

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (ICA) CAMPUS MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

Neyller Lima Figueiredo

**EFEITOS DE EXTRATOS DE FUNGOS E DE FOLHAS DA AROEIRA SOBRE LARVAS E
TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE)**

Montes Claros
2023

Neyller Lima Figueiredo

**EFEITOS DE EXTRATOS DE FUNGOS E DE FOLHAS DA AROEIRA SOBRE LARVAS E
TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane de Oliveira Vasconcelos

Montes Claros

2023

Figueiredo, Neyller Lima.

F475e Efeitos de extratos de fungos e folhas da aroeira sobre larvas e teleóginas de
2023 *Rhipicaphalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari : Ixodidae) [manuscrito]/ Neyller
Lima Figueiredo. Montes Claros, 2023.
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Animal. Universidade
Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Eduardo Robson Duarte
Banca examinadora: Ricardo Nascimento Araújo, Naylene Carvalho Sales da Silva,
Eduardo Robson Duarte.

Inclui referências: Inclui referências: f. 35-38; 55-57; 60-67

1. Carrapato de bovino -- Controle biológico -- Teses. 2. Carrapato -- Resistência a
parasitas -- Teses. 3. Fungos patogênicos -- Teses. 4. Aroeira do sertão -- Teses.
I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de
Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 576.89:636.2

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFMG
Nádia Cristina Oliveira Pires / CRB-6/2781



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias
Colegiado de Pós-Graduação em Produção Animal

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 06 dias do mês de março de 2023 às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Eduardo Robson Duarte, D. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Ricardo Nascimento Araujo, D. Sc. (UFMG) e da Pós-doutoranda Naylene Carvalho Sales da Silva, D. Sc. (UFMG), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação de Neyller Lima Figueiredo, aluno do Curso de Mestrado em Produção Animal. Após a apresentação e defesa da dissertação intitulada “ Efeitos de extratos de fungos e de folhas da aroeira sobre larvas e teleóginas de *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae)”, o mestrando foi considerado (aprovado). Após finalizar a análise da dissertação, eu Professor Eduardo Robson Duarte, Presidente da Banca, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 53 do regulamento e da resolução 05/2016 do Curso de Mestrado em Produção Animal.

Montes Claros, 06 de março de 2023.

Orientador, Eduardo Robson Duarte

Membro: Naylene Carvalho Sales da Silva

Membro: Ricardo Nascimento Araujo

Ao meu esposo, Túlio, meus pais, Sidney e Lenira, e meu irmão, Leoney.

A vocês dedico essa conquista, tudo que tenho e sou.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão por serem minha base e meu alicerce. Obrigado por todos os ensinamentos e amor.

Ao Túlio por ser muito mais que um companheiro, mas meu melhor amigo, quem me motiva a ser o melhor de mim. Tudo que faço é por nós. Obrigado por acreditar, sonhar comigo, esperar, me ajudar e não me deixar desistir. A você todo sou e todo é o meu amor.

À Amora, Kiara e Bob, que mesmo sem terem consciência disso, são meu alento e refúgio, minha alegria todos dias.

Ao Valdo e à Lavínia, que de colegas se tornaram amigos e não mediram esforços para me ajudar em tudo. Sem vocês eu definitivamente não teria conseguido. A vocês minha eterna e mais sincera gratidão. Espero um dia retribuir tudo que fizeram por mim.

Ao professor Eduardo, orientador e amigo. Tenho muita sorte por ter sido o senhor. Obrigado por todos os ensinamentos, palavras de correção e carinho.

À minha coorientadora, Vivi, grande instrutora e parceira. Muito obrigado por toda a disponibilidade, compreensão e amizade.

À Aline, que chegou no meio do processo, mas que bom que chegou! Obrigado por me ajudar a lidar com tudo tendo a consciência de que cada coisa tem seu lugar e que cuidar de mim é necessário para alcançar bons resultados.

Aos colegas, graduandos, pós-graduandos, técnicos e professores por todo o auxílio e aprendizado mútuo. Muito obrigado!

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista, minha gratidão.

A Deus, por ser essa força que me acompanha em todos os momentos e coloca pessoas tão incríveis no meu caminho. Só Ele poderia ser perfeito assim.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Métodos alternativos de controle do carrapato bovino têm sido fundamentais devido à alta ocorrência de cepas resistentes aos acaricidas convencionais. Fungos micelianos e plantas têm sido utilizados para o controle desse ectoparasito, contudo pouco se conhece sobre a eficácia dos fungos presentes no trato digestório bovino e da planta *Myracrodruon urundeuva* no controle do carrapato bovino. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a eficácia de extratos de quatro espécies de fungos provenientes do trato digestório de bovinos e de folhas de *M. urundeuva* sobre larvas e teleóginas de *Rhipicephalus microplus*. Inicialmente foi avaliada a sensibilidade de duas cepas de *R. microplus* provenientes do Norte de Minas Gerais aos principais acaricidas químicos utilizados nas propriedades: amitraz, cipermetrina, deltametrina, supona e associação de cipermetrina, clorpirifós e citronelal. Em um primeiro estudo foram avaliados os efeitos dos acaricidas químicos e de extratos dos fungos micelianos *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN20) e *Aspergillus terreus* (isolado VN15) sobre a cepa Xangrilá de *R. microplus* e de extratos dos fungos leveduriformes *Rhodotorula mucilaginosa* (isolados V10S e V16S) e *Pichia kudriavzevii* (isolados V61 e V62) sobre a cepa ICAMG de *R. microplus*. Os extratos dos fungos foram obtidos a partir de isolados do trato digestório de bovinos da raça Nelore. Foram realizados biocarrapaticidograma e teste de pacote de larvas (TPL). Para a cepa Xangrilá, os acaricidas a base de cipermetrina, deltametrina e a associação comercial apresentaram baixa eficácia, sugerindo resistência da cepa a esses acaricidas. Ambos os isolados fúngicos testados para esta cepa apresentaram baixa eficácia sobre o controle da atividade reprodutiva das teleóginas e sobre a mortalidade de larvas. Para a cepa ICAMG, foram testados amitraz, supona e a associação cipermetrina, clorpirifós e citronelal, e todos apresentaram baixa eficácia, indicando início de resistência da cepa a esses acaricidas. Todos os extratos das leveduras testados para esta cepa ocasionaram baixa eficácia sobre teleóginas e mortalidade de larvas. Contudo, o isolado V16S de *R. mucilaginosa* demonstrou 35% de eficiência na redução da atividade reprodutiva das teleóginas. Em outro estudo avaliou-se a eficácia de extratos de folhas da planta *M. urundeuva* sobre uma cepa ICAMG de *R. microplus*. Foram avaliados extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) de folhas da planta pelo biocarrapaticidograma e pelo TPL. O EE a 75 e 100 mg mL⁻¹ reduziu a capacidade de postura, o que não ocorreu para o EA. Não houve redução da eclodibilidade para ambos os extratos avaliados. O EE apresentou eficácia acaricida em teleóginas de 14,93 a 40,79%. EA e EE apresentaram 82,89 e 91,21% de efeito larvicida, respectivamente, e a CL90 foi estimada em 226,1 mg mL⁻¹ para o EA e 159,3 mg mL⁻¹ para o EE. Os extratos das folhas de *M. urundeuva* apresentaram elevada eficácia principalmente para o estágio larval, destacando-se como potencial acaricida para *R. microplus*. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar outras concentrações, apresentações, veículos e diluentes de extratos de *R. mucilaginosa* (isolado V16S) e de folhas de *M. urundeuva* e seus possíveis efeitos, assim como eficácia *in vivo* desses extratos no controle alternativo de *R. microplus*.

Palavras-chave: carrapato bovino; resistência parasitária; controle biológico; fungos do trato digestório; *Myracrodruon urundeuva*.

ABSTRACT

Alternative controlling methods for bovine ticks have been essential due to the high occurrence of strains resistant to conventional acaricides. Mycelial fungi and plants have been used to control this ectoparasite, but little is known about the effectiveness of bovine digestive tract fungi and the plant *Myracrodruon urundeuva* in controlling the bovine tick. In this study, the aim was to evaluate the effectiveness of fungal extracts of four fungi species from digestive tract of bovines and *M. urundeuva* leaves against larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. Initially, the susceptibility of two strains of *R. microplus* from the north of Minas Gerais to the main chemical acaricides used in the properties was evaluated: amitraz, cypermethrin, deltamethrin, supone and association of cypermethrin, chlorpyrifos and citronellal. In a first study, the effects of chemical acaricides and extracts of the mycelial fungi *Trichoderma longibrachiatum* (isolated VN20) and *Aspergillus terreus* (isolated VN15) on the Xangrilá strain of *R. microplus* and extracts of the yeasts *Rhodotorula mucilaginosa* (isolated V10S and V16S) and *Pichia kudriavzevii* (isolated V61 and V62) on the ICAMG strain of *R. microplus* were evaluated. The extracts were obtained from fungi isolated from the digestive tract of Nellore cattle. Adult immersion test (AIT) and larvae pack test (TPL) were performed. For the Xangrilá strain, the acaricides based on cypermethrin, deltamethrin and cypermethrin association, chlorpyrifos and citronellal showed low efficacy, suggesting strain's resistance to these acaricides. Both fungal isolates tested for this strain showed low efficacy in controlling the reproductive activity of engorged females and on larval mortality. For the ICAMG strain, amitraz, supone and cypermethrin association, chlorpyrifos and citronellal were tested, and all showed low efficacy, indicating the beginning of strain's resistance to these acaricides. All yeast extracts tested for this strain performed low efficacy on engorged females and larval mortality. However, the isolated V16S from *R. mucilaginosa* showed 35% efficiency in reducing the reproductive activity of engorged females. In another study, the efficacy of *M. urundeuva* leaf extracts on an ICAMG strain of *R. microplus* was evaluated. Aqueous extract (EA) and ethanolic extract (EE) of the leaves of the plant were evaluated by AIT and TPL. The EE at 75 and 100 mg mL⁻¹ reduced posture capacity, which did not occur for EA. There was no reduction in hatchability for both evaluated extracts. The EE showed acaricidal efficacy in engorged females from 14.93 to 40.79%. The EA and EE performed 82.89 and 91.21% larvicidal effect, respectively, and the LC90 was estimated at 226.1 mg mL⁻¹ for EA and 159.3 mg mL⁻¹ for EE. *M. urundeuva* leaf extracts high efficiency mainly for the larval stage, standing out as potential acaricide for *R. microplus*. Future studies should be carried out to evaluate other concentrations, presentations, vehicles and diluents *R. mucilaginosa* extracts (isolated V16S) and *M. urundeuva* leaves and their possible effects, as well as the in vivo efficacy of these extracts in the alternative control of *R. microplus*.

Keywords: bovine tick; acaricide resistance; biological control; digestive tract fungi; *Myracrodruon urundeuva*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Figura 1. Isolados fúngicos cultivados em ágar Sabouraud. a – *Trichoderma longibrachiatum*.
b – *Aspergillus terreus*. c – *Rhodotorula mucilaginosa*. d – *Pichia kudriavzevii*26

ARTIGO 2

Figura 1. Árvore de *Myracrodruon urundeuva*.....45

Figura 2. Mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* em função da concentração do extrato aquoso de folhas de *Myracrodruon urundeuva*.....50

Figura 3. Mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* em função da concentração do extrato etanólico de folhas de *Myracrodruon urundeuva*.....51

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Efeito dos filtrados de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (isolado VN20) e <i>Aspergillus terreus</i> (isolado VN15) sobre a atividade reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Cepa Xangrilá).....	30
Tabela 2. Efeito do sobrenadante do cultivo de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (isolados V10S e V16S) e <i>Pichia kudriavzevii</i> (isolados V61 e V62) sobre a atividade reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Cepa ICAMG).....	31
Tabela 3. Mortalidade de larvas (%) de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Cepa Xangrilá) tratadas com filtrados de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (isolado VN20) e <i>Aspergillus terreus</i> (isolado VN15).....	31
Tabela 4. Mortalidade de larvas (%) de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Cepa ICAMG) tratadas com sobrenadante do cultivo de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (isolados V10S e V16S) e <i>Pichia kudriavzevii</i> (isolados V61 e V62).....	32

ARTIGO 2

Tabela 1. Efeito do extrato aquoso de <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre a eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	48
Tabela 2. Efeito do extrato etanólico de <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre a eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	49
Tabela 3. Mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com extratos de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	50

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL₉₀ – Concentração Letal 90

CP – Capacidade de Postura

EA – Extrato Aquoso

EC – Eclodibilidade

EE – Extrato Etanólico

EP – Eficiência do Produto

ER – Eficiência Reprodutiva

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

ICA – Instituto de Ciência Agrárias

ICAMG – Cepa de *Rhipicephalus microplus*

IGBE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC – Intervalo de Confiança

MS – Matéria Seca

TPL – Teste do Pacote de Larvas

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

V10S – Isolado de *Rhodotorula mucilaginosa*

V16S – Isolado de *Rhodotorula mucilaginosa*

V61 – Isolado de *Pichia kudriavzevii*

V62 – Isolado de *Pichia kudriavzevii*

VN15 – Isolado de *Trichoderma longibrachiatum*

VN20 – Isolado de *Aspergillus terreus*

Xangrilá – Cepa de *Rhipicephalus microplus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	BOVINOCULTURA LEITEIRA	Erro! Indicador não definido.
3.2	O CARRAPATO BOVINO	15
3.3	CONTROLE DO CARRAPATO	16
3.3.1	Métodos químicos e resistência parasitária	16
3.3.2	Métodos alternativos	16
3.4	FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO BOVINO NO CONTROLE BIOLÓGICO	17
3.5	PLANTAS DO CERRADO NO CONTROLE BIOLÓGICO	18
4	ARTIGOS	19
4.1	ARTIGO 1	19
4.2	ARTIGO 2	39
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
6	REFERÊNCIAS	59
7	ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira tem grande importância econômica e social no Brasil e no mundo, contudo a produção satisfatória e lucratividade dos produtores depende cada vez mais da eficiência produtiva e econômica das propriedades. Fatores relacionados à saúde dos animais interferem nesses resultados, tendo em vista a perda de produtividade, gastos com medicamentos e perdas por descarte do leite (GRISI *et al.*, 2014).

O carrapato *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) corresponde a um dos parasitos de maior importância para a pecuária leiteira no mundo (ANDREOTTI *et al.*, 2019). Além dos efeitos diretos do parasitismo, pode inocular *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* ou *Babesia bovis*, agentes das tristezas parasitárias bovina e pode favorecer a ocorrência de miíases (FURLONG *et al.*, 2005).

