



**Caracterização Morfológica e Molecular de Ácaros da Família Macrochelidae (Acari: Mesostigmata) Encontrados em Estercos de Ruminantes e Avaliação de Potencial Predatório sobre Nematódeos de Interesse Veterinário**

# **INSTITUTO BIOLÓGICO**

## **PÓS-GRADUAÇÃO**

**Caracterização morfológica e molecular de ácaros da família Macrochelidae (Acari: Mesostigamata) encontrados em esterco de ruminantes e avaliação de potencial predatório sobre nematódeos de interesse veterinário**

Karina Araújo dos Anjos

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Melhoria da Qualidade no Processo de Produção Agropecuária

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Cristina Mendes

Co-Orientador (a):

Dra. Tatyana Sacchi Carmona Rodrigueiro

**São Paulo  
2019**

Eu **Karina Araújo dos Anjos**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Karina A. dos Anjos Data 04/06/2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Anjos, Karina Araújo dos.

Caracterização morfológica e molecular de ácaros da família Macrochelidae (Acari: Mesostigmata) encontrados em esterco de ruminantes e avaliação de potencial predatório sobre nematódeos de interesse veterinário. / Karina Araújo dos Anjos. - São Paulo, 2019.

107 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2019D.KA009

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Márcia Cristina Mendes.

Versão do título para o inglês: Morphological and molecular characterization of mites of the Macrochelidae family (Acari: Mesostigmata) found in ruminant dung and evaluation of their predatory potential upon nematodes of veterinary concern.

1. Macrochelidae 2. Nematódeos gastrintestinais 3. Ácaros predadores 4. Espaço interno transcrito 5. Citocromo oxidase I. Anjos, Karina Araújo dos II. Mendes, Márcia Cristina III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

**IB/Bibl./2019/009**

---



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO

**Pós-Graduação**  
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252  
CEP 04014-002 - São Paulo - SP  
secretariapg@biologico.sp.gov.br



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome do candidato:** Karina Araújo dos Anjos

**Título:** Caracterização morfológica e molecular de ácaros da família Macrochelidae (Acari: Mesostigmata) encontrados em esterco de ruminantes e avaliação de potencial predatório sobre nematódeos de interesse veterinário.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Cristina Mendes

**Co-Orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatyana Sacchi Carmona Rodrigueiro

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Melhoria da Qualidade no Processo de Produção Agropecuária

Aprovado em

Banca Examinadora

Assinatura:

\* Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Cristina Mendes

\*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

\*Prof. Dr. Luíz Carlos Roma Junior

\*Instituição: Instituto de Zootecnia, Zootecnia

Assinatura:

\* Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Letícia Henrique de Azevedo

\*Instituição: Esalq/ USP, Departamento de Entomologia e Acarologia

*A Deus minha fortaleza  
A meu Pai Raimundo e minha Mãe Maria pelo  
apoio que sempre me foi fornecido  
A minha irmã que sempre foi um exemplo de perseverança  
Eu dedico este trabalho*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me dado a vida e fé, força para superar os obstáculos presentes em minha vida

À **Maria Araújo dos Anjos**, minha querida e amada mãe, por ser um exemplo de perseverança, força e fé. Agradeço por sempre me sustentar com orações, me ensinando a confiar nos planos de Deus para minha vida e por sempre acreditar em mim. Essa minha realização é graças a você. Te amo imensamente!

Ao **Raimundo Andrade dos Anjos**, meu amado pai, que sempre me ensinou que devemos dar o nosso melhor em tudo e que nenhuma conquista vem sem esforço e dedicação. Obrigada por seu amor, apoio e carinho.

À **Márcia Cristina Mendes**, minha querida orientadora, por aceitar me orientar e por toda sua paciência, compreensão e sabedoria. Obrigada por acreditar e confiar em mim e por todo seu auxílio.

À **Tatyana Sacchi Carmona Rodrigueiro**, minha querida co-orientadora, por tudo que me ensinou, amizade e constante incentivo.

À **Dr<sup>a</sup>. Leticia Henrique Azevedo**, do Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP, por sua prontidão e auxílio na confirmação das espécies de Macrochelidae estudados neste estudo, por aceitar participar desta etapa da minha formação acadêmica.

