

**UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NO CONTROLE BIOLÓGICO
DAS PARASIToses QUE ACOMETEM BOVINOS EM PROPRIEDADE
RURAL DO ESPÍRITO SANTO**

RICARDO LEANDRO OLIVEIRA SOUZA

VILA VELHA
DEZEMBRO/2019
UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NO CONTROLE BIOLÓGICO
DAS PARASITOSEs QUE ACOMETEM BOVINOS EM PROPRIEDADE
RURAL DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal, para
a obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

RICARDO LEANDRO OLIVEIRA SOUZA

VILA VELHA
DEZEMBRO/2019

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S729u Souza, Ricardo Leandro de Oliveira.
Utilização de fungos nematófagos no controle biológico das
parasitoses que acometem bovinos em propriedade rural do Espírito
Santo / Ricardo Leandro de Oliveira Souza. – 2019.
31 f. : il.

Orientador: Fabio Ribeiro Braga.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Vila Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Medicina veterinária. 2. Pragas – Controle biológico.
3. Fungos nematófagos. 4. Sustentabilidade. I. Braga, Fabio Ribeiro.
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.89

RICARDO LEANDRO OLIVEIRA SOUZA

UTILIZAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DAS
PARASIToses QUE ACOMETEM BOVINOS EM PROPRIEDADE RURAL DO
ESPIRITO SANTO

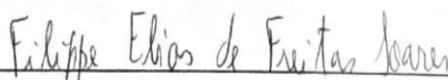
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal, para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal.

Aprovado em 20 de dezembro de 2020

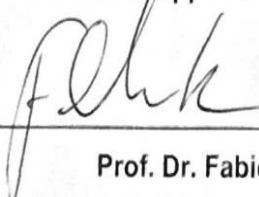
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Dominik Lenz (UVV)



Prof. Dr. Filipe Elias de Freitas Soares (UFLA)



Prof. Dr. Fabio Ribeiro Braga (UVV)

Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu orientador, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus por ter concedido essa oportunidade em minha vida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo apes pela minha bolsa de estudos.

Aos meus amados pais, Geraldo e Hélia por todo suporte, amor e incentivo e paciência no período de todo estudo deste trabalho.

O meu querido amigo Caio Colodette por todo apoio necessário e ajuda nos momentos de dificuldades.

A minha querida amiga Carolina Magri, por todo apoio e ajuda necessária.

Ao meu orientador, professor Dr. Fabio Ribeiro Braga, por todo seu apoio de sempre, sua amizade, que sempre acreditou em mim e no meu potencial, além de sua dedicação, competência, atenção e sugestões, fatores estes fundamentais para realização deste trabalho.

A minha querida colega e incentivadora Prof. Msc. Emy Hiura, por toda paciência e ajuda nos dias difíceis.

Ao meu querido colega de turma Gustavo Soeiro pela ajuda na realização das pesquisas em sua propriedade.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários da UVV, Silvia, Alan e Edson por toda ajuda.

A Universidade Vila Velha (UVV) pela oportunidade e confiança.

SUMARIO

RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Filo artopoda / Classe arachnida.....	15
2.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	15
2.3 Resistência parasitária <i>versus</i> Controle químico.....	16
2.4 Controle Biológico <i>versus</i> parasitos de animais domésticos.....	18
2.5 Fungos Nematófagos.....	18
4. OBJETIVOS.....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	29
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	30

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cm: centímetros

mm: milímetros

ml: mililitro

Kg: quilograma

%: porcentagem

g: grama

°C: grau Celsius

ANOVA: análise de variância

AC001: *Duddingtonia flagrans*

NF34: *Monacrosporium thaumasium*

SF53: *M. sinense*

AA: ágar-água

AQ: ágar quitina

BDA: batata dextrose ágar

BOD: demanda bioquímica de oxigênio

CMA: corn-meal-ágar

L₃ : Larva de terceiro estágio

m²: metro quadrado

pH: potencial hidrogeniônico

RESUMO

SOUSA, RICARDO LEANDRO DE OLIVEIRA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, dezembro de 2019. Utilização de fungos nematófagos no controle biológico das parasitoses que acometem bovinos em propriedade rural do espírito santo. Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

O objetivo do presente trabalho foi utilizar fungos nematófagos no controle biológico das parasitoses que acometem bovinos em propriedade rural do Espírito Santo. Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico da Universidade Vila Velha (UVV). As fêmeas ingurgitadas (teleóginas) de carrapatos *Rhipicephalus Boophilus microplus* foram coletados manualmente de bovinos naturalmente infectados provenientes da propriedade rural no município de Santa Leopoldinda, estado do Espírito Santo. Foram utilizados os fungos *Duddingtonia flagrans* (AC001); *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Monacrosporium sinense* (SF53). Foram realizados dois ensaios (A e B). No ensaio A, testou-se o controle de teleoginas (lesão na cutícula) de *R. (Boophilus) microplus* após a interação com estruturas fúngicas dos isolados AC001, NF34 e SF53 *in vitro*. No ensaio B, testou-se o controle da eclodibilidade dos ovos após a interação com estruturas fúngicas de AC001, NF34 e SF53 *in vitro*. No ensaio A, foram formados 4 (quatro) grupos experimentais em placas Petri de 12 cm com cerca de 30 fêmeas por placa. Foram realizadas seis repetições por grupo. Grupo 1, tratado com 20µL (10^6) de solução fungica conídios/clamidósporos de *D. flagrans* (AC001) + 30 teleoginas; grupo 2, tratado com 20µL de solução fungica conídios/clamidósporos de *M. thaumasium* (NF34) + 30 teleoginas; grupo 3, tratado com 20µL de solução fungica conídios/clamidósporos de *M. sinense* + 30 teleoginas (SF53) e grupo 4, controle, recebeu apenas as 30 teleoginas de *R. Boophilus microplus*. A seguir, todas as placas de petri dos grupos tratados e controle foram acondicionadas em câmara de incubação $\pm 27^\circ$ C e $80 \pm 80\%$ de umidade relativa por um período de 21 dias. No ensaio B, testou-se a eclodibilidade dos ovos após a interação na concentração de 10^6 de conídios/clamidósporos/ml de AC001, NF34 e SF53 *in vitro*. Após as coletas das teleoginas, as mesmas foram lavadas em água corrente, secas,