Práticas indiscriminadas de controle do carrapato adotadas por muitos produtores têm favorecido a seleção de cepas multirresistentes aos principais acaricidas químicos disponíveis (FURLONG; MARTINS, 2000; DZEMO *et al.*, 2022). Além disso, a preocupação com segurança alimentar e impacto ambiental por parte dos consumidores têm fomentado a redução do uso de produtos químicos nas propriedades (GERAGE *et al.*, 2017).

Dessa forma, a busca por métodos alternativos de controle do carrapato bovino tem sido foco de muitas pesquisas (VARGAS *et al.*, 2020). O uso de fungos e plantas são exemplos de métodos estudados para o controle alternativo desse parasito (VERÍSSIMO, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2016; NOGUEIRA *et al.*, 2020).

Fungos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* têm sido instrumento de muitas pesquisas com resultados que evidenciam o seu potencial entomopatogênico (CAMARGO *et al.*, 2016; RIVERA *et al.*, 2018). A produção de metabólitos por esses e outros fungos é um dos aspectos que confere a eles seu potencial patogênico (SBARAINI *et al.*, 2016).

O grupo de estudos em parasitologia e microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais tem estudado fungos do trato digestório dos bovinos e os principais gêneros detectados foram *Thichoderma*, *Aspergillus*, *Pichia* e *Rhodotorula* (ABRÃO *et al.*, 2014). Entretanto, não é conhecido o efeito dos metabólitos desses fungos sobre *R. microplus*.

Adicionalmente, plantas do Cerrado apresentam um grande potencial de uso em testes biológicos pela presença de compostos em seu cerne, casca, folhas e frutos (VIEIRA *et al.*, 2018). Diversas dessas plantas possuem grande importância social e econômica nas regiões onde abragem por fornecer madeira, frutos, usos medicinais e cosméticos (VIEIRA *et al.*, 2018; MAMEDE; PASA, 2019).

Dentre as plantas características do Cerrado, *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Freire Allemão, 1862), família Anacardiaceae, popularmente conhecida como “aroeira” ou “aroeira-do-sertão”, tem sido foco de muitos estudos para conhecimento de seus componentes e utilizações. Pesquisas revelam a presença de taninos, flavonoides e lectinas em diferentes partes dessa planta que conferem a ela potencial de ação sobre alguns agentes patogênicos, como *Aedes aegypti* (SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2012). Oiano-Neto *et al.* (2017) testaram extrato de

folhas da *M. urundeuva* em teleóginas de *R. microplus* e verificaram resultados satisfatórios sobre o controle da postura, contudo os estudos são escassos envolvendo os efeitos de extratos dessa planta sobre esse parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia de extratos dos fungos provenientes do trato digestório de bovinos e de folhas da planta *Myracrodruon urundeuva* no controle *in vitro* de *Rhipicephalus microplus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia de carrapaticidas químicos em duas cepas (Xangrilá e ICAMG) de *R. microplus* do norte de Minas Gerais.
- Avaliar o efeito de extratos de *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus terreus* sobre teleóginas e larvas da cepa Xangrilá de *R. microplus*.
- Avaliar o efeito de extratos de dois isolados de *Rhodotorula mucilaginosa* e dois isolados de *Pichia kudriavzevii* sobre teleóginas e larvas da cepa ICAMG de *R. microplus*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso (EA) e extrato etanólico (EE) de folhas de *M. urundeuva* sobre teleóginas e larvas da cepa ICAMG de *R. microplus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BOVINOCULTURA LEITEIRA

A bovinocultura leiteira é uma atividade produtiva de elevada importância social e econômica no Brasil e no mundo. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção de leite em 2020 atingiu 887 bilhões de toneladas (FAO, 2022). O Brasil foi o quinto maior produtor neste ano. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam estabilidade da produção nacional nos últimos anos, atingindo 35,3 bilhões de litros em 2020 e 2021 (IBGE, 2022).

Apesar da baixa produtividade média dos rebanhos leiteiros brasileiro e mundial (1.684,90 e 1.075,20 kg/vaca/ano, respectivamente) (FAO, 2022) e a predominância de pequenos rebanhos (DOUPHATE *et al.*, 2013), o investimento em aumento de produtividade é o que tem garantido o aumento do volume de produção. Dessa forma, animais mais sensíveis e exigentes em ambiência, nutrição e manejo sanitário tendem a ser produzidos nas fazendas leiteiras (BRITO *et al.*, 2021).

O aumento da produtividade animal e conseqüente aumento da rentabilidade da produção pecuária pode ser comprometido por fatores relacionados à saúde dos animais (GRISI *et al.*, 2014). Dentre os problemas sanitários dos bovinos, o carrapato *Rhipicephalus microplus* representa um dos principais parasitos que compromete a produtividade dos rebanhos (RODRIGUES; LEITE, 2013).

3.2 O CARRAPATO BOVINO

Rhipicephalus microplus, popularmente conhecido como carrapato bovino ou carrapato-do-boi, é um artrópode pertencente à classe Arachnida, ordem Ixodida, família Ixodidae, que possui hábito hematófago e ciclo monoxênico, tendo os bovinos como hospedeiro preferencial (PEREIRA, 2008).

Durante o ciclo de desenvolvimento esses carrapatos parasitam o hospedeiro, realizam repasto sanguíneo por aproximadamente 22 dias e atingem estágios adultos de teleógina ou gonandro (FURLONG *et al.*, 2005). Após esse período as fêmeas ingurgitadas caem ao solo e dão início à fase não-parasitária (AHID, 2010) e em condições ideais de temperatura e umidade realizam a postura de cerca de 3 mil ovos em um período aproximado de 15 dias (PEREIRA, 2008). A eclosão das larvas ocorre em aproximadamente 12 dias. Posteriormente, os indivíduos desse estágio deslocam-se para as partes mais altas das plantas por estímulo luminoso e localizam os hospedeiros pelas vibrações, odor, calor e emissão de gás carbônico (AHID, 2010). Ao parasitarem os hospedeiros dão início à fase parasitária e se desenvolvem para os estágios de ninfa e adulto até dar início a um novo ciclo (ANDREOTTI *et al.*, 2019).

Além do desconforto e lesões causadas pela aderência ao hospedeiro, *R. microplus* atuam como vetores de agentes causadores do complexo da tristeza parasitária bovina (MARTINS, 2019), predispõem o hospedeiro a outros parasitos como larvas causadoras de miíases, levam à desvalorização do couro dos animais (BIEGELMEYER *et al.*, 2012) e geram altos custos diretos

e indiretos com medicamentos, descarte de leite e perda de produção (RODRIGUES; LEITE, 2013; GRISI *et al.*, 2014).

Outro problema relacionado ao carrapato bovino é o uso contínuo e indiscriminado de carrapaticidas (FURLONG; MARTINS, 2000). Essa prática aumenta a seleção de cepas multiresistentes aos principais acaricidas disponíveis (ABBAS *et al.*, 2014; HIGA *et al.*, 2015).

3.3 CONTROLE DO CARRAPATO

3.3.1 Métodos químicos e resistência parasitária

O principal método de controle dos carrapatos em bovinos é o uso de acaricidas químicos, sendo divididos em duas famílias: de contato ou sistêmicos. Furlong *et al.* (2005) citam que os principais carrapaticidas de contato são piretroides sintéticos, organofosforados, amidínicos, fenilpirazoles e naturalyte. Dentre os carrapaticidas sistêmicos, os autores descrevem lactonas macrocíclicas e benzofenilureas. Contudo diversas populações de *R. microplus* têm desenvolvido resistência a esses principais acaricidas no Brasil e no mundo (AGWUNOBI *et al.*, 2021; DZEMO *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de resistência a um acaricida ocorre devido a mutações genéticas que levam a alterações no local de ação desse acaricida. As alterações fenotípicas podem promover penetração reduzida ou maior metabolização e eliminação do princípio ativo pelo organismo dos carrapatos (KNOWLES, 1994, GUERRERO *et al.*, 2012). Já na multirresistência, os indivíduos utilizam diversos mecanismos para garantir resistência a diferentes tipos de acaricidas que não sejam relacionados quimicamente (NARI; HANSEN, 1999; DZEMO *et al.*, 2022).

3.3.2 Métodos alternativos

Tendo em vista a alta ocorrência de multirresistência aos acaricidas disponíveis (KLAFKE *et al.*, 2017), além de fatores como segurança alimentar e ambiental (ALVES *et al.*, 2012; GERAGE *et al.*, 2017; VAN WIEREN *et al.*, 2016), alguns métodos de controle alternativo de carrapatos têm sido avaliados como: estratégias de manejo e seleção genética de bovinos mais resistentes (GASPARIN *et al.*, 2007; BIEGELMEYER *et al.*, 2012), catação manual (NETO *et al.*, 2020) criação e preservação de predadores naturais (RESENDE; BARROS, 2015; CAMARGO *et al.*, 2017), desenvolvimento de vacinas (SCHETTERS *et al.*, 2016) e controles biológicos com o uso de fungos (FERNANDES *et al.*, 2012; SULLIVAN *et al.*, 2022), bactérias (FERNÁNDEZ-RUVALCABA *et al.*, 2010) e plantas (GONÇALVEZ *et al.*, 2016).

Em relação ao controle com o uso de fungos, Camargo *et al.* (2016) verificaram resultados viáveis a campo na utilização de solução comercial à base de *Metarhizium anisopliae* em bovinos, com eficiência de 75,09% na redução do número de carrapatos infestando os bovinos. Jones (2017) relatou resultados do uso de esporos de *Metarhizium* spp. sobre larvas em testes *in vitro*, em que promoveu 100% de mortalidade larval na concentração 10^8 conídios mL⁻¹ para alguns isolados do fungo.

O fungo *Beauveria bassiana* também tem sido avaliado no controle do carrapato bovino. Em uma pesquisa realizada na Colômbia, constatou-se 96,8% de mortalidade de teleóginas em

bovinos a campo em temperatura de até 30°C com a utilização de solução de esporos desse fungo (RIVERA *et al.*, 2018).

Esses fungos são utilizados em formulações de conídios e blastosporos e as condições ambientais em que são utilizados estão diretamente relacionados à sua eficácia (BERNARDO, 2016). O autor sugere o uso de adjuvantes que protejam os componentes contra fatores abióticos, bem como a seleção de isolados naturalmente mais tolerantes ao calor e à radiação.

Extratos de plantas e óleos essenciais também têm sido objetos de estudos no controle de *R. microplus* (VALENTE *et al.*, 2014; ROSADO-AGUILAR *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017). Santos *et al.* (2013) desenvolveram estudo com extratos de 21 espécies de plantas do pantanal brasileiro e 18 apresentaram eficácia de até 95% de mortalidade sobre lavras na concentração de 40%.

3.4 FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO BOVINO NO CONTROLE BIOLÓGICO

O trato digestório bovino é um ambiente colonizado por diversos organismos, dentre eles fungos e leveduras (ABRÃO *et al.*, 2014).

O gênero *Trichoderma* compreende fungos micelianos que apresentam colônias com micélios brancos recobertas por massas de conídios esverdeadas e, além do trato digestório de herbívoros, podem ser encontrados em solo e material orgânico em decomposição (BERNARDO *et al.*, 2019; MEYER *et al.*, 2019). Apresentam potencial entomopatogênico, sobretudo em agentes fito parasitários (MEYER *et al.*, 2019). Apesar do maior uso de *Trichoderma* spp. no controle de fungos e bactérias fitopatogênicos, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos para investigar seu potencial entomopatogênico. Anwar *et al.* (2016) observaram mortalidade de até 73% de ninfas de *Bemisia tabaci* (mosca-branca) com aplicação de suspensão de esporos de *T. longibrachiatum* na concentração de 4×10^8 UFC mL⁻¹. Silveira *et al.* (2018) demonstraram o potencial de enzimas quitinolíticas de *Trichoderma asperellum* em matar 50 a 80% de larvas e degradar a cutícula de adultos de *R. microplus*.

Aspergillus spp. também são fungos micelianos encontrados em diversos ambientes, sendo um dos mais abundantes do mundo (KRIJGSHELD *et al.*, 2013). *Aspergillus terreus* é uma das espécies do fungo que representa grande interesse pela indústria da saúde devido à sua capacidade de produção de metabólitos secundários como os policetídeos (HUANG *et al.*, 2021). Estes metabólitos abrangem uma grande classe que possuem funções antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitária, entre outras (PAULO *et al.*, 2019) porém não há relatos vinculando policetídeos produzidos por *Aspergillus* spp. ao controle de *R. microplus*. No controle biológico, Suliman e Mohammed (2012) utilizaram suspensões de esporos de *A. terreus* no carrapato *Hyalomma anatolicum* e verificaram CL50 estimada em $2,9 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ para ninfas e 64,14% de eficácia sobre a atividade reprodutiva de teleóginas na concentração de 4×10^8 UFC mL⁻¹.

Leveduras são fungos unicelulares que apresentam desenvolvimento em diversos *habitats* (PÉTER *et al.*, 2017). *Rhodotorula* e *Pichia* são gêneros encontrados no trato digestório de bovinos (LIMA, 2017; JI *et al.*, 2022) contudo têm sido foco mais amplo de estudos na indústria alimentícia e farmacêutica (COIMBRA, 2007; ASHRAF *et al.*, 2022; LATA *et al.*, 2022). Estudos

relacionados ao controle biológico com o uso dessas leveduras estão mais diretamente relacionados à competição com outros fungos (RAMOS *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2015; KOHLER, 2022). Além disso, o uso de *Pichia* spp. tem sido estudado como âncora para produção de proteínas recombinantes e metabólitos (COIMBRA, 2007; PEÑA *et al.*, 2018).

3.5 PLANTAS DO CERRADO NO CONTROLE BIOLÓGICO

O Cerrado é um dos cinco biomas brasileiros, representa cerca de 25% o território nacional e comporta grande diversidade de fauna e flora (IBGE, 2019). O bioma possui 12.829 espécies nativas de plantas catalogadas e muitas delas têm importância na vida cotidiana. Além da preservação do solo e abrigo para a fauna, muitas espécies são fonte de matéria-prima para a indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentícia (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; MAMEDE; PASA, 2019; BFG, 2021).

Diversas plantas do Cerrado apresentam potencial de atuação no controle biológico de insetos, pragas, doenças e parasitos (BORGES, 2017; VIEIRA *et al.*, 2018). *Myracrodruon urundeuva* (Allemão), popularmente conhecida como “aroeira” ou “aroeira-do-sertão” (Figura 1), é uma planta amplamente disseminada pelo Cerrado brasileiro, estando presente em todas as regiões do país (SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). Além do uso da madeira na marcenaria e construção civil, folhas são consumidas pelo gado e as flores são atrativos para abelhas e outros insetos polinizadores (VIEIRA *et al.*, 2018).

