Marcos Valério Garcia.



FIGURA 9.4. Aplicação da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* em pastagem de *Brachiaria decumbens*, com pulverizador de barra.
Foto: Marcos Valério Garcia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Entomopathogenic nematodes: two sides of a symbiosis. *Revista da Biologia*, v. 6b, p. 1-6, 2011.
- ARANTES, G. J.; MARQUES, A. O.; HONER, M. R. O carrapato bovino, *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: Análise de sua resistência contra carrapaticidas comerciais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 2, p. 89-93, 1995.
- BASSO, L. M. S.; MONTEIRO, A. C.; BELO, M. A. A.; 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*, Brasília, v. 40, n. 6, p. 595-600, jun. 2005.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. The penetration of the fungus *Metarhizium anisopliae* on *Boophilus microplus* in experimental conditions. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 351-354, 1999.
- BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia*, v. 94, n. 6, p. 912-920, 2002.
- CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; GÔLO, O. S.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. *Veterinary Parasitology*, v. 205, n. 1-2, p. 271-276, 2014.
- FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.
- FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*, v. 130, n. 3, p. 300-305, 2012.
- FURLONG, J.; PRATA, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Embrapa Gado de Leite, 2000, 2p. (Sustentabilidade da Atividade Leiteira, 34).
- GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; MOCHI, D. A.; SIMI, L. D.; CARVALHO, W. M.; TSURUTA, A. S.; BARBOSA, J. C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 181, n. 2-4, p. 267-273, 2011.
- GÔLO, P. S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effects of destruxin A on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 338-341, 2011.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. *Medicinal chemistry*, v. 5, n. 7, p. 326-333, 2015.
- LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; PÉREZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.
- LEITE, J. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. 1. Ed. Ribeirão Preto: Sene Pinto, 2003, v. 1, 92p.
- MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.
- MONTEIRO, C. M. O.; ARAÚJO, L. X.; MATOS, R. S.; GÔLO, O. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; RODRIGUES, C. A. C.; FURLONG, J.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; PRATA, M. C. A. Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, v. 112, n. 10, p. 3645-3651, 2013.

- OLIVO, C. J.; CARVALHO, N. M.; SILVA, J. H. S.; VOGEL, F. F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; MOREL, C. A. A. F.; VIAU, L. V. Óleo de citronela no controle de carrapatos bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 406-410, mar.-abr. 2008.
- PAL, S.; LEGER, R. J. S.; WU, L. P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8969-8977, 2007.
- 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.
- RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on artificial and natural substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 1, p. 77-83, 2004.
- RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'ANGOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-36, 2014.
- 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, n. 3-4, p. 258-266, 2014.
- SAUERESSIG, T. M. **Estudo da fase não parasitária do carrapato de bovinos em pastagens cultivadas e nativa no Distrito Federal**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1994. 15p. (Boletim de Pesquisa, 37).
- SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LI, Y.; HAN, X.; MA, C.; YIN, H.; LUO, J. Effectiveness of *Beauveria bassiana sensu lato* strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. **Parasitology International**, v. 62, n. 5, 412-415, 2013.
- WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G. M.; BEYS-DA-SILVA, W.; MARTINS, J. R.; SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, 302-308, 2015.
- WHO – World Health Organization, 1965. Technical Report Series No. 296, pp. 29.