identificadas e acondicionadas em câmara climatizada regulada a temperatura de $\pm 27^{\circ}$ C e umidade relativa a 80% para a postura dos ovos. Após a postura, os ovos foram transferidos para tubos de ensaio na proporção de 100mg (100 ovos). Grupo 1, foi tratado com solução fungica 10^6 conídios/clamidósporos de *D. flagrans* (AC001) + 100 ovos; grupo 2, tratado com solução fungica 10^6 conídios/clamidósporos de *M. thaumasium* (NF34) + 100 ovos; grupo 3, tratado com solução fungica 10^6 conídios/clamidósporos de *M. sinense* (SF53) + 100 ovos e grupo 4, controle que recebeu apenas 100 ovos de *R. Boophilus microplus*. Foram realizadas 3 repetições para grupo experimental. A seguir, todos os tubos de ensaio dos grupos tratados e controle foram acondicionados em câmara de incubação $\pm 28^{\circ}$ C e 80% de umidade relativa por um período de 21 dias (Braga et al., 2013). Os resultados dos ensaios A e B demonstraram que houve interação, crescimento, colonização e destruição (lesão na cutícula) dos exemplares fêmeas de carrapatos e diminuição da eclodibilidade dos ovos de *R. Boophilus microplus* pelos fungos AC001, NF34 e SF53, o que poderá ser visto como uma ferramenta de pesquisa em outros trabalhos, uma vez que devido ao possível enriquecimento do meio com AQ2% houve essa interação.

Palavras-chave: controle biológico, sustentabilidade, prejuízo econômico.

ABSTRACT

SOUSA, RICARDO LEANDRO DE OLIVEIRA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, December 2019. Use of nematophagous fungi in the biological control of parasitic diseases affecting cattle in a rural property of Espírito Santo. Advisor: Fábio Ribeiro Braga.

The aim of the present study was the use of nematophagous fungi in the biological control of parasitic diseases affecting cattle in a rural property of Espírito Santo. The experimental assays were carried out at the Laboratory of Experimental Parasitology and Biological Control of the University Vila Velha (UVV). The engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks were collected manually from naturally infected cattle from a farm of Santa Leopoldinda, Espírito Santo state. The following fungi were used: *Duddingtonia flagrans* (AC001); *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Monacrosporium sinense* (SF53). Two assays were performed (A and B). In assay A, control of engorged females (cuticle lesion) of *R. microplus* was tested after interaction with fungal structures of isolates AC001, NF34 and SF53 *in vitro*. In assay B, we tested the control of hatchability of eggs after interaction with fungal structures AC001, NF34 and SF53 *in vitro*. In trial A, four (4) experimental groups were formed in 12 cm Petri dishes, with about 30 females per plate. Six repetitions were performed per group. Group 1, treated with 20 μ L (10^6) of *D. flagrans* conidia/chlamydozoospores fungal solution (AC001) + 30 engorged females; group 2, treated with 20 μ L (10^6) of *M. thaumasium* conidia/chlamydozoospores fungal solution (NF34) + 30 engorged females; group 3, treated with 20 μ L (10^6) of *M. sinense* conidia/chlamydozoospores fungal solution (SF53) + 30 engorged females and group 4, control, received only the 30 engorged females of *R. microplus*. All petri dishes of the treated and control groups were then placed in an incubation chamber ± 27 °C and 80 \pm 80% relative humidity for a period of 21 days. In assay B, hatchability of eggs, after interaction at the concentration of 10^6 conidia/chlamydozoospores/mL of AC001, NF34 and SF53 *in vitro*, was tested. After collecting the engorged females, they were washed in running water, dried, identified and conditioned in a climate chamber at ± 27 ° C and relative humidity 80% for egg laying. After laying, the eggs were transferred to test tubes in the proportion of 100mg (approximately

100 eggs). Group 1 was treated with 10^6 conidia/chlamydospores of *D. flagrans* (AC001) + 100 eggs.; group 2 was treated with 10^6 conidia/chlamydospores of *M. thaumasium* (NF34) + 100 eggs; group 3 was treated with 10^6 conidia/chlamydospores of *M. sinense* (SF53) + 100 eggs; and group 4, control, which received only 100 *R. microplus* eggs. Three repetitions were performed for each experimental group. All test tubes in the treated and control groups were then placed in an incubation chamber at ± 28 ° C and 80% relative humidity for a period of 21 days. The results of assays A and B showed that there was interaction, growth, colonization and destruction (cuticle injury) of female ticks and decreased hatchability of *R. microplus* eggs by AC001, NF34 and SF53 fungi, This may be seen as a research tool in other works, since probably due to the enrichment of the medium with AQ2% there was this interaction.

Keywords: biological control, sustainability, economic loss

1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina é uma atividade de extrema importância econômica para o Brasil. O país possui hoje o maior rebanho comercial do mundo com, aproximadamente, aproximadamente 214,9 milhões de cabeças de gado, colocando o país como o maior produtor comercial do mundo e com isso destacando-se a plena evolução desse rebanho e a melhoria dos índices zootécnicos (IBGE, 2017).

Os entraves ao crescimento e produção do rebanho bovino no Brasil e no mundo são muitos, dos quais os parasitos correspondem a grande parte deste problema. Os carrapatos tem sido há muito tempo um sério entrave para o produtor no dia-a-dia da propriedade. Além disso, no Brasil, especificamente, dentre os vários fatores que são responsáveis pela cronicidade deste problema podem ser aqui mencionados: (a) intensificação no sistema de produção de leite corte; (b) aumento do grau de sangue europeu do rebanho; (c) aparecimento generalizado da resistência de carrapatos às bases químicas disponíveis no mercado e (d) e as variáveis climáticas, sendo uma região favorável ao desenvolvimento de carrapatos em fase de vida livre durante todo o ano. Dessa forma, de todos os problemas enfrentados pelos produtores, sem dúvidas o carrapato é o principal (Furlong et al., 2004).

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas, da classe Arachnida, de distribuição mundial, parasitando vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. O estudo desses ectoparasitas é importante para a saúde pública e animal, por transmitirem agentes infecciosos e causarem injúrias a seus hospedeiros durante a hematofagia. O “carrapato do boi” recebe o nome científico de *Rhipicephalus Boophilus microplus* e para o melhor entendimento é um animal que pertence ao grande grupo das aranhas e escorpiões, parasitando o bovino pelo menos em uma fase de sua vida. Tem sido reconhecido como uma praga que provoca danos diretos a saúde dos animais, como a inoculação dos parasitas *Babesia bovis*, *B. bigemia* e *Anaplasma marginale* configurando o complexo Tristeza Parasitária Bovina (Furlong et al., 2007).