A espécie possui substâncias fenólicas, tanino e lectinas, além de proteínas, lipídeos e açúcares, o que traz interesse para seu uso no ramo medicinal e farmacêutico, sendo observados efeitos analgésico, antiinflamatório, cicatrizantes, entre outros (ABDALA *et al.*, 2002, QUEIROZ *et al.*, 2002; RIBEIRO, 2018).

Em relação ao controle de artrópodes, Sá *et al.* (2009) observaram o efeito de lectinas presentes em extratos de casca e cerne de *M. urundeuva* sobre a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*. Esses resultados foram complementados por Napoleão *et al.* (2012) que verificaram mortalidade de larvas de *A. aegypti* com CL50 de 0,202 mg mL⁻¹ como resultados de lectinas presentes em folhas de *M. urundeuva*.

Estudos mostram efeitos de plantas da família Anacardiaceae contra carrapatos, como demonstra Rey-Valeirón *et al.* (2018) que observaram 99,3% de mortalidade de larvas de *R. sanguineus* com o uso de óleo essencial de *Schinus molle* L. (aroeira-mole). Simioni *et al.* (2017) verificaram 42% de mortalidade de larvas de *R. microplus* com extrato da mesma planta. Já Ghosh *et al.* (2015) estudaram a eficácia de extrato etanólico de frutos de outra planta da mesma família, a *Semecarpus anacardium* L. (anacárdio oriental), e observaram 73,3% de mortalidade de adultos de *R. microplus* na concentração de 10%.

4 ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1

EFEITO DE EXTRATOS DE FUNGOS EM LARVAS E TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus microplus*

Artigo escrito conforme as normas da **Experimental and Applied Acarology**

Efeito de extratos de fungos em larvas e teleóginas de *Rhipicephalus microplus*

Neyller Lima Figueiredo^{1*}, Valdo Soares Martins Júnior¹, Viviane de Oliveira Vasconcelos²,
Eduardo Robson Duarte¹

* Neyller Lima Figueiredo

neyllerfigueiredo@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2633-4274

¹ Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Av. Universitária, 1000, Universitário, Montes Claros, Minas Gerais, 39.404-547, Brasil.

² Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Rui Braga, s/n, Vila Mauricéia, Montes Claros, Minas Gerais, CEP 39.401-089, Brasil

RESUMO

O controle do carrapato bovino com acaricidas convencionais tem favorecido a resistência parasitária, fator que indica a necessidade da busca por métodos alternativos eficazes e seguros de controle desse parasito. Fungos e leveduras têm sido utilizados para o controle biológico, contudo pouco se conhece sobre a eficácia desses fungos no controle do carrapato bovino. Neste estudo buscou-se o controle de duas cepas de *Rhipicephalus microplus* com extratos dos fungos micelianos *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus terreus* e das leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia kudriavzevii*. Os extratos foram obtidos a partir de fungos isolados do trato digestório de bovinos da raça nelore e cultivados em caldo Sabouraud Dextrose. Foram realizados biocarrapaticidograma e teste de pacote de larvas (TPL). Para a cepa Xangrilá foram utilizados extratos sem diluição de *T. longibrachiatum* (VN20) e *A. terreus* (VN15). Ambos apresentaram baixa eficácia sobre o controle da atividade reprodutiva das teleóginas e sobre a mortalidade de larvas. Para a cepa ICAMG foram utilizados extratos sem diluição de *R. mucilaginosa* (isolados V10S e V16S) e *P. kudriavzevii* (isolados V61 e V62). Todos os tratamentos ocasionaram baixa mortalidade de larvas e eficácia da cepa testada. Contudo o isolado V16S de *R. mucilaginosa* demonstrou 35% de eficiência na redução da atividade reprodutiva das teleóginas, o que fomenta futuros estudos que evidenciem eficácia ainda maior no controle biológico do carrapato bovino.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhipicephalus microplus*. Fungo entomopatogênico. Levedura. Controle biológico. Resistência parasitária.

ABSTRACT

The control of bovine ticks with conventional acaricides has been favoring parasite resistance, a factor that indicates the need of searching for effective and safe alternative methods to control this parasite. Fungi and yeasts have been being used for biological control, but little is known about the effectiveness of these fungi in controlling bovine ticks. In this study, the aim was to use extracts of the mycelial fungi *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillus terreus* and of the yeasts *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia kudriavzevii* to control two strains of *Rhipicephalus microplus*. The extracts were obtained from fungi isolated from the digestive tract of Nellore cattle and cultivated in Sabouraud Dextrose broth. Adult immersion test (AIT) and larvae pack test (TPL) were performed. For the Xangrilá strain, not diluted extracts of *T. longibrachiatum* (VN20) and *A. terreus* (VN15) were used. Both performed low efficacy on the control of the reproductive activity of the engorged females and low efficacy on the larvae mortality. For the ICAMG strain, not diluted extracts of *R. mucilaginosa* (isolated V10S and V16S) and *P. kudriavzevii* (isolated V61 and V62) were used. All treatments performed low larval mortality and low strain efficacy. However, the isolate V16S of *R. mucilaginosa* demonstrated 35% efficiency in reducing the reproductive activity of engorged females, which encourages future studies that show even greater efficacy in the biological control of the bovine tick.

KEYWORDS: *Rhipicephalus microplus*. Entomopathogenic fungus. Yeast. Biological control. Acaricide resistance.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por ceder as instalações dos Laboratórios de Parasitologia e Ecologia Microbiana para a realização do estudo. Agradecem também ao produtor Alexandre Nobre Guimarães e ao setor de bovinocultura do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG por fornecerem os carrapatos que foram utilizados nos testes. Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) para execução das atividades de pesquisa.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira é uma atividade de elevada importância social e econômica no Brasil e no mundo. Segundo dados do IBGE, a produção nacional de leite atingiu 35,3 bilhões de litros em 2021, o que mostra que a produção se manteve estável em comparação com o ano anterior. Minas Gerais foi o estado que apresentou maior produção nesse ano, totalizando 9,6 bilhões de litros de leite (IBGE 2022).

Dentre os problemas sanitários dos bovinos, os carrapatos *Rhipicephalus microplus* representam um dos principais parasitas que comprometem a produtividade dos rebanhos (Molento 2020). O clima predominantemente tropical do Brasil, associado a sistemas de criação extensivos ou semiextensivos, favorece o ciclo de vida do carrapato, que depende de períodos de calor e umidade e a presença de pastagem e dos animais como hospedeiros (Vaz Júnior et al. 2012). Além dos danos causados pela hematofagia, os carrapatos atuam como vetores de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, agentes da tristeza parasitária bovina (Molento 2020), causam lesões no couro dos animais e acarretam altos custos com medicamentos (Grisi et al. 2014).

Outro risco relacionado a esse ectoparasita é o uso irracional de carrapaticidas pelos produtores que, sem as devidas orientações técnicas para utilização, induzem a seleção de populações resistentes aos principais fármacos disponíveis (KLAFKE et al 2017). Segundo balanço realizado pela EMBRAPA (2020), comparando-se a eficácia dos carrapaticidas por um período de 20 anos, foi constatado que alguns grupos de acaricidas apresentam populações de carrapatos com alta resistência, atingindo menos de 20% de eficácia. Abbas et al. (2014) têm registrado o início de resistência a alguns carrapaticidas desde 1950 em diversos países.

Estudos com controle biológico utilizando fungos apresentaram resultados satisfatórios no combate ao carrapato. Jones (2017) e Samish et al. (2014) relataram resultados satisfatórios com o uso de conídios de *Metarhizium* sp. sobre larvas e teleóginas de *Rhipicephalus* spp. Outros estudos demonstram a eficácia de *Beauveria bassiana* na mortalidade de teleóginas de *Rhipicephalus microplus* (Rivera et al. 2018; Sun et al. 2013).

Outros fungos também apresentam potenciais entomopatogênicos e são facilmente encontrados em diversos ambientes, como os fungos filamentosos *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. e leveduriformes *Rhodotorula* spp. e *Pichia* spp. (Singh et al. 2017; Miranda-Miranda et al. 2012; Liu et al. 2013; Chan et al. 2012).

O gênero *Trichoderma* corresponde a fungos com potencial entomopatogênico, que podem competir por substrato, apresentar antibiose e parasitismo e são facilmente encontrados em solo e trato digestório de animais, o que indica sua ampla biodisponibilidade (Bernardo et al. 2019; Pavani 2017; Brito et al. 2010). Maia Filho et al. (2017) relataram presença de hifas de *Trichoderma virens* em ovos de *Toxocara canis* após exposição a micélios do fungo, com 57,4% de redução na eclodibilidade do grupo de ovos expostos ao fungo em relação ao grupo controle. Em estudo de Vieira et al. (2016) com a utilização de *Trichoderma longibrachiatum*, o filtrado do fungo apresentou eficácia de 92,8% na mortalidade larval de *Haemonchus contortus*.

Aspergillus spp. também são encontrados em diversos tipos de solo e trato digestório de animais e suas diversas espécies têm capacidade de produção de enzimas extracelulares, ácidos e metabólitos secundários, o que permite diversas aplicações ambientais e industriais (Ward et al. 2005). No controle biológico, Djouhri et al. (2022) demonstraram a eficácia de *A. terreus* na concentração de 10^8 esporos mL^{-1} na mortalidade de baratas da espécie *Blattella germanica* atingindo taxa de mortalidade de 92,96 % em adultos por contato direto com a solução de esporos.

Fungos dos gêneros *Rhodotorula* e *Pichia* pertencem ao grupo das leveduras e caracterizam-se por se adaptarem em ambientes diversos, podendo estar presentes no solo, ar, plantas, animais e alimentos e também apresentam potencial de controle biológico, sobretudo contra agentes fitossanitários (Cheng et al. 2016; Masih et al. 2001). Contudo, enzimas e metabólitos produzidos por *Rhodotorula* spp., demonstram potencial de ação sobre outros agentes patogênicos (Rosa 2009) e cepas de *P. pastoris* vêm sendo utilizadas para produção de vacinas contra *R. microplus* por meio de proteínas recombinantes (Andreotti et al. 2012).

Tais estudos demonstram a eficácia dos fungos na forma de solução de esporos ou extratos contendo metabólitos. Apesar disso, considerando o controle biológico com fungos, as regiões de clima semiárido apresentam características abióticas para esses microrganismos, tais como calor, baixa umidade e alta radiação solar (Muniz et al. 2020), o que fomenta pesquisas que elucidem as formas mais eficazes de uso de fungos no controle biológico de carrapatos nessas regiões.

Objetivou-se investigar a eficácia de extratos dos fungos provenientes do trato digestório de bovinos *T. longibrachiatum*, *A. Terreus*, *R. mucilaginosa* e *P. kudriavzevii* em duas cepas de *R. microplus* como alternativas no controle desse parasita.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Parasitologia e Ecologia Microbiana do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG e registrado sob o protocolo: 265/2017.

2.1 Isolados fúngicos utilizados

Os isolados VN20 de *Trichoderma longibrachiatum* [KF781535] (Fig.1 – a) e VN15 de *Aspergillus terreus* [KF781532] (Fig.1 – b) foram obtidos do fluido ruminal de novilhos Nelore criados em regime de pastejo de *Urochloa decumbens*, suplementados com mistura mineral (ABRÃO et al. 2014). Os isolados V10S e V16S (*Rhodotorula mucilaginosa*) [KU316790.1] (Fig.1 – c) e V61 e V62 (*Pichia kudriavzevii*) [KU316741.1] (Fig.1 – d) foram provenientes do fluido ruminal de vacas da raça Nelore criadas em pastejo de capim-marandu (*Urochloa brizantha*) como descrito por Lima (2017).

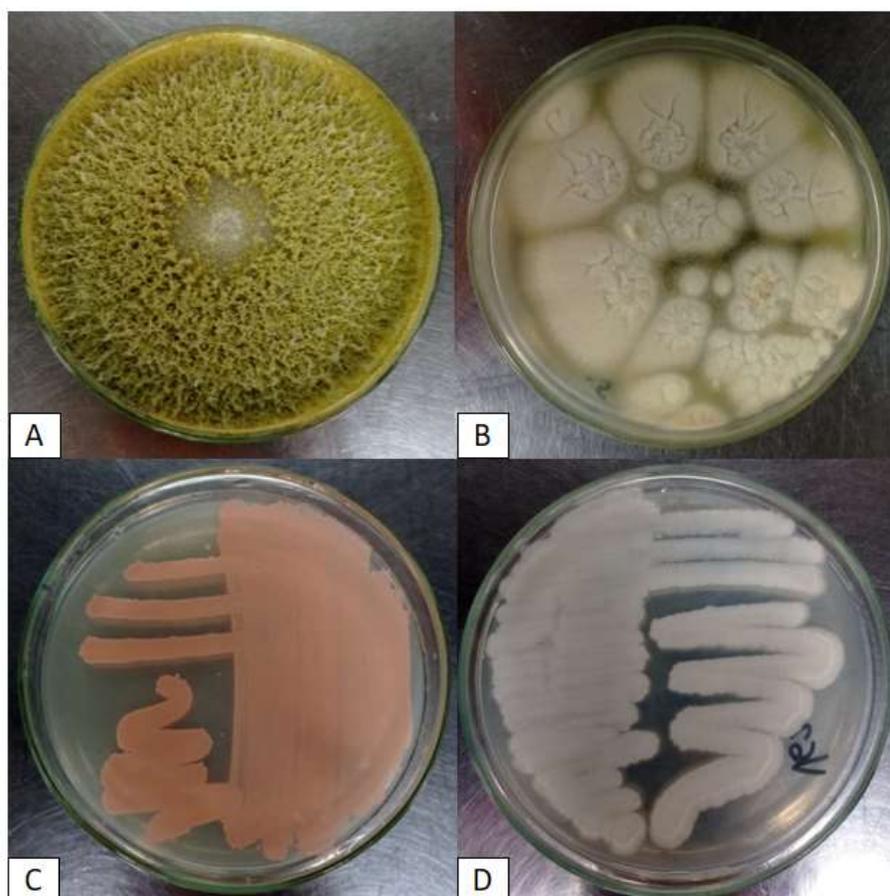


Figura 1. Isolados fúngicos cultivados em ágar Sabouraud. a – *Trichoderma longibrachiatum*. b – *Aspergillus terreus*. c – *Rhodotorula mucilaginosa*. d – *Pichia kudriavzevii*. (Arquivo pessoal)

A identificação molecular dos isolados fúngicos foi relatada por Abrão et al. (2015). A região ITS do rDNA foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir dos *primers* ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), de acordo com método descrito por White et al. (1990). Os produtos de PCR purificados foram mensurados utilizando NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e as reações de sequenciamento foram realizadas em DYEnamic™ (Amersham Biosciences, EUA) associado ao sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETM 1000. As sequências obtidas foram aparadas utilizando o software Bioedit Versão 7.2.5 e Asparagin (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) das regiões de baixa qualidade (Score Phred <20), e a montagem das *contigs* das sequências nucleotídicas obtidas foi editada e comparada com sequências do banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa Blast N (Altschul et al. 1997). Os isolados com similaridade de 99% ou mais a uma sequência já depositada com base nas características morfológicas, micromorfológicas e análise filogenética, foram considerados pertencentes à mesma espécie.