Ao **Dr. Luíz Carlos Roma Junior**, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios do Instituto de Zootecnia, por aceitar participar desta etapa da minha formação acadêmica.

Ao **Dr. Ricardo Harakava**, do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico (IB) pelo auxílio no sequenciamento das espécies de Macrochelidae estudadas no presente trabalho. Obrigada pelo auxílio, paciência e pelos ensinamentos de sempre!

Ao **Oswaldo José Criste Adorno**, Médico Veterinário da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral EDR de Guaratinguetá – SP, pelo total apoio que me concedeu. Obrigada pela paciência, confiança e ensinamentos.

Ao **Paulo Henrique Sampaio, Fernanda Calvo Duarte e Leonardo L. C. Fiorini**, pela paciência, disposição e dedicação de cada um em me apoiar nas coletas, nas revisões e correções deste trabalho, sou eternamente grata a vocês, assim como as demais meninas do Laboratório de Parasitologia Animal: **Elizabeth Sposito Filha, Sueli Moda de Oliveira e Edna Clara Tucci** por me receberem bem desde o meu primeiro dia. Todos são muito queridos e especiais para mim. Obrigada por fazerem meus dias mais leves, pelas conversas e risadas e por todo carinho, vocês são maravilhosos.

Aos estagiários **Felipe, Isabella, Thaís e Cauany**, por me ajudarem nas triagens do material, manutenção das colônias das moscas e ácaros, pelo apoio nas coletas, paciência e disposição. Obrigada por tudo.

Ao **Instituto Biológico** e todos os **docentes e palestrantes** da pós-graduação, por ensinarem e dividirem conosco seus conhecimentos e suas experiências, foi uma caminhada de novos aprendizados e desafios. Obrigada por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Aos **funcionários da limpeza e porteiros do Instituto Biológico**, por cada bom dia, sorrisos e brincadeiras. Vocês são muito especiais e tornaram meus dias ainda mais felizes. Obrigada por tudo.

À **Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Cristina Rabello Pinto da Fonseca Martins**, do Laboratório Institucional de Sanidade em Aquicultura, pela ajuda na realização das micrografias. Obrigada pelo apoio e estar à disposição.

Aos **alunos da pós-graduação** do Instituto Biológico 2017-2019, pelo companheirismo, amizade e convivência nesses dois anos.

À **Bianca Araújo dos Anjos**, minha querida irmã e melhor amiga. Obrigada pelos conselhos, conversas, brigas, risadas, brincadeiras e por todo apoio que sempre me deu. Obrigada por fazer parte da minha vida e ser um exemplo em tudo. Amo você imensamente.

À **Gabriela Calvacanti de Araújo**, meu pacotinho, que foi um presente que Deus pois em meu caminho. Obrigada por encher minha vida de alegria, que Deus esteja sempre guiando seus passos. Amo você imensamente.

À **Shirley Batista de Araújo Silva**, minha querida amiga e mais nova irmã, uma verdadeira companheira de guerra, que batalhou junto a mim por esta realização em minha vida. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa, pela paciência e companheirismo. Sua amizade é uma dádiva que Deus me ofereceu e que sempre valorizarei.

Ao **Martin Bispo dos Anjos**, meu amado avô, que foi o maior exemplo que tive e terei na minha vida. Obrigada por ter existido e me dado o prazer de ter sido sua neta. Saudades eternas, um dia nos encontraremos.

Ao **Mozart Bispo dos Anjos**, **Noel Andrade dos Anjos** e **Joílson Andrade dos Anjos**, meus amados tios, pelo amor, apoio, carinho e incentivo de todos os dias. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao **Reginaldo da Silva**, meu cunhado e novo irmão, pelo apoio e incentivo que vem me oferecendo. Obrigada por fazer parte dessa família que amo.

À minhas tias **Zilda** e **Zenir**, pelo amor, carinho, apoio e incentivo de todos os dias. Obrigada por estarem presentes sempre e por vibrarem em todas as minhas conquistas. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus filhos de quatro patas: **Ratinha**, **Catatau Jr** e **Maxixe**, por fazerem meus dias mais felizes e por intensificarem meu amor por animais, um amor que nem eu mesma sabia que era tão grande!