O Espírito Santo conta com um rebanho de 1.937.684 de cabeças de bovinos no universo de 214,9 milhões de cabeças do rebanho nacional (IBGE,

2017). Entretanto, os principais fatores que interferem no desenvolvimento da pecuária bovina no Espírito Santo, são as verminoses e os problemas causados pelos ectoparasitos (carrapatos). Diante de tal afirmação, a literatura relata o retardo no desenvolvimento dos animais e com isso o aumento de gastos excessivos com manejo, e tratamento com controle químico, o que leva a uma baixa produtividade do rebanho e conseqüentemente a elevadas perdas econômicas (Dantas et al., 2010). Levando em conta que a produção de leite em 2017 totalizou 33,5 bilhões de litros, recuo de 0,5% em relação a 2016, ou seja, a produtividade, o número médio de litros de leite obtido no ano por cabeça, foi de 1.963 litros no país em 2017 (IBGE, 2017).

De acordo com Grisi et al. (2014), as perdas (peso, retardo no crescimento e obitos) podem chegar a 3,24 bilhões de dólares por ano. Assim como os demais ectoparasitos, este carrapato tem um ciclo de desenvolvimento ambiental e outro parasitário (Taylor et al., 2010; Santos & Vogel, 2012). A fase parasitária inicia-se no momento em que as larvas se fixam no hospedeiro e se finaliza quando a fêmea ingurgitada desce do hospedeiro para realizar a postura dos ovos no ambiente.

Diante desse universo, medidas que possam ajudar no controle das formas parasitárias deste artrópode são bem-vindas (Aguilar et al., 2018), em destaque o controle biológico, realizado com fungos nematófagos, destacando-se os gêneros *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthobotrys*. Existem vários trabalhos que registram a ação destes fungos frente os parasitos que acometem o rebanho bovino animal (Braga e Araújo, 2014; Vilela et al., 2018; Luns et al., 2018). Contudo, trabalhos que preconizem a atuação sobre o carrapato *R. (Boophilus) microplus* são escassos, sendo essa uma importante premissa do presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filo artopoda / Classe arachnida

Os carrapatos são indivíduos classificados no filo artrópoda e são comumente conhecidos por serem ectoparasitos hematófagos. Eles parasitam o hospedeiro, prejudicando seu hábito de vida e podendo desenvolver doenças no mesmo., São classificados em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (Keirans e Robbins, 1999; Horak et al., 2002). Na presente revisão, será dado mais ênfase a família Ixodidae, devido aos vários problemas causados na pecuária bovina brasileira.

Os Ixodídeos são responsáveis por grandes perdas econômicas para a pecuária de regiões tropicais e subtropicais, esses ectoparasitas possuem uma alimentação com um tempo mais prolongado e esta é feita uma única vez em todo o ciclo de vida e a ovoposição resulta num grande número de ovos (de várias centenas a 23.000 ovos por fêmea) e depois morrem (Klompen, 2005). Possuem um escudo quitinoso que recobre toda superfície do corpo do indivíduo adulto, diferente do carrapato da família argasídeos que não possuem escudo quitinoso (Urquhart et al., 1998).

O carrapato da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ixodídeo e realiza a postura de ovos em torno de 5.000 a 8.000 (Klompen, 2005).

2.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Caracterizado como o principal carrapato que parasita os bovinos, *R. microplus* é o carrapato que se encontra em regiões tropicais e subtropicais, esses indivíduos se desenvolvem bem nestas regiões devido a exposição a temperatura maior e a umidade elevada, esses fatores influenciam de forma positiva a sua sobrevivências e o bom desenvolvimento do seu ciclo de vida. (Lempereur et al., 2010), esses animais são encontrados em vários hospedeiros tais como: búfalos, jumentos, ovinos, caprinos, cães, gatos, coelhos e até mesmo no ser humano, porém o seu principal hospedeiro para o

desenvolvimento do seu ciclo de vida é o bovino (Andreotti et al., 2002). A provável chegada deste carrapato no território brasileiro foi em meados do século XVIII. Estudos indicam que as entradas desses animais se deram através do sul do país, no estado do Rio Grande do Sul (Gonzales et al., 1975).

As fêmeas deste carrapato são conhecidas como teleóginas, são hematófagas e cada uma delas tem a capacidade realizar a postura de 5.000 a 8.000 ovos dia (Jonsson, 2006). É transmissor de patógenos e dentre esses a *Babesia* sp., e o *Anaplasma marginale* (Cordoves, 1997; Patarroyo et al., 2002, Jonsson et al., 2008). Este carrapato possui uma dependência muito grande da ingestão de sangue dos bovinos. A saliva que este ácaro produz possui algumas substâncias que executam alguns mecanismos com efeitos anticoagulantes, anti-inflamatórios e imunossupressores. Isso faz com que haja uma interferência na cascata de coagulação e ocorre diretamente uma reação inflamatória no hospedeiro (Oliveira et al., 2011).

Os prejuízos financeiros gerados ao país devido a presença do *R. microplus* na bovinocultura chegam a números bem relevantes. Em média, o valor anual pode chegar a 1 bilhão de dólares, sendo que deste valor 80% está associado a compra de medicações como método de controle químico para o combate deste parasita (Martinez et al., 2004; Veríssimo et al., 2001).

Realizar o controle de *R. microplus* por meio de bases químicas (organofosforados, carbamatos e piretroides) tem sido a primeira alternativa de produtores rurais. Contudo, devido a uso abusivo, sem nenhum critério técnico e na maioria das vezes não se respeitando a toxicidade das drogas, atualmente em todo o território já se reconhece o problema da resistência parasitária de *R. (Boophilus) microplus* (Leal et al., 2003; Premoli et al., 2015).

2.3 Resistência parasitária versus Controle químico

Em todas as regiões do mundo onde ocorre a incidência do carrapato *R. microplus*, e se utiliza o método de controle químico com drogas acaricidas, ocorrerá a resistência parasitária deste ixodídeo. Esta habilidade faz parte inata da população destes carrapatos (Catto et al., 2010). Executar um monitoramento em regiões de incidência deste carrapato é fundamental para a avaliação da situação como um todo e realizar propostas de ações que tenham

como objetivo diminuir este problema em áreas específicas (Catto et al., 2010; Furlong et.al 2007). Segundo Furlong et al. (2005), os carrapaticidas mais utilizados são aqueles ditos de contato (pele) e alguns sistêmicos (injetáveis), sendo descritos abaixo:

A) Organofosforados: Este grupo, é considerado o grupo mais antigo dos grupos de controle químicos aos carrapatos. É bastante utilizado para o controle de *R. (Boophilus) microplus* em bovinos. Apresentam um poder residual pequeno e risco de intoxicações; exemplo de produto comercial: Assuntol®.