Lima (2017) descreveu os procedimentos para identificação das leveduras, que se deram pela análise das sequências dos domínios D1 e D2 do gene 26S do RNA ribossomal amplificados pela PCR. De acordo com metodologia de Hoffman e Winston (1987), a extração do DNA total

foi realizada e os *primers* NL1 (5'-GCA TAT CAA AAG GAA GAG TAA GCC-3') e NL4 (5'-GGT AAG CTT CGC TGT CCG G-3') foram utilizados para amplificação da região do DNAr como descrito por Burgaud et al. (2013), com modificações. Os *amplicons* produzidos foram purificados e quantificados em Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm. As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) foram editadas e também foram comparadas com sequências depositadas no GenBank usando o programa Blast N (Altschul et al. 1997). Os isolados que apresentaram similaridade de 97% a uma determinada espécie já depositada no GenBank foram considerados pertencentes à mesma espécie (Stackebrandt e Goebel 1994).

Os fungos micelianos foram armazenados em frascos estéreis com discos de papel celulose contendo esporos e as leveduras em caldo Sabouraud Dextrose (KASVI®, Téramo, Itália) armazenadas em ultrafreezer a -80° C.

2.2 Obtenção dos extratos dos fungos

Discos contendo esporos dos fungos micelianos foram inoculados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (KASVI®, Téramo, Itália) em estufa BOD a 37°C por sete dias. Os esporos das colônias puras foram raspados com swabs e suspensos em solução salina a 0,85% acrescidas de tween 80 a 0,01% (Freitas 2018).

Para o cultivo foram preparados 400 mL do caldo Sabouraud Dextrose (KASVI®, Téramo, Itália) padronizados em 10^8 UFC mL⁻¹ e incubados em incubadora Shaker de bancada (NT712, Novatecnica, São Paulo, Brasil) a 39°C e 120 rpm durante sete dias. Após esse período, o meio contendo o fungo crescido foi triturado, homogeneizado e filtrado em funil com gazes e algodão como descrito por Nery et al. (2010) e conservado em ultrafreezer a -80° C. Para mensuração da matéria seca (MS), amostras de 30 mL dos filtrados foram colocadas em placas de Petri e levadas a estufa de secagem a 105°C até estabilização do peso. O filtrado do isolado VN20 apresentou 2,22% de MS e o isolado VN15 1,54% de MS.

As leveduras foram cultivadas em meio ágar Sabouraud Dextrose (KASVI®, Téramo, Itália) acrescido de cloranfenicol (150 mg/L) por dois dias a 37°C. As colônias foram suspensas em solução salina (NaCl) a 0,85% acrescidas de tween 80 a 0,01% e padronizadas a 10^9 UFC mL⁻¹. Posteriormente, 10 mL foram inoculados em 100 mL de caldo Sabouraud Dextrose (KASVI®, Téramo, Itália) e incubados em Shaker de bancada (NT712, Novatecnica, São Paulo, Brasil) a 39°C e 120 rpm durante três dias. Para obtenção dos extratos, os meios foram centrifugados a 270g por 10 minutos (8BTF, ITR, Rio Grande do Sul, BR) e o sobrenadante foi coletado com auxílio de pipeta de vidro e armazenado em ultrafreezer a -80° C. Os teores de MS dos sobrenadantes também foram mensurados nas mesmas condições dos filtrados de *T. longibrachiatum* e *A. terreus* e apresentaram os seguintes resultados: V10S: 2,26%; V16S: 2,11%; V61: 1,01%; e V62: 1,05%.

2.3 Populações de *Rhipicephalus microplus* avaliadas

A cepa Xangrilá foi proveniente de bovinos leiteiros criados em piquetes de capim-bengo

(*Brachiaria purpuracens*) irrigados por sistema de inundação.

A cepa ICAMG foi proveniente de bovinos leiteiros criados em sistema confinado no período seco e a pastejo no período chuvoso no setor de bovinocultura de leite do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. Para ambas as cepas, as coletas foram realizadas em animais Girolando, $\frac{3}{4}$ de sangue Holandês, no município de Montes Claros – MG, que não receberam nenhum tratamento carrapaticida por um período de 60 dias antes da coleta.

Cada cepa foi utilizada para realização de experimentos com isolados fúngicos diferentes.

2.4 Imersão das teleóginas nos extratos fúngicos

Foi realizado teste de biocarrapaticidograma conforme metodologia proposta por Drummond et al. (1973). Para a cepa Xangrilá foi avaliada a eficácia *in vitro* dos filtrados dos isolados VN20 e VN15 comparando com os principais acaricidas utilizados na propriedade e um grupo controle contendo somente água destilada. Para os grupos tratados com filtrados fúngicos, foi utilizado 1 mL do filtrado sem diluição para cada teleóquina.

Os acaricidas comerciais utilizados para a cepa Xangrilá foram cipermetrina a 0,15 mg mL⁻¹ de (Barrage, Zoetis, São Paulo, Brasil), supona a 0,05mg mL⁻¹ (Carrapaticida e Sarnicida UCB, Usinas Químicas Brasileiras, São Paulo, Brasil), deltametrina a 25mg mL⁻¹ (Butox P CE 25, MSD, São Paulo, Brasil), associação cipermetrina a 150 mg mL⁻¹, clorpirifós a 250 mg mL⁻¹ e citronelal a 10 mg mL⁻¹ (Colosso Pulverização, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e amitraz a 0,25mg mL⁻¹ (Triatox, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), diluídos conforme recomendações dos fabricantes.

Para a cepa ICAMG foi utilizado o sobrenadante do cultivo dos isolados V10S, V16S, V61 e V62, sendo 1mL/teleóquina em cada repetição. Os acaricidas comerciais utilizados foram supona a 0,05mg mL⁻¹ (Carrapaticida e Sarnicida UCB, Usinas Químicas Brasileiras, São Paulo, Brasil), associação cipermetrina a 150 mg mL⁻¹, clorpirifós a 250 mg mL⁻¹ e citronelal a 10 mg mL⁻¹ (Colosso Pulverização, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e amitraz a 0,25mg mL⁻¹ (Triatox, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), diluídos conforme recomendações dos fabricantes e um grupo controle contendo água destilada.

As teleóginas foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha e distribuídas em grupos homogêneos. Cada grupo contou com quatro repetições e cada repetição continha cinco teleóginas que foram colocadas em placas de Petri e pesadas em balança analítica.

As repetições foram submersas por cinco minutos em 5 mL das soluções dos seus referidos produtos. Após esse período as teleóginas foram secas em papel toalha e incubadas em BOD à temperatura de 28 ± 1°C e umidade relativa próxima a 80% por 15 dias para postura.

Ao décimo quinto dia foi mensurado o peso das massas de ovos em balança analítica. As posturas foram acondicionadas em seringas descartáveis vedadas com algodão hidrofílico e incubadas sob as mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente por 21 dias.

Para avaliação da eclodibilidade (EC) foi aplicada a metodologia proposta por Figueiredo et al (2019) com modificações. Foi adicionada solução de água e detergente neutro na proporção

1:1 às seringas contendo larvas e ovos. Após agitações vigorosas, alíquotas de 200 µL da suspensão foram analisadas em lâminas em microscópio óptico em objetiva de 10X para contagem de larvas e ovos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros, descritos por Bennett (1974) e Drummond et al. (1973): capacidade de postura (CP), EC, eficiência reprodutiva (ER) e eficácia do produto (EP), sendo calculados a partir das seguintes fórmulas:

$$CP = (\text{peso dos ovos} / \text{peso das teleóginas}) \times 100$$

$$EC = n^{\circ} \text{ de larvas} / (n^{\circ} \text{ ovos} + n^{\circ} \text{ de larvas})$$

$$ER = (\text{peso dos ovos} \times EC \times 20.000) / \text{peso das teleóginas}$$

$$EP = ((ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado}) / ER \text{ do grupo controle}) \times 100$$

2.5 Teste do pacote de larvas

Após 21 dias do início da eclosão dos ovos, foi realizado teste de pacote de larvas (TPL) conforme metodologia proposta por Stone e Haydock (1962) com modificações.

Foram confeccionados pacotes com papel filtro (Whatmann nº 1) na dimensão de 6 x 6 cm, vedados nas laterais, sendo mantida uma lateral aberta para inserção das larvas. Para cada grupo foram realizadas quatro repetições contendo aproximadamente 100 larvas em cada repetição.

As larvas de cada cepa foram inseridas nos pacotes com o auxílio de um pincel, os pacotes foram vedados com grampos e banhados com 400 µL de cada solução definida. Foram utilizados os mesmos grupos de fungos e leveduras para cada cepa conforme tratamentos em fêmeas ingurgitadas, um grupo químico com supona a 0,05mg mL⁻¹ (Carrapaticida e Sarnicida UCB, Usinas Chímicas Brasileiras, São Paulo, Brasil) para cada cepa e controle com água destilada. Os pacotes de cada grupo foram colocados em placas de Petri e incubados nas mesmas condições descritas para as teleóginas por 24h e as leituras foram realizadas da quantidade de larvas vivas e mortas.

2.6 Análise estatística

Os testes foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado para cada rebanho avaliado e foram analisados os seguintes parâmetros biológicos: CP, EC, ER, EP e mortalidade de larvas. Os dados foram avaliados em análise de variância (ANOVA) entre os grupos tratados com fármacos, fungos e controles e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o pacote estatístico SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007).

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos dos filtrados dos fungos sobre a atividade reprodutiva das teleóginas - Cepa Xangrilá

Os filtrados de VN15 e VN20 em teleóginas da cepa Xangrilá não reduziram a CP e EC. A administração de amitraz e supona promoveram menores CP e EC e maiores eficácias acaricidas quando comparados aos demais produtos (Tabela 1, $p < 0,05$).

Tabela 1. Efeito dos filtrados de *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN20) e *Aspergillus terreus* (isolado VN15) sobre a atividade reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Cepa Xangrilá)

Tratamento	Capacidade de Postura (%)*		Eclodibilidade (%)		Eficiência do Produto (%)**	
	Média	dp ^b	Média	dp	Média	dp
Isolado VN20	50,33 a	2,83	97,62 a	2,12	6,73 d	5,62
Isolado VN15	52,15 a	5,78	97,88 a	1,15	5,63 d	8,79
Cipermetrina	40,67 b	9,33	97,77 a	0,94	25,15 c	9,86
Deltametrina	44,02 b	12,23	87,01 a	3,58	27,49 c	19,84
Associação ^a	22,51 c	4,63	58,21 b	8,60	75,12 b	7,83
Supona	5,00 d	4,32	17,48 c	23,45	97,28 a	5,50
Amitraz	9,16 d	5,82	33,67 c	36,59	92,22 a	8,54
Controle	52,98 a	2,87	98,81 a	1,09	-	-

^a Associação de cipermetrina, clorpirifós e citronelal

^b Desvio padrão

*Capacidade de postura (CP) = (peso da massa de ovos/ peso inicial das fêmeas) X 100

**Eficiência do Produto (EP) = (Eficiência Reprodutiva Controle - Eficiência Reprodutiva Produto / Eficiência Reprodutiva Controle) X 100.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas são estatisticamente semelhantes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.2 Efeitos dos sobrenadantes dos fungos sobre a atividade reprodutiva das teleóginas - Cepa ICAMG

Os sobrenadantes das leveduras avaliadas em teleóginas da cepa ICAMG não se mostraram eficazes na redução da CP e EC. O isolado V16S reduziu a ER do carrapato em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) e apresentou EP de 35% (Tabela 2). O uso de supona apresentou a maior redução da CP e EC dentre os acaricidas avaliados (Tabela 2, $p < 0,01$).

Tabela 2. Efeito do sobrenadante do cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* (isolados V10S e V16S) e *Pichia kudriavzevii* (isolados V61 e V62) sobre a atividade reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Cepa ICAMG).

Tratamento	Capacidade de Postura (%) [*]		Eclodibilidade (%)		Eficiência do Produto (%) ^{**}	
	Média	dp ^b	Média	dp	Média	dp
Isolado V10S	42,89 a	4,95	92,99 a	2,89	1,20 d	2,07
Isolado V16S	33,03 a	11,34	63,76 b	15,94	35,00 c	30,23
Isolado V61	38,86 a	1,72	88,63 a	5,70	5,79 d	6,14
Isolado V62	44,07 a	9,06	89,06 a	4,07	3,66 d	5,18
Associação ^a	18,63 b	4,06	78,46 a	9,85	59,37 b	3,22
Amitraz	18,04 b	3,75	83,52 a	4,54	55,99 b	11,29
Supona	7,62 b	5,39	38,20 c	27,01	83,37 a	11,79
Controle	40,05 a	4,77	86,47 a	14,11	-	-

^a Associação de cipermetrina, clorpirifós e citronelal

^b Desvio padrão

^{*}Capacidade de postura (CP) = (peso da massa de ovos/ peso inicial das fêmeas) X 100

^{**}Eficiência do Produto (EP) = (Eficiência Reprodutiva Controle - Eficiência Reprodutiva Produto / Eficiência Reprodutiva Controle) X 100.

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna são estatisticamente semelhantes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.3 Mortalidade de larvas - Cepa Xangrilá

Os filtrados de VN20 e VN15 ocasionaram baixa mortalidade sobre as larvas da cepa Xangrilá. O tratamento químico utilizando supona, que se apresentou como o carrapaticida com maior eficácia nos resultados do biocarrapaticidograma da cepa testada, causou mortalidade de 100% das larvas desta cepa (Tabela 3, $p < 0,05$).

Tabela 3. Mortalidade de larvas (%) de *Rhipicephalus microplus* (Cepa Xangrilá) tratadas com filtrados de *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN20) e *Aspergillus terreus* (isolado VN15).

Tratamento	Mortalidade (%)	
	Média	dp ^a
VN20	3,39 b	3,45
VN15	2,78 b	2,02
Supona	100,00 a	0
Controle	11,74 b	8,18

^a Desvio padrão

Médias seguidas pela mesma letra na coluna são estatisticamente semelhantes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.4 Mortalidade de larvas - Cepa ICAMG

Em todos os tratamentos com isolados de leveduras sobre as larvas de carrapatos da cepa ICAMG ocorreram baixa mortalidade larval. Assim como para a cepa Xangrilá, supona ocasionou 100% de mortalidade das larvas testadas ($p < 0,05$).

