

AVALIAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* IP46 EM OVOS DE *Rhipicephalus sanguineus*

Walmirton Bezerra D'ALESSANDRO^{1,2*}; Christian LUZ^{1,3}; Géssica Bueno BÁRBARA^{1,4};

¹Laboratório de Patologia de Invertebrados, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG). ²Doutorando em Parasitologia do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Bolsista CNPq, *e-mail: walmirton@hotmail.com. ³Orientador: Professor Associado do Setor de Parasitologia IPTSP, UFG, 74.605-050, Goiânia, GO, Brasil.

⁴Aluna de graduação do curso de Medicina Veterinária da UFG.

Palavras-chave: carrapato, controle biológico, fungo

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus sanguineus é um carrapato cosmopolita trioxênico, que parasita principalmente cães, mas ocasionalmente ataca também os humanos. Esta espécie transmite vários patógenos importantes para seus hospedeiros, como *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (Parola et al., 2005). *R. sanguineus* como outras pragas importantes é controlado principalmente com acaricidas sintéticos. Ao todo, o uso excessivo de produtos causa sérios problemas como poluição do meio ambiente e seleção de populações de carrapatos resistentes a produtos químicos. A necessidade de controle alternativa de carrapatos estimulou o interesse em produtos com base em fungos que atacam estes no meio ambiente ou em seus hospedeiros. Resultados confirma o potencial de fungos para um controle integrado de carrapatos (Samish & Rehacek 1999, Chandler et al. 2000, Samish et al. 2004, Fernandes & Bittencourt 2008). No entanto, o conhecimento sobre a eficácia de fungos contra *R. sanguineus* especialmente em ovos ainda é escassa e uma melhor compreensão da efetividade ovicida contribuirá decisivamente para o desenvolvimento de formulações poderosas e aplicações voltadas para as espécies-alvo com micoacaricidas.

Formulações de óleo à base de fungos apoia à adesão à cutícula do carrapato e proteger o fungo contra condições desfavoráveis de temperatura, radiação ultravioleta e baixa umidade (Polar et al. 2005)

O objetivo deste estudo foi avaliar em laboratório o efeito de formulação oleosa e aquosa e de aplicações em ovos de *R. sanguineus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e obtenção de ovos: Foram coletadas no Centro de Zoonoses de Goiânia, Goiás, fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, presentes em cães naturalmente infestados. No laboratório, as fêmeas foram lavadas com água estéril e secas em papel. Depois foram acondicionadas em placas de Petri (100 x 15 mm) sobre papel e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $75 \pm 10\%$ para oviposição. Nos testes foram utilizados ovos com idade de 1 a 3 dias.

Origem, cultivo e preparação de *M. anisopliae*: IP 46 foi isolado em solo do cerrado brasileiro e está armazenado na Coleção de Fungos do IPTSP/UFG. Antes dos testes foi passado em fêmeas de *R. sanguineus*, reisolado e cultivado em placa de Petri com meio de cultura BDA (batata, dextrose, agar) durante 15 dias a 25°C , UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h. Para preparação de conídios, estes foram raspados na superfície da cultura e suspensos em 0,1% de Tween 80[®]. A suspensão foi filtrada por algodão hidrófilo, os conídios quantificados com câmara de Neubauer e as concentrações de conídios ajustadas para os testes.

Aplicação do formulado aquoso e óleo-água: 50 μL dos formulados foram aplicados com auxílio de uma micropipeta semi-automática. Foram testados dois tipos de aplicação: aplicando diretamente o formulado sobre os ovos (1) e tratando indiretamente papel filtro e expondo o conjunto de ovos sobre papel tratado (2). No grupo controle foram utilizados somente água para o formulado aquoso e óleo-água para o formulado oleoso. Após o tratamento os papéis filtro com os ovos foram transferidos, cuidadosamente, para tubos de cultura de células (TPP, Suíça), permeáveis para ar, com áreas totais de 63,6 cm^2 de superfície. Os tubos foram incubados em umidade de $>98\%$ a 25°C , até 40 dias. O desenvolvimento de micélio e conídios na superfície dos ovos, a eclosão e a sobrevivência de larvas foram avaliados diariamente. Foram realizados quatro repetições independentes.