B) Amidínicos: Aqui se encontra o grupo que sucedeu aos organofosforados e caracterizou-se por ter um maior poder residual, permitindo um intervalo maior de tratamento. Este grupo foi bem aceito pelos produtores rurais e se trata de um medicamento dos mais utilizados no mercado. Foi comercializado por 40 anos. Exemplo de produto comercial: Triatox®.

C) Piretróides sintéticos: Em busca de eficácia, baixa toxicidade aos seres vivos e ao meio ambiente, a indústria desenvolveu esse grupo de carrapaticida, originado principalmente da Deltametrina, Cipermetrina e Alfametrina. Porém, com um poder residual maior, ocorreu um favorecimento a sobrevivência de indivíduos naturalmente tolerantes, desenvolvendo assim uma resistência parasitária nas populações de carrapatos. Estes têm sido utilizados com associação aos organofosforados para que se aumente o seu potencial de ação, uma vez que este sinergiza a ação dos piretróides. Exemplo de produto comercial: Butox®.

D) Fenilpirazóis: Este produto atua de maneira bem semelhante as avermectinas, paralisando os carrapatos. Exemplo de produto comercial: Topline®.

Os carrapaticidas denominados sistêmicos (injetáveis) mais utilizados:

A) Lactonas Macrocíclicas: Estes produtos apresentam um grande poder residual, com característica ecto/endoparasiticida.

B) Benzofenilureas (inibidores do crescimento): A ação desse carrapaticida não permite que os carrapatos realizem a sua ecdise (muda). Exemplo de produto comercial: Acatak®.

2.4 Controle Biológico versus parasitos de animais domésticos

O controle biológico é a utilização de organismos vivos naturais do ambiente no combate a parasitos alvos (Grønvold et al.1993). No quesito controle de helmintos em geral, destacam-se os fungos nematófagos dos gêneros *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthrobotrys* (Luns et al., 2018). Por outro lado, no quesito controle de artrópodes, existem inúmeros registros de sucesso do controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos dos gêneros *Bauvearia* e *Metharizium* no combate a carrapatos ixodídeos (Barci et, al. 2009). Todavia, como mencionado anteriormente, poucos trabalhos têm sido realizados com fungos nematófagos frente ao controle químico (Braga et al., 2013; Premoli et al., 2015).

2.5 Fungos Nematófalos

Os fungos nematófalos são organismos inofensivos ao ambiente e a saúde única e que fazem parte do solo do Brasil. Estes se dividem em quatro grupos; (a) os predadores, com destaque para os gêneros *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthrobotrys*. (b) os fungos ovicidas, que destroem ovos de nematoides por meio da ação direta e mecânica das suas hifas, destacando-se o gênero *Pochonia* e (c) fungos produtores de metabólitos tóxicos, que destroem alguns parasitas por meio da sua atividade toxica e (d) os endoparasitos que destroem as larvas por meio da penetração ativa (Braga & Araújo, 2014).

Os fungos predadores, produzem armadilhas que irão capturar e eliminar as formas de vida livre assim levando a redução das recidivas (Rodrigues et al., 2018; Silva et al., 2017). Os tipos de armadilhas mais comumente encontradas nestes fungos são aqueles compostos de redes adesivas (Yang et al., 2007; Araújo et al., 2014).

A espécies de fungos nematófalos mais utilizadas no controle biológico de parasitos são o *Duddingtonia flagrans*, o *Monacrosporium thaumasium* e o

M. sinense. Estas espécies são caracterizadas pela produção de conídios no final dos conidióforos e por produzirem grandes quantidades de clamidósporos na matéria seca (Silva et al., 2017). Além disso, recentemente foi descoberta a produção de nanotecnologia que futuramente poderá ser uma ferramenta muito importante no controle biológico (Silva et al., 2017).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- ✓ Utilizar fungos nematófagos no controle biológico das parasitoses que acometem bovinos em propriedade rural do Espírito Santo.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a utilização da espécie de fungo nematófago *Dudingtonia flagrans* (AC001) no controle *in vitro* de teleóginas de *R. (Boophilus microplus) microplus*
- ✓ Avaliar a utilização das espécies do fungo *Monacrosporium* no controle *in vitro* de de teleóginas *R. (Boophilus microplus) microplus*.
- ✓ Avaliar a atividade dos fungos *D. flagrans* (AC001), *M. thaumasium* (NF34) e *M. sinense* (SF53) sobre os ovos de *R. microplus* após 21 de contato.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento e exemplares de carrapatos

O ensaio experimental foi realizado no de Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico e no Laboratório Clínico e de Parasitologia Veterinária “BIOCONTROL” da Universidade Vila Velha (UVV).

Fêmeas ingurgitadas (teleóginas) de carrapatos *R. (Boophilus) microplus* foram coletados manualmente de bovinos naturalmente infectados, provenientes de propriedade rural no município de Santa Leopoldinda, estado do Espírito Santo. As fêmeas coletadas foram observadas sob microscópio óptico (5x) para confirmação da sua integridade biológica e morfológica; e desinfetadas, com uma passagem em solução de hipoclorito de sódio a 4% por três minutos, em álcool a 70% por três minutos e depois imersas em água destilada autoclavada por três minutos e o excesso de água foi retirado com papel filtro autoclavado (Braga et al., 2013).

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Vila Velha, sob o número 306.

Fungos nematófagos

Foram utilizados três isolados de fungos *Duddingtonia flagrans* (AC001); *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Monacrosporium sinense* (SF53) estes fungos são provenientes da coleção de micologia do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, isolados e mantidos em câmara de incubação do tipo (B.O.D) a 25 ± 1 ° C e $80 \pm 10\%$ de umidade relativa.

Ensaio experimentais

No presente trabalho, foram realizados dois ensaios (A e B). No ensaio A, testou-se o controle de teleóginas (lesão na cutícula/exoesqueleto) de *R. Boophilus microplus* após a interação com estruturas fúngicas (conídios e ou clamidósporos) dos isolados AC001, NF34 e SF53, *in vitro*. No ensaio B, testou-se o controle da eclodibilidade dos ovos após a interação com conídios

e ou clamidósporos de AC001, NF34 e SF53, *in vitro*. Os isolados fúngicos foram crescidos em meio de cultura ágra quitina 2% por 10 dias.