Tabela 4. Mortalidade de larvas (%) de *Rhipicephalus microplus* (Cepa ICAMG) tratadas com sobrenadante do cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* (isolados V10S e V16S) e *Pichia kudriavzevii* (isolados V61 e V62).

Tratamento	Mortalidade (%)	
	Média	dp ^a
V10S	13,42 b	8,01
V16S	16,29 b	12,24
V61	4,78 b	6,50
V62	16,52 b	17,00
Supona	100,00 a	0
Controle	11,74 b	8,18

^a Desvio padrão

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna são estatisticamente semelhantes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4 DISCUSSÕES

4.1 Cepa Xangrilá

A análise do biocarrapaticidograma para cipermetrina, deltametrina, a associação de cipermetrina, clorpirifós e citronelal indicaram resistência da cepa Xangrilá, com EP inferior a 95%, conforme indicado pela Legislação Brasileira (Brasil 2012). Supona e amitraz apresentaram similaridade estatística e representam os carrapaticidas com maior eficácia para a cepa avaliada.

No tratamento sobre as larvas, os grupos biológicos avaliados não foram capazes de induzir mortalidade, apresentando resultado similar ao grupo controle.

A baixa eficácia acaricida dos fungos utilizados no presente estudo pode estar relacionada à baixa concentração de metabólitos devido à utilização de filtrados com baixo teor de matéria seca. Diferentemente, Zahran et al. (2017) obtiveram resultados de 93% de mortalidade de percevejos tropicais *Cimex hemipterus* com a utilização de suspensão de esporos de *Aspergillus tubingensis* e *Trichoderma harzianum*, o que demonstra que o uso de suspensão de esporos pode apresentar melhores resultados em comparação com o uso dos filtrados.

Estudos com *Trichoderma* spp. demonstram sua capacidade de produções enzimáticas e atuação contra mecanismos de proteção dos insetos (Mukherjee et al. 2008; Mach e Zeilinger 2003). *Aspergillus* spp. também podem causar danos devido à produção de metabólitos que se aderem à cutícula dos hospedeiros (Shahid et al. 2012).

4.2 Cepa ICAMG

Para a cepa ICAMG todos os acaricidas químicos testados em teleóginas apresentaram resultados que indicam início de resistência da cepa avaliada, conforme indicado pela Legislação Brasileira (Brasil 2012). Supona apresentou elevada capacidade de causar mortalidade sobre as larvas da cepa testada.

Os resultados apresentados pelo sobrenadante do isolado V16S demonstraram potencial de redução da CP e EC, assemelhando-se sob análise estatística aos tratamentos químicos com amitraz e associação de cipermetrina, clorpirifós e citronelal. Esse resultado possivelmente está relacionado com a produção de lipases e proteases pela levedura (Duarte et al. 2013). Seifi et al. (2016) relataram a produção de lipases em diversas espécies de *Rhodotorula*, dentre elas a *R. mucilaginosa*. Essas enzimas podem ter atuado sobre as estruturas externas e internas das teleóginas, seja por ação sobre a cutícula ou por penetração nos orifícios naturais dos carrapatos conforme mecanismos de ação dos carrapaticidas de contato descritos por Furlong et al. (2007).

Pode-se observar também variação intraespecífica, uma vez que outro isolado da mesma espécie apresentou resultados inferiores no controle *in vitro* dos carrapatos da cepa avaliada. Tal resultado demonstra a importância de seleção da cepa para controle biológico a fim de buscar a maior efetividade de resultados devido a heterogeneidade fenotípica e genética como observado por Libkind et al. (2008) em cepas de *R. mucilaginosa* e por González-Arenzana et al. (2017) em diversas espécies de leveduras coletadas em fermentados e instalações vinícolas.

Os sobrenadantes dos isolados V10S, V61 e V62 apresentaram baixo potencial de reduzir CP e EC e por consequência demonstraram baixa EP. Os sobrenadantes dos isolados V61 e V62 apresentaram baixos teores de MS quando comparados aos isolados de *R. mucilaginosa*, fator que pode estar relacionado com a concentração de metabólitos presentes no sobrenadante. Lata et al. (2022) estudaram um isolado de *P. kudriavzevii* e observaram seu potencial de produção de várias enzimas, como β -galactosidase, protease, amilase, fitase e lipase, contudo no presente estudo efeitos das enzimas não foram observados no controle *in vitro* da cepa de carrapatos avaliada de forma significativa.

5 CONCLUSÕES

O isolado V16S de *R. mucilaginosa* mostrou potencial na redução da atividade reprodutiva de *R. microplus* sob a forma de sobrenadante. Os demais isolados avaliados não apresentaram eficácia no controle *in vitro* das cepas de carrapato testadas. Futuros estudos devem ser realizados para avaliar diferentes apresentações ou concentrações dos extratos fúngicos no controle do carrapato.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas RZ et al (2014) Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology* 203:6-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Abrão FO et al (2014) Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Current Microbiology* 69:649-659. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0633-5>
- Abrão FO et al (2015) Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hípidos ou com acidose ruminal. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 37:7-14.
- Altschul SF et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Andreotti R et al (2012) Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 30:6678-6685. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.066>
- Bennett GF (1974) Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia* 16:52-61.
- Bernardo JT et al (2019) Isolamento *on farm* de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. *Revista Eletrônica Científica Da UERGS* 5:263-270. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.53.263-270>
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 401 p., 2012.
- Brito FS, Miller PRM, Stadnik M (2010) Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. *Revista Brasileira de Agroecologia* 5:43-53.
- Burgaud G et al (2013) Deciphering the presence and activity of fungal communities in marine sediments using a model estuarine system. *Aquatic Microbial Ecology* 70:45-62. <https://doi.org/10.3354/ame01638>
- Chan GF et al (2012) Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryot Cell* 11. <https://doi.org/10.1128/EC.00229-12>
- Cheng Z et al (2016) Heat shock improves stress tolerance and biocontrol performance of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Biological Control* 95:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.001>
- Djoughri Y et al (2022) Susceptibility of nymphs and adults of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) to *Aspergillus terreus* (Eurotiales: Trichocomaceae) infested via oral ingestion, contact, and bait methods: a comparative study. *Applied Entomology and Zoology* 57:137-145. <https://doi.org/10.1007/s13355-022-00776-8>
- Drummond RO et al (1973) *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of

- insecticidas. *Journal of Economic Entomology* 66:130 –133.
<https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>
- Duarte AWF et al (2013) Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles* 17:1023-1035.
<https://doi.org/10.1007/s00792-013-0584-y>
- EMBRAPA. Anuário do Leite 2020. Disponível em: embrapa.br/gado-de-leite. Acesso em: 02 dez. 2020.
- Freitas CES (2018) Potencial de fungos do trato digestório de ovinos para utilização como probiótico. Tese, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- Furlong J et al (2007) O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar. *A Hora Veterinária* 27:26-32.
- González-Arenzana L et al (2017) Genetic and phenotypic intraspecific variability of non-*Saccharomyces* yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain). *Journal of Applied Microbiology* 122:378-388. <https://doi.org/10.1111/jam.13341>
- Grisi L et al (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 23:150-156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267–272.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2021, Rio de Janeiro, RJ, v.49, p.1-12, 2022.
- Jones GA (2017) Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese. Dissertação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Klafke G et al (2017) Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks and tick-borne diseases* 8:73-80. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>
- Lata P et al (2022) In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 20:1-10. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00416-2>
- Libkind D et al (2008) Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. *Journal of basic microbiology* 48:93-98.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200700257>
- Lima SM (2017) Potencial biotecnológico de leveduras provenientes do rúmen visando a adição em dietas de ruminantes. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Liu J et al (2013) Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology* 167:153-160.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Mach R, Zeilinger S (2003) Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology* 60:515-522.

<https://doi.org/10.1007/s00253-002-1162-x>

- Maia Filho FS et al (2017) *Trichoderma virens* as a biocontrol of *Toxocara canis*: In vivo evaluation. Revista Iberoamericana de Micología 34:32-35. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.06.004>
- Masih EI et al (2001) Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. FEMS microbiology letters 202:227-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10808.x>
- Miranda-Miranda E et al (2012) Natural occurrence of lethal aspergillosis in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari Ixodidae). Parasitology 139:259-263. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001843>
- Molento MB (2020) Avaliação seletiva de bovinos para controle do *Rhipicephalus microplus*. ARS Veterinária 36:01-02. <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2020v36n1p01-02>
- Mukherjee PK, Nautiyal CS, Mukhopadhyay AN (2008) Molecular Mechanisms of Biocontrol by *Trichoderma* spp. In: Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. Soil Biology 15:243-262. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75575-3_10
- Muniz ER et al (2020) Efficacy of *Metarhizium anisopliae* conidia in oil-in-water emulsion against the tick *Rhipicephalus microplus* under heat and dry conditions. BioControl 65:339-351. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10002-5>
- Nery PS et al (2010) Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. Veterinary Parasitology 171:361-364. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.043>
- Pavani CD (2017) Potencial biotecnológico do metagenoma de rúmen bovino da raça nelore (*Bos taurus indicus*), visando à desconstrução da biomassa vegetal. Tese, Universidade Estadual Paulista.
- Rivera APT et al (2018) Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. Revista Argentina de Microbiología 50:426-430. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.005>
- Rosa MM (2009) Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos. Tese, Universidade Estadual Paulista.
- SAEG, Sistema para Análises Estatísticas, 2007. Versão 9.1. Fundação Arthur Bernardes, UFV, Viçosa.
- Samish M et al (2014) Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. Veterinary Parasitology 206:258-266. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.019>
- Seifi Z et al (2016) Extracellular Enzymes Production and Biofilm Formation in *Rhodotorula* Species. Current Enzyme Inhibition 12:155-160.
- Shahid AA et al (2012) Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. Archives of Biological Sciences 64:21-42.

<https://doi.org/10.2298/ABS1201021S>

- Silva TPP, Moreira JC, Peres F (2012) Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira. *Ciência & Saúde Coletiva* 17:311-325. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012000200006>
- Singh D, Raina TK, Singh J (2017) Entomopathogenic fungi: An effective biocontrol agent for management of insect populations naturally. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 9:833.
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44:846-849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Stone BF, Haydock KP (1962) A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Bulletin of Entomological Research* 53:563-578. <https://doi.org/10.1017/S000748530004832X>
- Sun M et al (2013) Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari : Ixodidae) in China. *Parasitology International* 62:412–415. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.04.008>
- Vaz Junior IS, Seixas A, Masuda A (2012) Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. INCT-EM 01-27.
- Vieira TM et al (2016) Fungi extract in the inhibition of the egg hatching and larval development of the *Haemonchus contortus*. *African Journal of Microbiology Research* 10:1044-1050. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8027>
- Ward OP et al (2005) Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in applied microbiology* 58:1-75. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)58001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)58001-8)
- White TJ et al (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T (eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Zahran Z et al (2017) Laboratory efficacy of mycoparasitic fungi (*Aspergillus tubingensis* and *Trichoderma harzianum*) against tropical bed bugs (*Cimex hemipterus*) (Hemiptera : Cimicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7:288-293. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.021>

DECLARAÇÕES

Financiamento Os autores declaram que nenhum financiamento, subsídio ou outro tipo de apoio foi recebido durante a preparação deste artigo.

Declaração de interesses Os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes para divulgar.

Contribuições dos autores Todos os autores contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. A preparação do material, a coleta e a análise dos dados foram realizadas com a participação de todos os autores. Todos os autores leram e aprovaram o artigo final.

Aprovação ética O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA - UFMG) e registrado sob o protocolo: 265/2017.

4.2 ARTIGO 2

**EFEITO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE AROEIRA EM LARVAS E TELEÓGINAS DE
*Rhipicephalus microplus***

Artigo escrito conforme as normas da **Experimental and Applied Acarology**

Efeito de extratos de folhas de Aroeira em larvas e teleóginas de *Rhipicephalus microplus*

Neyller Lima Figueiredo^{1*}, Valdo Soares Martins Júnior¹, Viviane de Oliveira Vasconcelos²,
Eduardo Robson Duarte¹

* Neyller Lima Figueiredo

neyllerfigueiredo@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2633-4274

¹ Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Av. Universitária, 1000, Universitário, Montes Claros, Minas Gerais, 39.404-547, Brasil.

² Universidade Estadual de Montes Claros, Avenida Rui Braga, s/n, Vila Mauricéia, Montes Claros, Minas Gerais, CEP 39.401-089, Brasil

RESUMO

Métodos alternativos de controle do carrapato bovino têm sido fundamentais devido à alta ocorrência de cepas resistentes aos acaricidas convencionais. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a eficácia acaricida de extratos de folhas de *Myracrodruon urundeuva* sobre *Rhipicephalus microplus*. Os extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) de folhas da planta foram avaliados nas concentrações 25 a 100 mg mL⁻¹ pelo teste de imersão de teleóginas. Para avaliar a mortalidade de larvas foi realizado teste de pacote de larvas (TPL) nas concentrações de 10 a 100 mg mL⁻¹. O EE a 75 e 100 mg mL⁻¹ reduziu significativamente a capacidade de postura, o que não ocorreu para o EA. Não houve redução da eclodibilidade de larvas para os extratos avaliados. O EE apresentou eficácia acaricida em teleóginas de 14,93 a 40,79%. EA e EE apresentaram 82,89 e 91,21% de efeito larvicida, respectivamente e a CL₉₀ foi estimada em 226,1 mg mL⁻¹ para o EA e 159,3 mg mL⁻¹ para o EE. Os extratos das folhas *M. urundeuva* apresentaram potencial de controle *in vitro* do carrapato em cepa resistente e estudos futuros devem ser feitos para avaliar seus possíveis efeitos tóxicos e avaliar a eficácia *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Carrapato bovino. Resistência a carrapaticidas. *Myracrodruon urundeuva*. Eficiência reprodutiva. Mortalidade de larvas.

ABSTRACT

Alternative controlling methods for bovine ticks have been essential due to the high occurrence of strains resistant to conventional acaricides. In this research, the aim was to evaluate the acaricidal efficacy of the *Myracrodruon urundeuva* leaf extracts on the *Rhipicephalus microplus*. The aqueous extract (EA) and the ethanolic extract (EE) of the plant leaves were evaluated at concentrations of 25 to 100 mg mL⁻¹ by the engorged females immersion test. To evaluate larval mortality, a larval packet test (LPT) was performed at concentrations of 10 to 100 mg mL⁻¹. The EE at concentrations of 75 and 100 mg mL⁻¹ significantly reduced posture capacity, which did not occur for EA. There was no reduction in larvae hatchability for any of the evaluated extracts. The EE performed acaricidal efficacy in engorged females from 14.93 to 40.79%. EA and EE larvicidal effect was 82.89 and 91.21%, respectively, and the LC90 was estimated in 226.1 mg mL⁻¹ for EA and 159.3 mg mL⁻¹ for EE. *M. urundeuva* leaf extracts showed potential for in vitro tick control and future studies should be carried out to evaluate their possible toxic effects and in vivo efficacy.