E a todos que contribuíram e compartilharam dessa jornada comigo direta ou indiretamente. Muito obrigada!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (Capes) pela concessão da bolsa.



*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”*

*(George Bernard Shaw)*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*(Martin Luther King)*

ANJOS, K. Caracterização morfológica e molecular de ácaros da família Macrochelidae (Acari: Mesostigmata) encontrados em esterco de ruminantes e avaliação de potencial predatório sobre nematódeos de interesse veterinário. 2019. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## RESUMO

Diversas espécies de ácaros são associadas a excrementos de animais, incluindo os Macrochelidae, uma família com grande diversidade de predadores encontrados em diferentes nichos ecológicos, tais como matéria orgânica vegetal e carcaças de animais em decomposição. Esta família abrange cerca de 470 espécies de 24 gêneros identificados morfolologicamente, e pouco mais de 10 tiveram seu DNA sequenciado. Algumas espécies apresentam comportamento forético em besouros e moscas. Seu papel como predadores vem sendo explorado desde a década de 1940, visando o controle de larvas de primeiro ínstar de moscas sinantrópicas e dos animais de produção. Entretanto, seu papel na predação de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais não tem sido explorado. O presente estudo teve como objetivos identificar as espécies de macroquelídeos presentes na região de Guaratinguetá – SP, usando caracteres morfológicos e técnicas moleculares; verificar a sazonalidade das espécies nesta região e sua distribuição na placa de esterco bovino; avaliar a pressão exercida das espécies de macroquelídeos sobre populações de nematódeos gastrintestinais de bovinos, ovinos e equinos. Foram encontradas quatorze espécies de macroquelídeos, sendo duas consideradas como novos registros para o território e uma espécie nova que será futuramente descrita. As análises moleculares confirmaram a identificação morfológica das espécies. O alinhamento dos trechos de DNA sequenciados correspondentes à região do espaçador interno transcrito (ITS I) do rRNA nuclear agrupou monofileticamente a espécie *Holostaspella bifoliata* com as espécies do gênero *Macrocheles*, e o alinhamento dos trechos de DNA sequenciados correspondentes à região da citocromo oxidase I mitocondrial (mtCOI) agrupou a espécie *Glyphtholapis americana* parafileticamente à espécie *Macrocheles mammifer*. A maioria das espécies não apresentou um comportamento sazonal. As espécies *Macrocheles merdarius* e *Macrocheles robustulus* foram as mais frequentes. Com relação às partes do esterco, a distribuição das espécies foi mais evidenciada nas bordas das placas. A espécie *H. bifoliata* foi avaliada quanto ao seu potencial como predadora de larvas de nematódeos gastrintestinais em um modelo de coprocultura. O

percentual de recuperação de larvas infectantes foi significativamente menor nas culturas fecais de bovinos ( $p = 0,048$ ) e de equinos ( $p = 0,037$ ) quando comparadas às respectivas culturas controle. Este achado sugere fortemente que *H. bifoliata* é um predador eficaz de larvas de nematódeos parasitários e pode ser desenvolvido como agente de controle biológico para uso no futuro como parte de um programa de controle integrado.

**Palavras-chave:** Macrochelidae; Nematódeos gastrintestinais; Ácaros predadores; Espaçador interno transcrito; Citocromo oxidase

ANJOS, K. Morphological and molecular characterization of mites of the Macrochelidae family (Acari: Mesostigmata) found in ruminant dung and evaluation of their predatory potential upon nematodes of veterinary concern. 2019. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## ABSTRACT