No ensaio A, foram formados 4 (quatro) grupos experimentais em placas Petri de 12 cm, com cerca de 30 fêmeas por placa. Foram realizadas seis repetições por grupo. Grupo 1, tratado com 20 μ L (10^6) de solução fúngica conídios/clamidósporos de *D. flagrans* (AC001) + 30 teleóginas; grupo 2, tratado com 20 μ L de solução fúngica conídios/clamidósporos de *M. thaumasium* (NF34) + 30 teleóginas; grupo 3, tratado com 20 μ L de solução fúngica conídios/clamidósporos de *M. sinense* + 30 teleóginas (SF53) e grupo 4, controle, recebeu apenas as 30 teleóginas de *R. (Boophilus) microplus*. A seguir, todas as placas de petri dos grupos tratados e controle foram acondicionadas em câmara de incubação $\pm 27^\circ$ C e $80 \pm 80\%$ de umidade relativa por um período de 21 dias.

Ao longo do período experimental, foi verificada diariamente o crescimento de massa fúngica sobre as teleóginas. A seguir, coletaram-se amostras dessas massas crescidas que foram transferidas para tubos de ensaio contendo água destilada, para se proceder a investigação de conídios/clamidósporos correspondentes aos isolados fúngicos utilizados (Braga & Araújo, 2014; Cooke et al., 1964).

Os carrapatos mortos no ensaio A foram transferidos para placas de Petri contendo meios de cultura sólidos ágar-água 2% e batata dextrose ágar 2% para crescimento micelial e posterior reisolamento. As placas de Petri foram incubadas a 26 $^\circ$ C, no escuro, durante dez dias. A seguir, foi realizada a análise dos aspectos morfológicos, avaliando-se o crescimento radial, a presença de microestruturas características (conídios e/ou clamidósporos) e a eclodibilidade dos ovos.

No ensaio B, testou-se a eclodibilidade dos ovos após a interação na concentração de 10^6 de conídios/clamidósporos/ml de AC001, NF34 e SF53 *in vitro*. Foram coletadas manualmente fêmeas de *R. (Boophilus) microplus*. Após as coletas, as fêmeas foram lavadas em água corrente, secas, identificadas e acondicionadas em câmara climatizada regulada a temperatura de $\pm 27^\circ$ C e umidade relativa a 80% para a postura dos ovos (Monteiro et al., 1998). Após a postura, os ovos foram transferidos para tubos de ensaio na proporção de 100mg (100 ovos).

Grupo 1, foi tratado com solução fúngica 10^6 conídios/clamidósporos de *D. flagrans* (AC001) + 100 ovos; grupo 2, tratado com solução fúngica 10^6 conídios/clamidósporos de *M. thaumasium* (NF34) + 100 ovos; grupo 3, tratado com solução fúngica 10^6 conídios/clamidósporos de *M. sinense* (SF53) + 100 ovos e grupo 4, controle que recebeu apenas 100 ovos de *R. Boophilus microplus*. Foram realizadas 3 repetições para grupo experimental. A seguir, todos tubos de ensaio dos grupos tratados e controle foram acondicionados em câmara de incubação ± 28 ° C e 80% de umidade relativa por um período de 21 dias (Braga et al., 2013).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo teve caráter experimental em condições laboratoriais e ao final do ensaio A provou-se que houve interação, crescimento, colonização e destruição (lesão na cutícula/exoesqueleto) dos exemplares fêmeas de carrapatos do gênero *R. Boophilus microplus* pelos fungos AC001, NF34 e SF53.

A literatura tem mencionado que alguns fungos do grupo entomopatogênico têm sido empregados em experiências laboratoriais e a campo no controle de artrópodes (Machado et al., 2009). Contudo, existe uma escassez de relatos a respeito da possível atividade entomopatogênica de fungos nematófagos, e este relato pode vir a ser uma importante contribuição para o controle efetivo destes artrópodes.

Na Figura 1ABCD, pode ser observada a colonização e posterior local de lesão sobre o exoesqueleto dos carrapatos *R. Boophilus microplus* após a interação com o isolado AC001 ao longo do experimento.

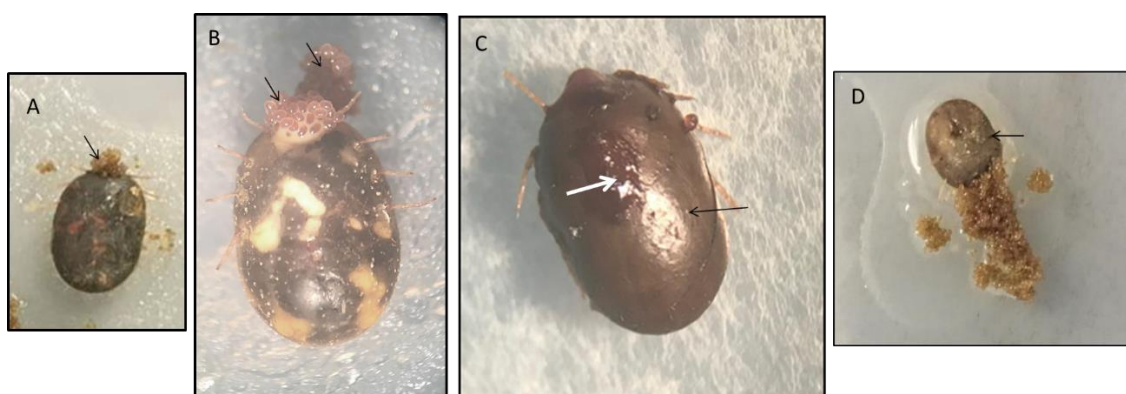


Figura 1ABCD- Carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* (seta preta) e local de lesão causada pelo fungo *Duddingtonia flagrans* (seta branca) ao longo dos dias do experimento e D; grupo controle.

Na Figura 2EFGH, abaixo, é evidenciada a interação e posterior colonização do *R. Boophilus microplus* pelo isolado NF34.