KEYWORDS: Bovine tick. Acaricide resistance. *Myracrodruon urundeuva*. Reproductive efficiency. Larval mortality.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por ceder as instalações dos Laboratórios de Parasitologia e Ecologia Microbiana para a realização do estudo. Agradecem também ao setor de bovinocultura do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG por fornecer os carrapatos que foram utilizados nos testes. Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) para execução das atividades de pesquisa.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira é um ramo da atividade agropecuária que apresenta elevada importância econômica e social no Brasil e no mundo. Segundo a FAO, a produção anual de leite em 2020 atingiu 887 bilhões de toneladas de leite, sendo o Brasil o quinto maior produtor neste ano. Quanto a essa produção nacional, dados do IBGE revelam estabilidade nos últimos anos, atingindo 35,3 bilhões de litros em 2020 e 2021.

Endo e ectoparasitos representam um grande desafio sanitário em propriedades leiteiras. Dentre esses agentes, *Rhipicephalus microplus* representa o principal carrapato que compromete a produtividade dos rebanhos em regiões tropicais (Molento 2020). Estações do ano com períodos de calor e umidade, associadas aos sistemas de criação extensivos ou semiextensivos, favorecem o ciclo de vida do carrapato (Vaz Júnior et al 2012). Esse ectoparasito debilita os bovinos devido à intensa hematofagia e atuam como vetores de hemoparasitas, o que intensifica os quadros de anemia (Molento 2020). Adicionalmente, causam lesões no couro e elevam os custos com medicamentos e descarte do leite contendo resíduos de acaricidas (Grisi et al 2014).

Em relação ao controle químico desse carrapato, a alta frequência de utilização de carrapaticidas representa um grande desafio, pois favorece a seleção de populações resistentes aos principais fármacos disponíveis (Abbas et al 2014). Dzemo et al (2022) observaram desenvolvimento de resistência a acaricidas em 66,2% de 3.391 populações de *R. microplus* avaliadas em vários países. Essa resistência ocorreu a diversos compostos acaricidas, predominantemente cipermetrina, deltametrina, flumetrina, diazinon, amitraz, fipronil e ivermectina. No Brasil, a EMBRAPA (2020) relatou sobre a alta resistência em testes realizados por um período de 20 anos, com carrapaticidas do grupo dos piretroides apresentando eficácia abaixo de 20%, amidinas entre 40 e 50% e organofosforados em torno de 75%. Nesse levantamento associações compostas por organofosforados e piretroides apresentaram médias entre 30 e 99%, compondo os produtos que apresentaram melhores resultados.

Estudos demonstram o uso de métodos alternativos do controle desse parasito como o uso de fungos, plantas, predadores naturais, catação manual em pequenos rebanhos e seleção genética para uso de cruzamentos e raças mais resistentes (Gasparin et al 2007, Veríssimo 2013, Rodriguez-Vivaz et al 2018).

A árvore *Myracrodruon urundeuva* (Allemão), popularmente conhecida como aroeira ou aroeira-do-sertão (Figura 1), pertencente à família Anacardiaceae, é uma planta comum na região semiárida do Brasil e possui relevante importância econômica e social nas regiões onde abrange. Sua casca é usada para tingir tecidos, a madeira para os ramos civil e de marcenaria e diversas partes são usadas para fins medicinais (Vieira et al 2018).

Essa espécie tem sido pesquisada por apresentar compostos em seu cerne, casca, folhas e frutos que com efeitos antibacterianos, antivirais, anti-inflamatórios e larvicida (Napoleão et al 2012, Mota et al 2015, Araújo et al 2017). Contudo, poucos estudos evidenciam os efeitos dessa planta sobre o controle de carrapatos. Oiano Neto et al (2017) testaram 22 extratos de

plantas sobre a capacidade de postura de teleóginas de *R. microplus*. Dentre eles, fêmeas submetidas ao extrato de folhas de *M. urundeuva* apresentaram redução de 89% da capacidade de postura em relação ao controle negativo.

Neste estudo os objetivos foram avaliar os efeitos dos extratos de folhas de *M. urundeuva* sobre a atividade reprodutiva de teleóginas e mortalidade de larvas de *R. microplus*.



Figura 1. Árvore de *Myracrodruon urundeuva* (Arquivo pessoal)

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e registrado sob o protocolo: 265/2017.

2.1 Obtenção e preparo das folhas de *Myracrodruon urundeuva*

Foram coletadas folhas maduras de *M. urundeuva* na zona rural do município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil (16°30'34.8"S 43°55'09.4"W). O material foi identificado por comparação entre as características morfológicas e partes representativas das espécies depositadas no acervo do Herbário Norte Mineiro e foi registrado com o código MCCA 5690.

As folhas de *M. urundeuva* foram lavadas em água corrente, avaliadas quanto à integridade e aquelas com lesões foram descartadas. Posteriormente, foram desidratadas em estufa de circulação forçada de ar (TE 394/4, Tecnal Equipamentos Técnico Científicos, Piracicaba, Brasil) a 38°C por 72 horas e trituradas em liquidificador industrial, obtendo-se um pó seco que foi armazenado em sacos de papel em temperatura ambiente (± 24 °C) até o uso.

2.2 Obtenção dos extratos aquoso e etanólico

Para o preparo do extrato aquoso (EA), 100 g do pó das folhas de *M. urundeuva* foram misturados em 1000 mL de água destilada. A mistura foi mantida em banho-maria a 40°C por 60 minutos. Após esse período, foi filtrada em funil com gaze e algodão, alocada em placas de Petri e desidratada em estufa de circulação forçada de ar a 40 ± 5 °C por três dias. O extrato desidratado foi raspado e três sub amostras foram analisadas em um determinador de umidade (MOC 63U, Shimadzu, Filipinas) para cálculo das concentrações a serem testadas. O extrato apresentou 90,46% de matéria seca (MS) e foi armazenado em tubo escuro e mantido em refrigeração a ± 4 °C até o momento do uso.

Para produção do extrato etanólico (EE), foram adicionadas 100g do pó das folhas de *M. urundeuva* em 1000 mL de álcool etílico absoluto PA 99,5°GL e a mistura foi mantida em temperatura ambiente a ± 24 °C, protegido da luz por sete dias. Posteriormente o extrato foi filtrado e desidratado nas mesmas condições descritas para o EA e apresentou 88,14% de MS.

2.3 População de *Rhipicephalus microplus* avaliada

Os carrapatos utilizados foram provenientes de bovinos leiteiros criados em sistema confinado no período seco e a pastejo no período chuvoso no setor de bovinocultura de leite do ICA. As coletas foram realizadas em animais Girolando, $\frac{3}{4}$ de sangue Holandês, no município de Montes Claros – MG, que não receberam tratamento carrapaticida por um período de 60 dias antes da coleta.

2.4 Teste de imersão de teleóginas

Foi realizado teste de biocarrapaticidograma conforme metodologia proposta por Drummond et al (1973). Cada extrato foi diluído em água destilada com adição de tween 80 a 5% (v/v) para obtenção de soluções nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 mg mL⁻¹. Foi avaliado o controle químico com o acaricida comercial composto pela associação cipermetrina a 150 mg mL⁻¹, clorpirifós a 250 mg mL⁻¹ e citronelal a 10 mg mL⁻¹ (Colosso Pulverização, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) diluído conforme recomendações do fabricante. Esse carrapaticida era o já utilizado na propriedade rural de origem dos carrapatos. Os tratamentos foram comparados com o controle contendo somente água destilada e o controle contendo água destilada e tween 80 a 5%.

As teleóginas foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha e distribuídas em grupos homogêneos. Cada grupo contou com quatro repetições e cada repetição continha cinco teleóginas que foram alocadas em placas de Petri após pesagem em balança analítica.

Os grupos de teleóginas foram submersas por cinco minutos em 5 mL das soluções dos seus referidos produtos. Após esse período, foram secas em papel toalha e incubadas em estufa a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa próxima a 80% por 15 dias para avaliar a capacidade de postura (CP). Ao décimo quinto dia foi mensurado o peso das massas de ovos em balança analítica. As posturas foram acondicionadas em seringas descartáveis vedadas com algodão hidrofílico e incubadas sob as mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente, durante 21 dias.

A avaliação da eclodibilidade (EC) foi realizada conforme metodologia proposta por Figueiredo et al (2019) com adaptações. Foi adicionada solução de água e detergente neutro na proporção 1:1 às seringas contendo larvas e ovos. Após homogeneização, cinco alíquotas de 200 μL da suspensão foram analisadas em lâminas em microscópio óptico em objetiva de 4X para contagem de larvas e ovos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros, descritos por Bennett (1974) e Drummond et al (1973): CP, EC, eficiência reprodutiva (ER) e eficácia do produto (EP), sendo calculados a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{CP} = (\text{peso dos ovos} / \text{peso das teleóginas}) \times 100$$

$$\text{EC} = \text{n}^\circ \text{ de larvas} / (\text{n}^\circ \text{ ovos} + \text{n}^\circ \text{ de larvas})$$

$$\text{ER} = (\text{peso dos ovos} \times \text{EC} \times 20.000) / \text{peso das teleóginas}$$

$$\text{EP} = ((\text{ER do grupo controle} - \text{ER do grupo tratado}) / \text{ER do grupo controle}) \times 100$$

2.5 Teste do pacote de larvas

Após 21 dias do início da eclosão, foi realizado teste de pacote de larvas (TPL) conforme metodologia proposta por Stone e Haydock (1962) com modificações. Foram confeccionados pacotes com papel filtro (Whatmann nº 1) na dimensão de 6 x 6 cm, vedados nas laterais, sendo mantida uma lateral aberta para inserção das larvas. Para cada grupo foram realizadas quatro repetições contendo aproximadamente 100 larvas em cada repetição.

As larvas foram inseridas nos pacotes com o auxílio de um pincel, os pacotes foram vedados com grampos e banhados com 400 μL de cada solução definida. Foram avaliados os EA e EE nas concentrações 100, 75, 50, 25 e 10 mg mL^{-1} , grupo químico com associação cipermetrina a 150 mg mL^{-1} , clorpirifós a 250 mg mL^{-1} e citronelal a 10 mg mL^{-1} (Colosso Pulverização, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil), controle com água destilada com tween 80 a 5%. Os pacotes de cada grupo foram alocados em placas de Petri e incubados nas mesmas condições descritas para as teleóginas por 24h e a quantificação de larvas vivas e mortas foi realizada sobre papel branco.

2.6 Análise estatística

Os testes foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e foram analisados os seguintes parâmetros biológicos: CP, EC, ER, EP para os experimentos com as teleóginas e mortalidade e concentrações letais para matar 90% de larvas (CL_{90}) para os experimentos com as larvas. Os dados foram avaliados em análise de variância (ANOVA) entre os grupos tratados

com fármaco, extratos e controle e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As CL₉₀ foram estimadas pela análise de regressão probit. Utilizou-se o pacote estatístico SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007).

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos dos extratos de *M. urundeuva* sobre a atividade reprodutiva das teleóginas

O EA apresentou eficácia acaricida entre 19,49 e 25,91 % nas concentrações de 25 a 100 mg mL⁻¹ (Tabela 1, p < 0,05). Contudo as concentrações não promoveram redução significativa da CP e EC quando comparadas aos controles contendo água e água com tween 80 a 5%. O tratamento com o acaricida químico promoveu redução significativa na CP das teleóginas, porém não reduziu a EC.

Tabela 1 Efeito do extrato aquoso de *Myracrodruon urundeuva* sobre a eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Tratamento / Concentração (mg mL ⁻¹)	Capacidade de Postura (%)*		Eclodibilidade (%)		Eficiência do Produto (%)**	
	Média	dp ^b	Média	dp	Média	dp
100	40,22 b	3,17	87,57 a	4,06	25,91 b	9,01
75	49,97 b	2,29	85,72 a	3,34	10,19 c	5,68
50	44,15 b	6,56	87,30 a	5,22	19,49 b	10,76
25	43,67 b	3,47	85,83 a	5,85	21,08 b	11,03
Controle positivo ^a	27,01 a	12,46	81,32 a	17,94	57,08 a	19,16
H ₂ O + tween 80	49,88 b	4,93	95,77 a	3,25	-	-
Controle H ₂ O	49,66 b	7,72	95,53 a	1,07	-	-

^a Controle positivo: cipermetrina, clorpirifós e citronelal

^b Desvio padrão

*Capacidade de postura (CP) = (peso da massa de ovos/ peso inicial das fêmeas) X 100

**Eficiência do Produto (EP) = (Eficiência Reprodutiva Controle (Tween 80) - Eficiência Reprodutiva Produto / Eficiência Reprodutiva Controle (Tween 80)) X 100

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna são estatisticamente semelhantes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O EE nas concentrações de 75 e 100 mg mL⁻¹ reduziu a CP das teleóginas quando comparado aos controles negativos, resultado estatisticamente similar ao controle químico. Entretanto, não houve diferença significativa da EC entre as concentrações avaliadas para esse extrato. A EP do EE variou entre 14,93 e 40,79%, mas concentrações ≥75 mg mL⁻¹ apresentaram maior EP, similar ao controle químico (Tabela 2, p < 0,05).

Tabela 2 Efeito do extrato etanólico de *Myracrodruon urundeuva* sobre a eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Tratamento / Concentração (mg mL ⁻¹)	Capacidade de Postura (%)*		Eclodibilidade (%)		Eficiência do Produto (%)**	
	Média	dp ^b	Média	dp	Média	dp
100	33,07 a	4,33	86,51 a	7,19	40,79 a	2,08
75	35,29 a	5,75	90,32 a	6,16	33,25 a	11,47
50	46,59 b	1,12	86,85 a	11,41	14,93 b	12,52
25	43,64 b	9,29	90,63 a	6,52	17,84 b	18,22
Controle positivo ^a	27,01 a	12,46	81,32 a	17,94	57,08 a	19,16
H ₂ O + Tween 80	49,88 b	4,93	95,77 a	3,25	-	-
Controle H ₂ O	49,66 b	7,72	95,53 a	1,07	-	-

^a Controle positivo: cipermetrina, clorpirifós e citrônella

^b Desvio padrão

*Capacidade de postura (CP) = (peso da massa de ovos/ peso inicial das fêmeas) X 100

**Eficiência do Produto (EP) = (Eficiência Reprodutiva Controle (Tween 80) - Eficiência Reprodutiva Produto / Eficiência Reprodutiva Controle (Tween 80)) X 100

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna são estatisticamente semelhantes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.2 Mortalidade de larvas

A taxa de mortalidade de larvas não variou entre os tipos de extratos avaliados ($p = 0,04$). O EA e o EE promoveram taxas de mortalidade de larvas entre 35,7 a 82,89% e 35,94 a 91,21%, respectivamente. Para o EA, as concentrações 50, 75 e 100 mg mL⁻¹ apresentaram maiores taxas de mortalidade de larvas quando comparadas ao controle contendo água e tween 80 a 5%. Em relação ao EE a concentração de 50 mg mL⁻¹ apresentou maior taxa de mortalidade, sendo similar produto químico testado (Tabela 3, $p < 0,05$). As CL₉₀ foram 226,1 mg mL⁻¹ (IC = 179,5 - 303,2) e 159,3 mg mL⁻¹ (IC = 128,0 - 211,1) para o EA e EE, respectivamente (Figuras 2 e 3).