Several mite species are associated to animal dung, including the Macrochelidae, a family with great diversity of predators found in different ecological niches, such as decomposing vegetal organic matter and animal carcasses. This family comprises about 470 species of 24 genera identified morphologically and fewer than 10 had their DNA sequenced. Some species present foretic behavior on beetles and flies. Their role as predators has been explored since the decade of 1940, aiming to control proliferation of the first instar larvae of sinanthropic and production animals flies. However, their role in the predation of gastrointestinal nematodes infective larvae has not been explored. The current study had the objectives of identifying Macrochelidae species present in the region of Guaratinguetá – SP, using morphological characteristics and molecular techniques; verify the seasonality of species in this region and their distribution in the bovine dung pat; evaluate the pressure exerted by Macrochelidae species on populations of gastrointestinal nematodes from bovines, ovines and equines. Fourteen Macrochelidae species were found, including two which were never reported in Brazil, and a new species which will be described in the future. Molecular analysis confirmed the morphological identification of the species. The multiple alignment of the Internal transcribed spacer (ITS I) region of the nuclear rRNA polycistron sequenced monophyletically grouped the species *Holostaspella bifoliata* with the species of the genus *Macrocheles*, and the multiple alignment of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) region sequenced grouped the species *Glyptholapis americana* paraphyletically to *Macrocheles mammifer*. Most species did not show a seasonal behavior. The species *Macrocheles merdarius* and *Macrocheles robustulus* were the most frequent. Concerning the portions of the dung pat, distribution of species was more evident on the border of the pats. The species *H. bifoliata* was evaluated for its potential as a predator of gastrointestinal nematodes larvae in a coproculture model. The percentile recovery of infective larvae was significantly lower in fecal cultures of cattle ( $p = 0,048$ ) and horses ( $p = 0,037$ ) when compared to the respective control cultures. This finding strongly suggests that *H. bifoliata* is an effective predator of

parasitic nematode larvae and could be developed as a biological control agent to be used in the future as part of an integrated control program.

**Keywords:** Macrochelidae; Gastrointestinal Nematodes; Predatory mites; Internal transcribed spacer; Cytochrome oxidase

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 1

Figura 1 – Caracteres básicos presente na maioria das fêmeas da Família Macrochelidae.....5

Figura 2 – Fase de vida livre do ciclo biológico dos nematódeos gastrintestinais de ruminantes.....10

### Capítulo 2

Figura 1 – Amostras no funil de Berlese-Tullgren para recuperação dos ácaros.....26

Figura 2 – Porcentagem de fêmeas de macroquelídeos recuperadas das coletas no período de março de 2017 a abril de 2018.....30

Figura 3 – Caracteres da espécie *Allogynaspis flechtmani*.....31

Figura 4 – Caracteres da espécie *Glypholaspis americana*.....32

Figura 5 – Caracteres da espécie *Glypholaspis saprophila*.....32

Figura 6 – Caracteres da espécie *Holostaspella bifoliata*.....33

Figura 7 – Caracteres da espécie *Holostaspella* n. sp.....33

Figura 8 – Caracteres da espécie *Macrocheles glaber*.....34

Figura 9 – Caracteres da espécie *Macrocheles insignitus*.....34

Figura 10 – Caracteres da espécie *Macrocheles mammifer*.....34

Figura 11 – Caracteres da espécie *Macrocheles merdarius*.....35

Figura 12 – Caracteres da espécie *Macrocheles muscaedomesticae*.....35

Figura 13 – Caracteres da espécie *Macrocheles peniculatus*.....36

Figura 14 – Caracteres da espécie *Macrocheles robustulus*.....36

Figura 15 – Caracteres da espécie *Macrocheles scutatus*.....37

Figura 16 – Caracteres da espécie *Macrocheles subbadius*.....37

Figura 17 – Árvore filogenética da região ITS II dos macroquelídeos.....40

Figura 18 – Árvore filogenéticas da região ITS dos macrochelídeos.....43

Figura 19 – Árvore filogenética da região COI dos macroquelídeos.....	44
---	----

### Capítulo 3

Figura 1 – Separação de uma placa de esterco bovino.....	56
--	----

Figura 2 – Pesagem da parte úmida do esterco bovino.....	57
--	----

Figura 3 – Distribuição sazonal das espécies de fêmeas de Macrochelidae nas estações Primavera/Verão e Outono/Inverno.....	59
--	----

Figura 4 – Distribuição mensal das espécies de macroquelídeos.....	61
--	----

Figura 5 – Temperatura em °C e Umidade Relativa do Ar (UR) em % - Média Mensal em um Intervalo de Meses para o município de Guaratinguetá dos anos de 2017 e 2018.....	62
--	----

Figura 6 – Aspecto de colonização das espécies de macroquelídeos no centro e borda das 55 placas de fezes bovinas amostrada.....	62
--	----