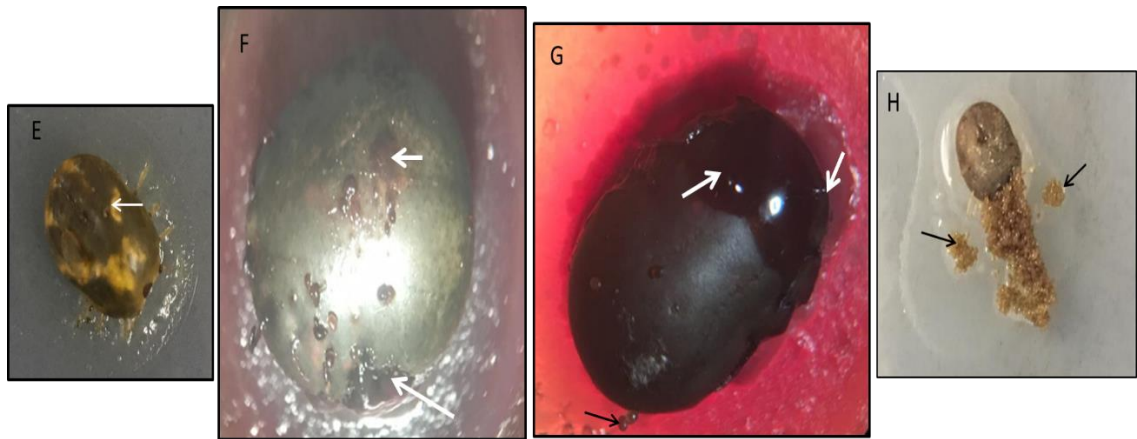


Figura 2EFGH - Carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* (seta preta) e local de lesão causada pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* (seta branca) ao longo dos dias do experimento e H; grupo controle.

Na Figura 3IJKL abaixo, é evidenciada a interação e posterior colonização do *R. Boophilus microplus* pelo isolado SF53.

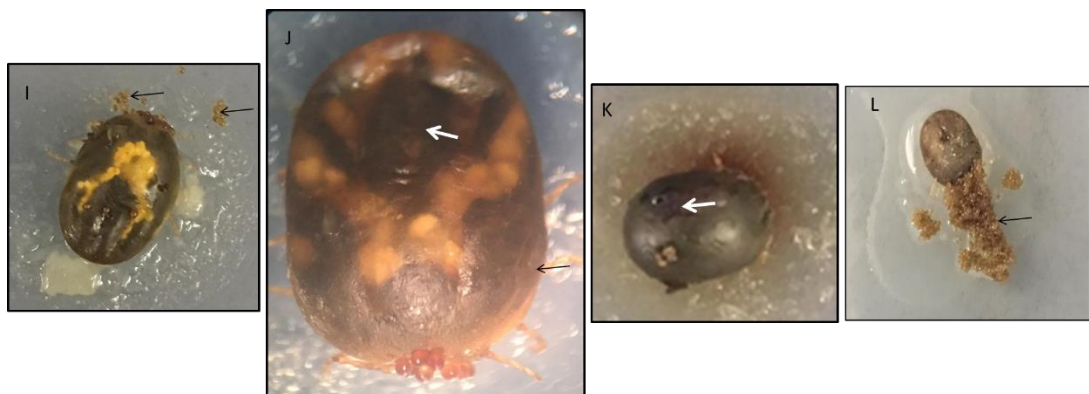


Figura 3IJKL - Carrapato *R. Boophilus microplus* (seta preta) e local de lesão causada pelo fungo *Monacrosporium sinense* (seta branca) ao longo dos dias do experimento e L; grupo controle.

No ensaio A, por meio da visualização de interação, colonização e posterior local de lesão no exoesqueleto dos carrapatos, o autor chama atenção a respeito das diferentes atividades entomopatogênicas demonstradas pelos isolados AC001, NF34 e SF53, ao longo dos dias e que sugerem possivelmente uma atividade enzimática que deve ser mais estudada. Exoesqueletos de carrapatos são compostos na sua maioria por quitina e outros caboidratos (Furlogn et al., 2007). Corroborando com os resultados de

Braga et al. (2013) que registraram a interação do fungo nematófago predador *Duddingtonia flagrans* sobre carrapatos *Amblyomma cajenense*, e posteriormente obtiveram o isolamento de uma enzima, quitinase, durante a interação. Assim, aqueles autores registraram a produção e a caracterização de uma quitinase em condições laboratoriais e ainda sugeriram que a produção da mesma esteja relacionada ao meio de cultura de crescimento do fungo. Dessa forma, no presente trabalho, o crescimento dos fungos a partir de meio rico em quitina (AQ) sem dúvidas colaborou com esse fato, no entanto, não foi caracterizada uma quitinase nesse trabalho.

Como mencionando acima, foi utilizado o meio de cultura AQ2% como fonte de quitina para o crescimento do isolado: AC001, NF34 e SF53 e, posteriormente sua possível ação enzimática. Outros trabalhos do com outros trabalhos, que sugerem a produção de determinadas enzimas pelos fungos nematófagos mediante ao tipo de substrato onde estão sendo cultivados (Soares et al., 2013, 2015).

Segundo Braga et al. (2015), devido os ovos de nematoides e o exoesqueleto dos artrópodes serem ricos em quitina em geral, fungos nematófagos são capazes de infectá-los devido a produção de enzimas extracelulares, como por exemplo as quitinases. Assim, uma vez que os artrópodes apresentam o exoesqueleto constituído por esse carboidrato, houve ação fúngica sobre os exemplares de *R. (Boophilus) microplus*. No presente trabalho, a possível quitinase produzida pelos fungos nematófagos *D. flagrans*, *M. thaumasium* e *M. sinesi* foi essencial para a colonização fúngica nos carrapatos, enfatizando uma rápida e possível ação entomopatogênica.

Apesar dos métodos químicos serem frequentemente os mais utilizados no controle de ectoparasitas (Boaretto & Forti, 1997; Furlong et al., 2007), esses métodos tornam-se cada vez mais inviáveis por causarem sérios danos a saúde animal, humana e ambiental, aumentando o risco de intoxicação animal, humano e gerando um alto custo econômico para a população (Diel et al., 2003; Medeiros et al., 2009). Diante disso, a interação dos fungos nematófagos *D. flagrans*, *M. thaumasium* e *M. sinensi* com carrapatos pode vir a ser no futuro uma nova alternativa de controle, devido ausência de toxicidade tanto para o meio ambiente, animais e seres humanos.

Nesse aspecto, Braga e Araújo (2014) mencionam que os fungos nematófagos, também conhecidos como “comedores de nematóides”, podem no futuro ser empregados como controladores biológicos destes artrópodes. Contudo, existe uma carência de trabalhos no Estado do Espírito Santo que possam direcionar o controle integrado, nesse caso o químico e biológico no combate as parasitoses de bovinos. No entanto, necessita-se cada vez mais de se elucidar a real possibilidade do emprego do controle biológico na rotina do produtor rural.