Tabela 3 Mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com extratos de *Myracrodruon urundeuva*.

Tratamento / Concentração (mg mL ⁻¹)	Extrato Aquoso (%)		Extrato Etanólico (%)	
	Média	dp ^b	Média	dp
100	74,03 a	15,74	81,32 b	9,49
75	74,94 a	24,84	70,16 b	5,77
50	82,89 a	7,39	91,21 a	3,75
25	42,86 b	23,54	73,16 b	11,20
10	35,70 b	19,30	35,94 c	4,32
Controle positivo ^a	100,00 a	0	100,0 a	0
Controle H ₂ O + Tween 80	21,12 b	3,47	21,12 d	3,47

^a Controle positivo: cipermetrina, clorpirifós e citrônella

^b Desvio padrão

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna são estatisticamente semelhantes pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

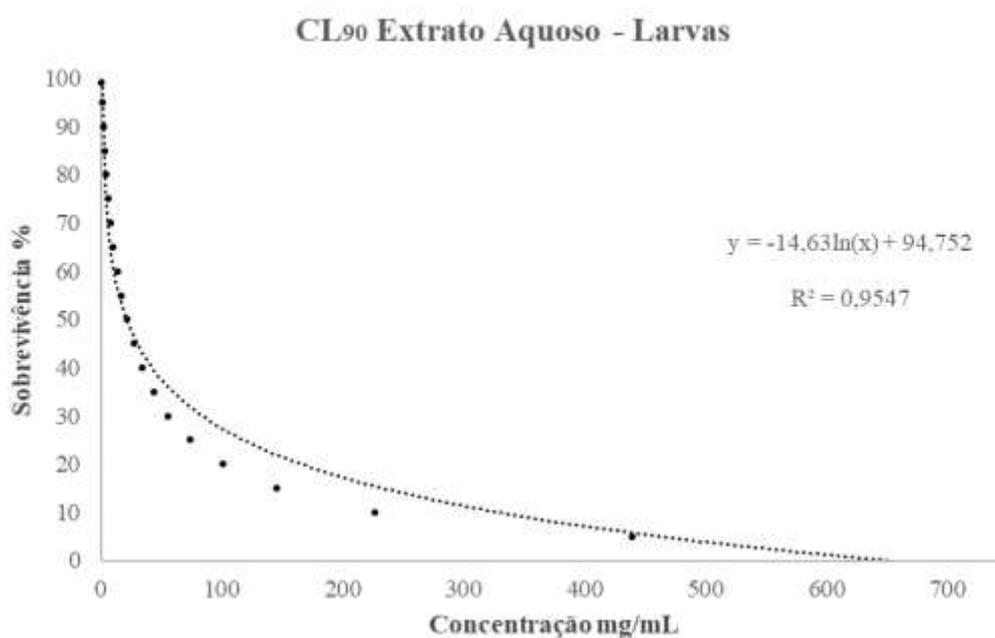


Figura 2. Mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* em função da concentração do extrato aquoso de folhas de *Myracrodruon urundeuva*

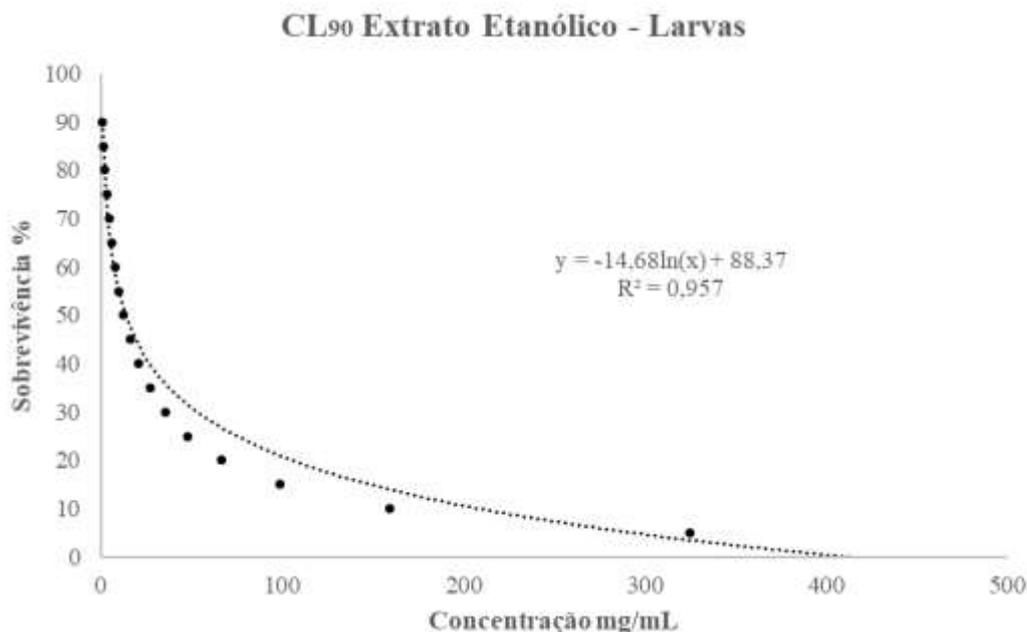


Figura 3. Mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* em função da concentração do extrato etanólico de folhas de *Myracrodruon urundeuva*

4 DISCUSSÕES

A cepa de carrapato avaliada apresentou baixa susceptibilidade ao acaricida comercial testado, o que indica baixa eficácia em relação à recomendação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para essa classe de agroquímico (Brasil 2012).

O EE a 75 e 100 mg mL⁻¹ foi efetivo para reduzir a CP das teleóginas, o que pode estar relacionado com a presença de lectinas nas folhas da *M. urundeuva* como relatado por Napoleão et al (2013) em estudos sobre a ação de extrato de *M. urundeuva* na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e apresentam efeito inseticida (Lam et al 2011). Napoleão et al (2013) observaram que extratos de *M. urundeuva* são ricos em proteínas, dentre elas as lectinas, e essas proteínas resistem às proteases intestinais das larvas de *A. aegypti* e interferem nas atividades enzimáticas no intestino dessas larvas. Os efeitos de redução na CP observados podem estar relacionados à ação de lectinas sobre o intestino das teleóginas e comprometimento da produção dos ovos. Contudo, no presente estudo a ineficácia dos extratos para reduzir a EC mostra que esses podem não apresentar efeito residual sobre os ovos.

O EE foi mais efetivo para redução da atividade reprodutiva das teleóginas na concentração de 100 mg mL⁻¹ em relação ao EA. Veber et al (2015) demonstraram maior eficácia de extratos hidroetanólicos a 50% na extração de compostos fenólicos de diferentes partes vegetais de *Syzygium cumini* Lamarck (Jambolão) quando comparados a extratos aquosos. Além disso, carrapatos adultos possuem camada de cera na composição do exoesqueleto (Odhiambo e Galun 1982) e o uso de solventes foi sugerido por Chagas et al (2002) para aumento da eficácia dos produtos testados por ampliar a área de ação, distribuindo os compostos por toda a cutícula

dos carrapatos. Santos et al (2013) recomendam o uso de 20% de solvente na solução de imersão de teleóginas e larvas com extratos de diversas plantas. Apesar do não uso de solventes neste experimento, o EE pode ter se mostrado mais eficaz quando comparado à extração aquosa como observado devido à extração de maior quantidade de compostos.

Em estudo envolvendo controle de atividade reprodutiva de *R. microplus* e com extrato de aroeira, Oiano-Neto et al (2017) testaram extrato de folhas da planta com acetona:água:tween 80 (50:50:1,9) na concentração a 100 mg mL⁻¹ e observaram 89% de redução na ovoposição em relação ao controle com água destilada.

Extratos de *M. urundeuva* também têm sido avaliados para o controle de *Aedes aegypti*. Sá et al (2009) e Napoleão et al (2012) relataram efeito larvicida de extratos de casca e cerne, e folhas, respectivamente, em larvas em quarto estágio de *A. aegypti* pela presença de lectinas nos extratos. Souza et al (2012) descreveram a atividade larvicida e ovicida do mesmo agente com o uso de extrato de sementes de *M. urundeuva* e isolaram o *m*-pentadecadienil-fenol como principal composto envolvido.

Taninos e flavonoides foram identificados em extratos metanólicos de folhas de *M. urundeuva* por Machado et al (2016). Quesado Júnior et al (2017) corroboraram com esses resultados ao detectar fenóis e flavonoides em extrato etanólico de folhas da planta, com a presença de taninos condensados. Xavier et al (2015) obtiveram 70% de mortalidade de ácaros *Tetranychus bastosi* com o uso de extrato aquoso de *M. urundeuva* a 25% e também relaciona esse resultado à presença de taninos nos extratos da aroeira.

Quanto à mortalidade de larvas, o EA apresentou-se mais efetivo em concentrações \geq 50 mg mL⁻¹, demonstrando maior potencial de efeito do extrato sobre larvas quando comparado às teleóginas. Essa diferença de eficácia dos extratos entre larvas e adultos pode estar relacionada à composição das cutículas dos carrapatos nas diferentes fases, uma vez que a camada lipídica só é formada após as mudanças para a fase de ninfa de *R. microplus* (Odhiambo e Galun 1982). Além disso, as lectinas presentes no extrato também apresentam a capacidade de se ligar à quitina e promover a ação larvicida por deterioração do exoesqueleto (Alves et al 2022).

Estudos realizados com outras espécies da família Anacardiaceae também apresentaram resultados satisfatórios para o controle de carrapatos. Bortolucci et al (2018) verificaram 40% de mortalidade de teleóginas de *R. microplus* e redução de em 97,06% a eclodibilidade com o uso de óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha). Rey-Valeirón et al (2018) observaram 99,3% de mortalidade de larvas de *R. sanguineus* com o uso de óleo essencial de *Schinus molle* L. (aroeira-mole). Na caracterização do óleo essencial foram identificados 21 compostos, entre eles *p*-cimeno (40,0%) limoneno (19,5%), mirceno (7,7%) e canfeno (5,6%).

Os resultados de EP e mortalidade de larvas encontrados e estudos citados indicam a viabilidade no uso de extratos de *M. urundeuva* em programas de controle integrado de *R. microplus* como uma alternativa ao objetivo de redução das populações de cepas multirresistentes aos acaricidas devido ao menor uso de produtos químicos para tratamento dos

rebanhos (Veríssimo e Katiki 2015). Além disso, o uso desses produtos de base biológica auxilia na maior segurança alimentar e preservação ambiental, reduzindo riscos de contaminações e contribuindo para uma produção sustentável (Alves et al 2012).

5 CONCLUSÕES

EE e EA obtidos das folhas de *M. urundeuva* apresentam potencial para o controle de cepa resistente do *R. microplus*. EE é mais eficaz que o EA quanto à redução da atividade reprodutiva das teleóginas e mortalidade larval. Estudos de toxicidade *in vivo* são importantes para estabelecer dosagens e intervalos de aplicação para promover esses extratos como acaricidas alternativos para o controle de *R. microplus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas RZ et al (2014) Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology* 203:6-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Alves RRV et al (2022) *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin damages exochorionic cells and binds to the serosal cuticle of *Aedes aegypti* eggs. *3 Biotech* 12:1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03172-9>
- Alves WV et al (2012) Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável. *Revista Brasileira De Agropecuária Sustentável* 2(2). <https://doi.org/10.21206/rbas.v2i2.162>
- Araújo IDR et al (2017) Chemical composition and evaluation of the antibacterial and cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17:419. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1918-6>
- Bennett GF (1974) Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia* 16:52–61.
- Bortolucci WC et al (2018) Acaricidal and larvicidal activity of leaves and fractions of rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae) essential oil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Australian Journal of Crop Science*, 12(10):1645–1652. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.071295452850460>
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 401 p., 2012.
- Chagas ACS et al (2002) Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Braz J Vet Res Anim Sci* 39(5):247–253
- Drummond RO et al (1973) *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. *Journal of Economic Entomology* 66:130–133. <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>
- Dzemo WD, Thekiso O, Vudriko P (2022) Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon* 8(1):1-16. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08718>
- EMBRAPA. Anuário do Leite 2020. Disponível em: embrapa.br/gado-de-leite. Acesso em: 02 dez. 2020.
- FAO. 2022. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc2211en>
- Figueiredo JCG et al (2019) Effects of leaf extracts of *Protium spruceanum* against adult and larval *Rhipicephalus microplus*. *Experimental and Applied Acarology* 79:447-458. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00447-4>

- Gasparin G et al (2007) Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Animal Genetics* 38:453-459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01634.x>
- Gomes FS. (2009) Lectinas de cerne e entrecasca de *Myracrodruon urundeuva*: atividade antimicrobiana e larvicida sobre *Aedes aegypti*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- Grisi L et al (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 23:150-156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2021, Rio de Janeiro, v.49, p.1-12, 2022.
- Lam SK, Ng TB (2011) Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:45–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2892-9>
- Machado AC et al (2016) “Aroeira” (*Myracrodruon urundeuva*) methanol extract: the relationship between chemical compounds and cellular effects. *Pharmaceutical Biology* 54(11):2737-2741. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1182555>
- Molento MB (2020) Avaliação seletiva de bovinos para controle do *Rhipicephalus microplus*. *ARS Veterinária* 36:01-02. <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2020v36n1p01-02>
- Mota BCF et al. (2015). Comparative studies between the chemical constituents and biological properties of the extracts from the leaves and barks of *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão. *Journal of Medicinal Plants Research* 9(6): 159-168. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5513>
- Napoleão TH et al (2012) Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research* 110:609–616. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2529-7>
- Napoleão TH et al (2013) Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 54:26-33. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2013.04.002>.
- Odhiambo TR, Galun R. (1982) Current themes in tropical science: Vol. 1. Physiology of ticks. Oxford: Pergamon.
- Oiano-Neto J et al. (2017) Plant crude extracts inhibit oviposition of bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Encontro Brasileiro De Ecologia Química, 10, 2017, São Carlos, SP.
- Quesado Junior S et al (2017) Free radical scavenging activity of ethanol leaves extracts of Anacardiaceae. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 38:99-104. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2017v38n1p99>
- Rey-Valeirón C et al (2018) Acaricidal effect of *Schinus molle* (Anacardiaceae) essential oil on unengorged larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 76:399–411. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0303-6>
- Rodriguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C (2018) Strategies for the control of *Rhipicephalus*

- microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. Parasitology Research 117:3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- Sá RA et al (2009) Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 149:300-306. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.004>
- SAEG, Sistema para Análises Estatísticas, 2007. Versão 9.1. Fundação Arthur Bernardes, UFV, Viçosa.
- Santos LB et al (2013). Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasit. Vet. 22(4):532-538. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400013>
- Souza TM et al (2012) Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. Pest management science 68:1380-1384. <https://doi.org/10.1002/ps.3316>
- Stone BF, Haydock KP (1962) A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus*. Bulletin of Entomological Research 53:563-578. <https://doi.org/10.1017/S000748530004832X>
- Vaz Junior IS et al (2012) Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. INCT-EM 01-27.
- Veber J et al (2015) Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 17:267-273 https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_181
- Veríssimo CJ (2013) Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP 11:14-23. <https://doi.org/10.36440/recmvz.v11i1.5370>
- Veríssimo CJ & Katiki LM (2015) Alternativas de controle do carrapato-do-boi na pecuária leiteira. Resistência e Controle do Carrapato-do-boi. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 113p.
- VIEIRA RF et al (2018) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste. Brasília, DF: MMA, 1162 p. (Série Biodiversidade, 44).
- Xavier MVA et al (2015) Toxicidade e repelência de extratos de plantas da caatinga sobre *Tetranychus bastosi* Tutler, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) em pinhão-manso. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 17:790-797. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_063

DECLARAÇÕES

Financiamento Os autores declaram que nenhum financiamento, subsídio ou outro tipo de apoio foi recebido durante a preparação deste artigo.