Análise de Dados: Dados da eclosão e sobrevivência de larvas foram transformada em arcsin analisados pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls (SNK) testes múltiplos de comparação de médias. As médias foram consideradas estatisticamente diferentes em $P < 0,05$. As concentrações inibitórias de eclosão para 50% e 90% (CIE₅₀ e CIE₉₀) e tempo letal 50% e 90% (TL₅₀= Tempo capaz de matar 50% de indivíduos e TL₉₀= Tempo capaz

de matar 90% de indivíduos) de larvas foram calculados pela análise de Probits dependentes (Throne et al., 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de IP 46 sobre os conjuntos de ovos, eclosão e sobrevivência de larvas dependeram do formulado, da aplicação e da concentração de conídios.

O surgimento de conídios de IP 46 nos ovos de *R. sanguineus* foi de 5 dias quando o formulado oleoso foi aplicado diretamente e de 8 dias em formulado aquoso. A aplicação indireta retardou o crescimento de IP 46 nos ovos sendo de 11 dias para formulado oleoso e 17 dias para formulado aquoso.

O percentual médio de larvas eclodidas e a sobrevivência delas para os dois formulados aplicado indiretamente foi significativamente inferior ao do grupo controle (Fig. 1).

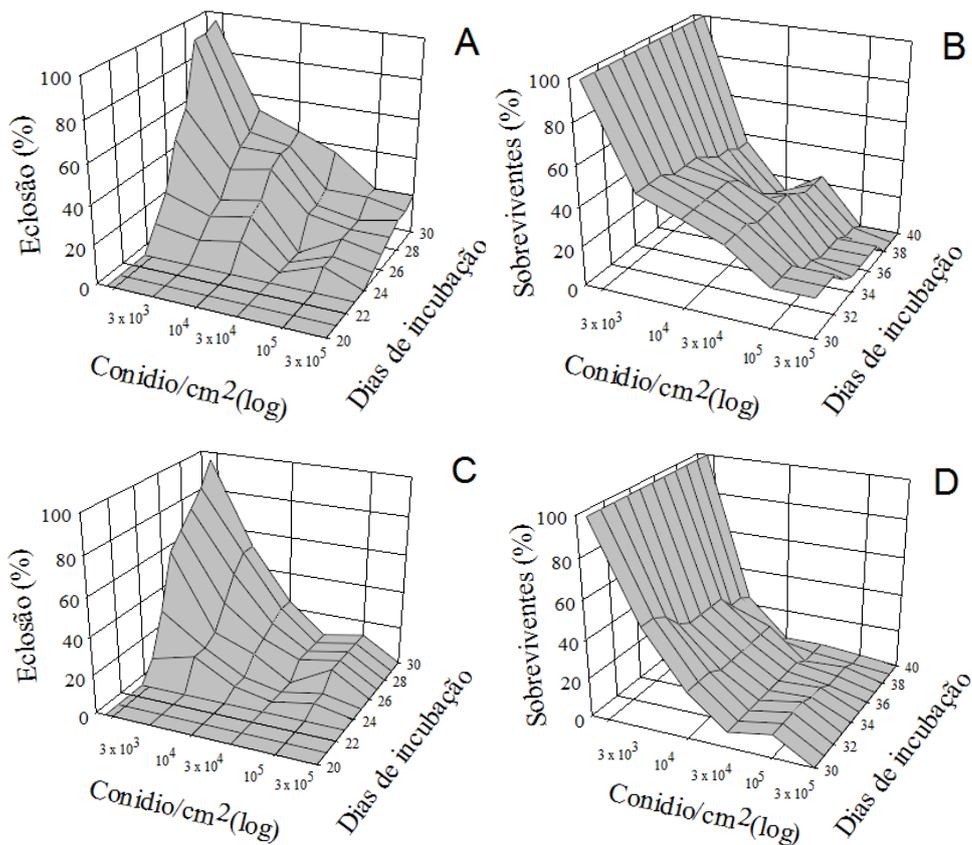


Figura 1- (A) Eclosão (%) acumulada e (B) sobrevivência (%) de larvas de *R. sanguineus* em formulado aquoso e (C) Eclosão (%) acumulada e (D) sobrevivência

(%) de larvas de *R. sanguineus* em formulado oleoso, após a aplicação indireta de conídios de *Metharizium anisopliae*.