No ensaio A, comprovou-se que a interação com os isolados de fungos nematófagos também foi responsável pela morte e “murchamento” dos mesmos. Foi possível também observar crescimento micelial e a presença de microestruturas características (conídios e/ou clamidósporos).

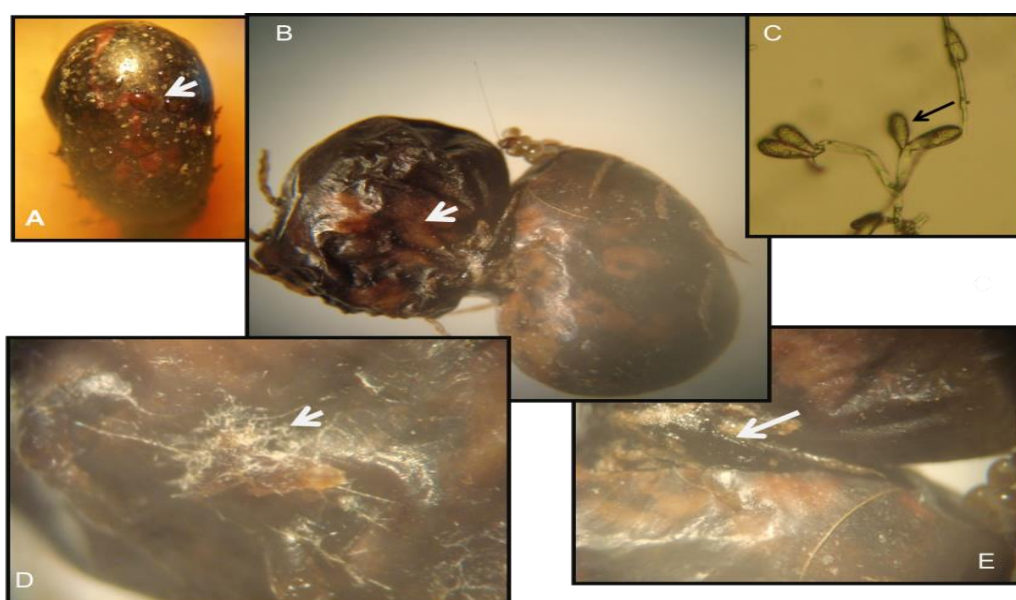


FIGURA 4 ABCDE - Carrapatos mortos no ensaio com o fungo *Duddingtonia flagrans* (seta branca) e microestruturas características (conídios e/ou clamidósporos) (seta preta).

Os fungos *D. flagrans* (AC001), *M. thaumasium* (NF34) e *M. sinesi* (SF53) foram eficientes ao “colonizarem” e “destruírem” os carrapatos coletados em caráter experimental, mas mesmo em ensaios laboratoriais, as premissas da sua utilização poderam abrir novas vertentes para redução do uso de compostos químicos no futuro, diminuindo problemas de saúde e ambientais. No entanto, é importante frisar a necessidade de novas pesquisas

no sudeste do Brasil, uma vez que esta área ainda não foi bem explorada e diversidades entre as espécies de fungos e carrapatos podem existir.

No ensaio B, foi notada a interação dos isolados utilizados sobre os ovos de *R. (Boophulis) microplus* até o intervalo de 21 dias. Na figura 5MN, é demonstrada essa interação e bem como o rompimento dos ovos.

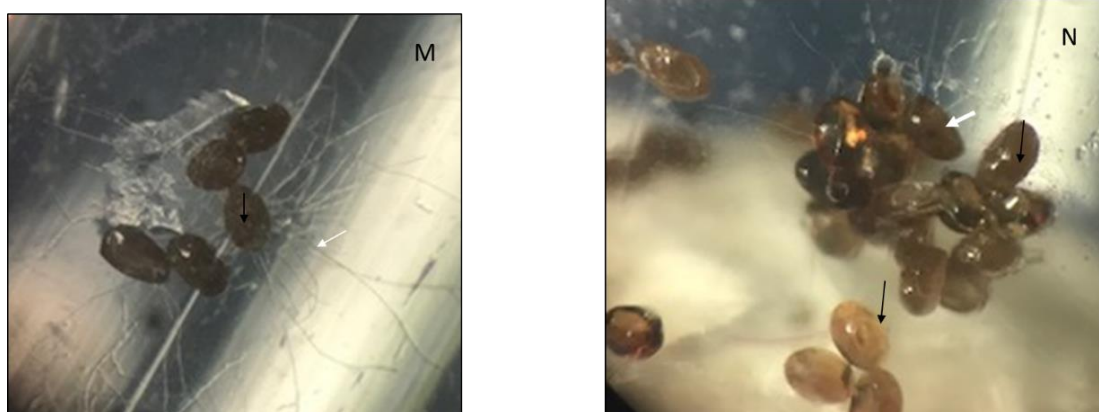


FIGURA 5MN - Ovos do carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* (seta preta) e hifas de fungo nematófago (seta branca) e posterior rompimento dos ovos (seta branca).

No ensaio B, os fungos *D. flagrans* (AC001), *M. thaumasium* (NF34) e *M. sinesi* (SF53) foram eficientes ao “colonizarem” e “destruírem” os ovos coletados e foram eficientes em impedir a sua eclosão, o que poderá ser visto como uma ferramenta de pesquisa em outros trabalhos, uma vez que devido o possível enriquecimento do meio com AQ2% houve essa interação. De acordo com os registros de Braga et al. (2013), os ovos de artrópodes, por possuírem camada de quitina, podem ser parasitados por fungos e dentre esses aqueles com capacidade ovicida. Fungos nematófagos predadores possuem uma natureza predatória voltada para larvas de parasitos, contudo, mas existem trabalhos que comprovam a sua capacidade ovicida (Braga & Araújo, 2014). No presente trabalho, os isolados AC001, NF34 e SF53 provaram ser eficientes fungos com atividade entomotatogênica e/ou ovicida. Contudo, deve ser ressaltado a utilização de meio de cultura AQ2% como “propulsor” dessa atividade quitinolítica.