Declaração de interesses Os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes para divulgar.

Contribuições dos autores Todos os autores contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. A preparação do material, a coleta e a análise dos dados foram realizadas com a participação de todos os autores. Todos os autores leram e aprovaram o artigo final.

Aprovação ética O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA - UFMG) e registrado sob o protocolo: 265/2017.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carrapato bovino representa grandes desafios à saúde e produtividade dos rebanhos leiteiros, bem como à rentabilidade dos produtores e segurança alimentar dos consumidores. O controle desse ectoparasito tem sido comprometido devido à seleção de cepas multirresistentes aos acaricidas químicos.

Extratos de *R. mucilaginosa* e de folhas de *M. urundeuva* apresentaram potencial de controle do carrapato. O desenvolvimento de novos estudos em relação às concentrações, veículos e diluentes, toxicidade e resposta *in vivo* do uso desses produtos são necessários para garantir de forma efetiva o uso desses extratos no controle alternativo de *R. microplus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R. Z. *et al.* Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 6-20, 2014.

ABDALA, L. *et al.* Biochemical traits useful for the determination of genetic variation in a natural population of *Myracrodruon urundeuva*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 909-916, 2002.

ABRÃO, F. O. *et al.* Characterization of Fungi from Ruminal Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, p. 649–659, 2014.

AGWUNOBI, D. O.; YU, Z; LIU, J. A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 173, p. 104776, 2021.

AHID, S. M. M. **Apostila Didática em Entomologia Veterinária**. Mossoró, RN: UFERSA, 2010. 80 f.

ALVES, W. V.; LORENZETTI, E. R.; GONÇALVES, F. C. Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável. **Revista Brasileira De Agropecuária Sustentável**, v. 2, n. 2, 2012.

ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p.

ANWAR, W. *et al.* First record of *Trichoderma longibrachiatum* as entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* in Pakistan. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 28, n. 2, p. 287-294, 2016.

ASHRAF, S. S. *et al.* Fabrication and characterization of biaxially electrospun collagen/alginate nanofibers, improved with *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16 produced exopolysaccharides for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 196, p. 194-203, 2022.

BERNARDO, C. C. **Conídios e blastosporos de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana*: virulência para *Rhipicephalus microplus* e resposta ao calor e à radiação UV-B**. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

BERNARDO, J. T. *et al.* Isolamento *on farm* de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. **Revista Eletrônica Científica Da UERGS**, v. 5, n. 3, p. 263-270, 2019.

BFG (The Brazil Flora Group) 2021. **Flora do Brasil 2020**. 1-28 pp. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BIEGELMEYER, P. *et al.* Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. **Revista Archivos de Zootecnia**, v. 61, p. 1-11, 2012.

BORGES, D. F. **Efeito nematicida de extratos de plantas do Cerrado e óleos essenciais**. 2017. 37 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, 2017.

BRITO, L. F. *et al.* Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. **Animal**, v. 15, p. 100292, 2021.

CAMARGO, M. G. *et al.* *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42, 2016.

CAMARGO, S. A. B.; SEVERO, T. H.; VIDAL, M. B. Controle biológico do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por aves encontradas no bioma Pampa. **ANAIS CONGREGA MIC-ISBN 978-65-86471-05-2**, p. 53, 2017.

COIMBRA, E. C. **Avaliação do uso de células da levedura *Pichia pastoris* para expressão do gene L1 do Papilomavírus Humano tipo 16**. 2007. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

CONCEIÇÃO, G. M. *et al.* Plantas do Cerrado: Comercialização, Uso e Indicação Terapêutica Fornecida pelos Raizeiros e Vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2012.

DOUPHRATE, D. I. *et al.* The dairy industry: a brief description of production practices, trends, and farm characteristics around the world. **Journal of agromedicine**, v. 18, n. 3, p. 187-197, 2013.

DZEMO, W. D.; THEKISOE, O.; VUDRIKO, P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. **Heliyon**, p. e08718, 2022.

FAO. 2022. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022**. Rome.

FERNANDES, E. 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.

FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M. *et al.* Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 1, 2010.

FRANÇA, G. S. *et al.* Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, p. 451-459, 2015.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Juiz de Fora, MG: CNPGL-EMBRAPA, 2000, 25 p. (Boletim Técnico 59).

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Conhecimento básico para o controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Ed). **Carrapato: Problemas e soluções**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, p. 9-20, 2005.

GASPARIN, G. *et al.* Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v. 38, n. 5, p. 453-459, 2007.

GERAGE, J. M.; MEIRA, A. P. G.; SILVA, M. V. Food and nutrition security: pesticide residues in food. **Nutrire**, v. 42, n. 3, 2017.

GHOSH, S. *et al.* In vitro acaricidal properties of *Semecarpus anacardium* fruit and *Datura stramonium* leaf extracts against acaricide susceptible (IVRI-I line) and resistant (IVRI-V line) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 69-74, 2015.

GONÇALVES, V. M.; HUERTA, M.; FREITAG, R. A. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 14-22, 2016.

GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

HIGA, L. O. S *et al.* Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 326-333, 2015.

HUANG, X. *et al.* *Aspergillus terreus* as an industrial filamentous fungus for pharmaceutical biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 273-280, 2021.

IBGE. **Biomass e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250.000**. Rio de Janeiro, RJ, v. 45, 168 p, 2019.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2021**, Rio de Janeiro, RJ, v.49, p.1-12, 2022.

JI, Y. *et al.* Effects of Bovine *Pichia kudriavzevii* T7, *Candida glabrata* B14, and *Lactobacillus plantarum* Y9 on Milk Production, Quality and Digestive Tract Microbiome in Dairy Cows. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 842, 2022.

JONES, G. A. **Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

KLAFKE, G. *et al.* Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2017.

KNOWLES, C. O. Mechanisms of Resistance to Acaricides. In: SJUT, V. (Ed) **Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals. Chemistry of Plant Protection**, Berlin: Springer, v. 13, 1997.

KOHLER, T. R. **Leveduras: controle biológico de antracnose em soja e sensibilidade à fungicidas**. 2022. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2022.

KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 74, n. 1, p. 1-29, 2013.

LATA, P. *et al.* In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 132, 2022.

LIMA, S. M. **Potencial biotecnológico de leveduras provenientes do rúmen visando a adição em dietas de ruminantes**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2017.

MAMEDE, J. S. S.; PASA, M. C. Diversidade e uso de plantas do Cerrado na comunidade São Miguel, Várzea Grande, MT, Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 20, p. 1087-1098, 2019.

MARTINS, I. V. F. M. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Vitória, ES: EDUFES, 2019. 320 p.

MEYER, M. C. *et al.* **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 538 p.

MOLENTO, M. B. Avaliação seletiva de bovinos para controle do *Rhipicephalus microplus*. **ARS Veterinária**, v. 36, p. 01-02, 2020.

NAPOLEÃO, T. H. *et al.* Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609–616, 2012.

NARI, A.; HANSEN, J. W. Resistance of ecto-and endoparasites: current and future solutions. 67th General Session. **International Committee, OIE, Paris**, 1999.

NETO, C. C. B. *et al.* Controle biológico de carrapatos - Uma alternativa ao uso de carrapaticidas em pequenas propriedades. **Anais da Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI)-e-ISSN 2316-7165**, v. 1, n. 13, 2020.

NOGUEIRA, M. R. S. *et al.* In vitro efficacy of two commercial products of *Metarhizium anisopliae* s.l. for controlling the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 1-8, 2020.

OIANO-NETO, J. *et al.* "Plant crude extracts inhibit oviposition of bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." In: **ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOLOGIA QUÍMICA**, 10., 2017, São Carlos, SP., 2017.

PAULO, B. S.; SIGRIST, R.; OLIVEIRA, L. G. Avanços Recentes em Biossíntese Combinatória de Policetídeos: Perspectivas e Desafios. **Química Nova**, v. 42, p. 71-83, 2019.

PEÑA, D. A. *et al.* Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. **Metabolic engineering**, v. 50, p. 2-15, 2018.

PEREIRA, A. A. **Aspectos ecológicos de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARINA: IXODIDAE) no município de Franca, nordeste de São Paulo**. 2008. 106 f. Tese

(Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.

PEREIRA, C. D. **Carrapato dos bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 30p.

PÉTER, G.; TAKASHIMA, M.; ČADEŽ, N. Yeast Habitats: Different but Global. In: BUZZINI, P.; LACHANCE, M. A.; YURKOV, A. (Eds) **Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology**. Springer, 2017.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RAMOS, D. M. B. *et al.* Inibição *in vitro* de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, p. 397-402, 2010.

RESENDE, N. F. M.; BARROS, R. A. O uso da galinha como controle biológico do carrapato. **Revista de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 4, n. 2, 2015.

REY-VALEIRÓN C. *et al.* Acaricidal effect of *Schinus molle* (Anacardiaceae) essential oil on unengorged larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 76, p. 399–411, 2018.

RIBEIRO, E. E. **Análise fitoquímica de extratos da casca de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae)**. 2018. 56 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

RIVERA, A. P. T. *et al.* Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 4, p. 426-430, 2018.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1570-1572, 2013.

ROSADO-AGUILAR, J. A. *et al.* Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66-76, 2017.

SÁ, R. A. *et al.* Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n.

3, p. 300-306, 2009.

SANTOS, D. S. *et al.* Nanostructured cinnamon oil has the potential to control *Rhipicephalus microplus* ticks on cattle. **Experimental and Applied Acarology**, v. 73, p. 129–138, 2017.

SBARAINI, N. *et al.* Secondary metabolite gene clusters in the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*: genome identification and patterns of expression in a cuticle infection model. **BMC genomics**, v. 17, p. 399-417, 2016.

SCHETTERS, T. *et al.* Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. **Parasites Vectors**, v. 9, n. 105, 2016.

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. 2015. **Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

SILVEIRA, A. *et al.* Effect of cell wall degrading enzymes produced by *Trichoderma asperellum* on cuticle cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biotechnology**, p. S32-S91, 2018.

SIMIONI, C. V. *et al.* Uso de extrato de *Schinus molle* (Anacardiaceae) como alternativa sustentável para o controle larval de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em propriedade de agricultura familiar. **Revista Científica Universitas**, v. 4, n. 2, 2017.

SULIMAN, E. A.; MOHAMMED, Y. O. The activity of *Aspergillus terreus* as entomopathogenic fungi on different stages of *Hyalomma anatolicum* under experimental conditions. **Journal of Entomology**, v. 9, n. 6, p. 343-351, 2012.

SULLIVAN, C. F.; PARKER, B. L.; SKINNER, M. A Review of Commercial *Metarhizium*- and *Beauveria*-Based Biopesticides for the Biological Control of Ticks in the USA. **Insects**, v. 13, n. 3, p. 260, 2022.

VALENTE, P. P. *et al.* In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 113, p. 417–423, 2014.

VAN WIEREN, S. E.; BRAKS, M. A. H.; LAHR, J. Effectiveness and environmental hazards of acaricides applied to large mammals for tick control. In: **Ecology and prevention of Lyme borreliosis**. Wageningen Academic Publishers, 2016. p. 75-89.

VARGAS, G. P. *et al.* Métodos alternativos e sustentáveis de controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. **Revista Liberato**, v. 21, n. 35, p. 27–38, 2020.

VERÍSSIMO, C. J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 1, p. 14-23, 2013.

VIEIRA, R. F; CAMILLO, J.; CORADIN, L. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2018, 1162 p. (Série Biodiversidade, 44).

7 ANEXOS

Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Eficácia in vitro e in vivo de extratos e metabólitos de plantas presentes no Norte de Minas no controle do carrapato bovinos", protocolo do CEUA: 265/2017 sob a responsabilidade de Eduardo Robson Duarte que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/08/2022.

Vigência da Autorização	23/10/2022 a 22/10/2024
Prorrogação de Vigência da Autorização	23/10/2022 a 22/10/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Bovino / Holandesas
Nº de animais	12
Peso/idade	500kg / 5(anos)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda ICA/UFMG
*Espécie/linhagem	Bovino / Girolando
Nº de animais	72
Peso/idade	120kg / 6(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda ICA/UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Bovino / Girolando
Nº de animais	72
Idade	6(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda ICA/UFMG
*Espécie/linhagem	Bovino / Holandesas
Nº de animais	12
Idade	5(anos)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda ICA/UFMG

Considerações posteriores:

29/08/2022	Pedido de Prorrogação de Certificado Aprovado na reunião do dia 29/08/2022.
23/10/2017	Aprovado na reunião do dia 23/10/2017. Validade:

23/10/2017 à 22/10/2022

Belo Horizonte, 15/11/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br