Ao aplicar diretamente formulado aquoso e oleoso sob os ovos não houve eclosão. Larvas eclodidas só foram observadas em aplicações indiretas.

As concentrações analisadas sob a eclosão em formulado aquoso ($F_{5,18} = 2,9$; $p < 0,047$) e oleoso ($F_{5,18} = 6,7$; $p < 0,001$) diferiram estatisticamente entre si. Diferenças estatísticas também foram encontradas em larvas sobrevivências para formulado aquoso ($F_{5,18} = 6,5$; $p < 0,001$) e formulado oleoso ($F_{5,18} = 12,4$; $p < 0,001$).

As concentrações inibitórias de eclosão para 50% (CIE₅₀) e 90% (CIE₉₀) foram de $5,9 \times 10^3$ e $1,7 \times 10^6$ conídios/cm² para formulado aquoso e $3,1 \times 10^3$ e $3,8 \times 10^4$ conídios/cm² para formulado oleoso, respectivamente. Concentrações de $3,3 \times 10^5$ conídios/cm² tanto para formulado aquoso quanto para oleoso não foram possíveis de serem calculados devido à alta taxa de mortalidade.

As TL₅₀ e TL₉₀ para concentração de 10^4 conídios/cm² foram de 10,2 e 19,4 dias para formulado aquoso e 12,1 e 15,8 dias para formulado oleoso, respectivamente.

As formulações à base de óleo e água foram responsáveis por inibir a eclosão e sobrevivência de larvas quando aplicado diretamente. Devido o período de embriogênese de *R. sanguineus* ser acima de 20 dias em UR 98% à 25°C, o fungo conseguiu crescer em menos tempo, bloqueando a eclosão destas larvas.

IP 46 foi efetivo quando aplicado diretamente sob o conjunto de ovos, inibindo a eclosão. Este tipo de aplicação geralmente é realizada quando se quer aplicar sob um hospedeiro e tentar diminuir a distância entre este e o ectoparasita. Porém, numa área infestada como um canil este procedimento se inviabiliza, pois cerca de 95% da população de carrapatos fica no meio ambiente.

Aplicações indireta de fungo poderia ser uma saída mais consciente para resolução do problema. Se aplicado em uma área infestada, o fungo entraria em contato com a maioria de carrapatos circulantes e teria maior efetividade a atingir.

Óleo é um aditivo que pode ser adicionado nas formulações para proteger o fungo. Alta taxa de mortalidade foi observada no presente trabalho, inferindo que o fungo favorece o crescimento acelerado sob os ovos e concorre contra a eclosão de larvas de *R. sanguineus*. Apesar da sobrevivência de larvas ter atingido um tempo prolongado ao aplicar indiretamente formulado oleoso esta sobrevivência foi zero em $3,3 \times 10^5$ conídios/cm².

CONCLUSÕES

Formulações e aplicações de IP 46 inibiram a eclosão e sobrevivência de larvas de *R. sanguineus*. Formulado a base de óleo tem mais atividade ovicida e larvicida do que formulado aquoso.

FONTE DE FINANCIAMENTO

CNPq.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chandler D, Davidson G, Pell JK, Ball BV, Shaw K, Sunderland KD 2000. Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Sci Technol* 10: 357 - 384.
- Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp Appl Acarol* 46: 71 - 93.
- Parola P, Paddock CD, Raoult D, 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases, challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 18: 719 - 756.
- Polar P, Kairo MTK, Moore D, Pegram R, John S 2005. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathol* 160: 151 - 157.
- Samish M, Rehacek J 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Ann Rev Entomol* 44: 159 - 182.
- Samish M, Ginsberg H, Glazer I 2004. Biological control of ticks. *Parasitol* 129: 389 - 403.
- Throne JE, Weaver DK, Chew V, Baker J 1995. Probit analysis of correlated data: Multiple observations over time at one concentration. *J Econ Entomology* 88: 1510 - 1512.