7. CONCLUSÃO

- No presente trabalho pode ser observada a colonização e posterior destruição do exoesqueleto do carrapato *R. (Boophilus) microplus* após a interação com os isolados AC001, NF34e SF53 ao longo do experimento, o que poderá vir a ser uma ferramenta de controle biológico integrado para a rotina de fazendas no estado do Espírito Santo.
- Neste trabalho, os fungos nematófagos foram capazes de interagir, colonizar e destruir os ovos de *R. (Boophilus) microplus*, diminuindo a sua eclodibilidade e no futuro vir a ser ferramenta em aplicações biotecnológicas.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Andreotti, R. (2002). Caracterizacao de inibidores de serinoproteases (BmTIs) presentes em larvas de carrapatos *Boophilus microplus* e o efeito no controle da infestacao parasitaria em bovinos. Tese. São Paulo: UNIFESP, p. 108.

Aguiar AR, Ferraz CM, Hiura E, Gomes LC, Souza LM, Ribeiro VO, Araujo JV. (2017). Cynodon, Brachiaria mutica and Brachiaria decubens pastures. Journal of Animal & Plant Sciences, 31:3, 5074-5078.

Boaretto MAC, Forti LC (1997). Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série técnica IPEF, 11(30), 31-46.

Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Tavela ADO, Carvalho LM (2013). Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterisation of its chitinase. Biocontrol Science and Technology, 23(5), 584-594.

Braga FR, Soares FEF, Giuberti TZ, Lopes ADCG, Lacerda T, Hollanda AT (2015). Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. Veterinary Parasitology, 212(3), 214-218.

Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Tavela AO, Carvalho LM, Mello INK, De Paula AT, Lelis R, Queiroz JH (2013). Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterisation of its chitinase. Biocontrol Science and Technology, 23,584-594.

Braga, FR, Araújo JV (2014). Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. Applied microbiology and biotechnology, 98:1, 71-82.

Catto JB, Andreotti R, Koller WW (2010). Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi. Embrapa Gado de Corte Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

Diel C, Facchini LA, Dall'Agnol MM (2003). Inseticidas domésticos: padrão de uso segundo a renda per capita. *Revista de Saúde Pública*, 37(1), 83-90.

Dantas CCO, Silva LCRP, Negrão FM (2010). Manejo sanitário de doenças do gado leiteiro. *PUBVET*, Londrina, 4, 32:928

Gonzales JC (1975). O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre-RS, Sulina, p. 104

Grønvold J, Wolstrup J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Bresciani J (1993). Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. *Veterinary Parasitology*, 48(1-4), 311-325.

Furlong J, Martins J.R, Prata, MCA (2004). Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Veterinária*, 23, 37, 53-56.

Furlong, J, Martins J.R, Prata, M.C.Azevedo (2007). O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?. *A Hora Veterinária*, 27, 26-32.

Grisi L, Leite RC, Martins JRDS, Barros ATMD, Andreotti R, Cançado PHD, Villela HS (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 150-156.

Horak IG, Camicas JL, Keirans JE (2003). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. In *Ticks and Tick-Borne Pathogens* (pp. 27-54). Springer, Dordrecht.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. PPM - Produção da Pecuária Municipal, 2017. [online] Disponível na internet via URL:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2017/default_xls_brasil.shtm. Arquivo consultado em 24 de Abril de 2019.

Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary parasitology*, 155(1-2), 1-9.

Jonsson NN (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2), 1-10.

Keirans JE, Robbins RG (1999). A world checklist of genera, subgenera, and species of ticks (Acari: Ixodida) published from 1973-1997.

Klompen H (2005). Ticks, the ixodida. *Biology of Disease Vectors*, 45-55.

Leal AT, Freitas DRJD, Junior V, da Silva I. (2003). Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta scientiae veterinariae*. 31,1-11.

Lempereur L, Geysen D, Madder M (2010). Development and validation of a PCR–RFLP test to identify African *Rhipicephalus* (*Boophilus*) ticks. *Acta tropica*, 114(1), 55-58.

Luns FD, Assis RCL, Silva LPC, Ferraz CM, Braga FR, Araújo JVD (2018). Coadministration of nematophagous fungi for biological control over nematodes in bovine in the South-Eastern Brazil. *BioMed research international*, 2018.

Martinez ML, Silva MVGB, Machado MA, Teodora RL (2004). A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: Simpósio da Sociedade Brasileira Melhoramento Animal Anais (Pirassununga), p.1-3.

Machado ACR, Monteiro AC, Mochi DA, Yoshida L. (2009). Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. *Bragantia*. 68(3): 703-714.

Medeiros RJ, Monteiro FDO, da Silva GC, Júnior NA (2009). Casos de intoxicações exógenas em cães e gatos atendidos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense durante o período de 2002 a 2008. *Ciência Rural*. 39(7), 2105-2110.

Oliveira CJF, Sá-Nunes A, Francischetti IM, Carregaro V, Anatriello E, Silva JS, Ferreira BR (2011). Deconstructing tick saliva non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 10960-10969.

Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, Mendes MD (2002). Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary immunology and immunopathology*, 88(3-4), 163-172.

Premoli TA, Hiura E, Lopes ADCL, Colares M, Anderson AR, Lenz D, Leite GLF, Araujo JV, Braga FR (2015). In Vitro activity of the Nematophagous Fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 4(12): 727-734.

Rodrigues JVF, Braga FR, Campos AK, Carvalho LM, Araujo JM, Aguiar AR, Freitas SG (2018). *Duddingtonia flagrans* formulated in rice bran in the control of *Oesophagostomum* spp. intestinal parasite of swine. *Experimental parasitology*, 184, 11-15.

Santos FC, Vogel FS (2012). Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente ao amitraz e cipermetrina em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul de 2005 a 2011. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, 111, 121-124.

Silva MED, Uriostegui MAM, Millán-Orozco J, Gives PMD, Hernández EL, Braga FR, Araújo JVD (2017). Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(1), 92-95.

Silva LPC, Oliveira JP, Keijok WJ, Silva AR, Aguiar AR, Guimarães MCC, Braga FR (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *International journal of nanomedicine*, 12, 6373.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2010). *Parasitologia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 198.

Urquhart GM, Armour J, Ducan JL, Dunn AM, Jennings FW (1998) *Parasitologia Veterinária*, 2ª. Edição, ed. Guanabara, 1998.

Vilela VLR, Feitosa TF, Braga FR, Vieira VD, Lucena SCD, Araújo JVD (2018). Control of sheep gastrointestinal nematodes using the combination of *Duddingtonia flagrans* and Levamisole Hydrochloride 5%. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27(1), 27-32.

Yang J, Tian B, Liang L, Zhang KQ. (2007). Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(1), 21-31.