Figura 7 – Aspecto de colonização dos machos e imaturos de ácaros Macrochelidae no centro e bordas das 55 placas de fezes bovinas.....	63
--	----

### Capítulo 4

Figura 1 – Teste de predação em coprocultura para avaliar a ação de ácaros macroquelídeos sobre populações de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais.....	73
--	----

Figura 2 – Colônia de mosca doméstica.....	75
--	----

Figura 3 – Média (%) de larvas de nematódeos das culturas de fezes ovinas, equinas e bovinas.....	77
---	----

Figura 4 – Recuperação (%) de larvas de nematódeos dos frascos controles e tratados das fezes bovinas.....	78
--	----

Figura 5 – Recuperação (%) de larvas de nematódeos dos frascos controles e tratados das fezes equinas.....	79
--	----

Figura 6 – Recuperação (%) de larvas de nematódeos dos frascos controles e tratados das fezes dos ovinos.....	80
---	----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

Tabela I – Matriz de distâncias genéticas alinhadas aos pares das espécies sequenciadas para região ITS II.....39

Tabela II – Matriz de distâncias genéticas alinhadas aos pares das espécies sequenciadas para região ITS (ITS I, 5.8S, ITSII).....42

Tabela III – Matriz de distâncias genéticas alinhadas aos pares das espécies sequenciadas para região COL.....45

### Capítulo 3

Tabela I – Distribuição dos macroquélídeos de acordo com o mês.....60

Tabela II – Distribuição da frequência das partes do esterco de acordo com cada espécie.....63

### Capítulo 4

Tabela I – Número de *Holostaspella bifoliata* recuperados das fezes de diferentes espécies.....81



**LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES, ABREVIATURAS.**

pb – Par de bases

mM – Milimolar

nM – Nanomolar

μl – Microlitro

ml – Mililitro

cm – centímetro

pH – Potencial hidrogeniônico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PEG – Polietilenoglicol

HCl – Ácido clorídrico

dNTP – Desoxinucleotídio Trifosfato

KCL – Cloreto de Potássio

U/ μL – Unidade por microlitro

Tris – Tris- hidroxiaminometano

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sulfato de amônio

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

min. – Minutos

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico (ribosomal rubonucleic acid)

mtDNA – Ácido nucleico mitocondrial (mitochondrial nucleic acid)

COI – Citocromo oxidase (Cytochrome oxidase)

ITS – Espaçador interno transcrito (Internal transcribed spacer)

ITS II – Espaçador interno transcrito localizado entre os genes 5.8S rDNA e 28S rDNA

ITS I – Espaçador interno transcrito localizado entre os genes 18S rRNA 5.8S rDNA

SP – São Paulo

MS – Mato Grosso do Sul

n° - número

°C – Grau Celsius

UR – Umidade relativa

opg – Contagem de ovos por grama de fezes

L<sub>1</sub> – Larva de primeiro ínstar

L<sub>2</sub> – Larva de segundo ínstar

L<sub>3</sub> – Larva de terceiro ínstar

L<sub>4</sub> – Larva de quarto ínstar

L<sub>5</sub> – Larva de quinto ínstar

ICEA – Instituto do Controle do Espaço Aéreo

Long. – Longitude

Lat. – Latitude

## Sumário

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES, ABREVIATURAS .....	viii
CAPÍTULO 1 .....	1
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	3
1.2.1 Objetivos gerais .....	3
1.2.2 Objetivo específico .....	3
<b>1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
1.3.1 Família Macrochelidae Vitzthum (1930) .....	4
1.3.1.1 Taxonomia e novas abordagens .....	7
1.3.1.2 Habitat e interações .....	8
1.3.2 Nematódeos como parasitos gastrintestinais de ruminantes .....	10
1.3.2.1 Resistência aos anti-helmínticos .....	12
<b>1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	13
CAPÍTULO 2 .....	23
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
2.2.1 Local de coleta .....	25
2.2.2 Triagem do material .....	25
2.2.3 Identificação morfológica da família Macrochelidae .....	26
2.2.4 Extração de DNA .....	27
2.2.5 Amplificação da região ITS II .....	27
2.2.6 Amplificação da região ITS (ITS I, 5.8S e ITS II) .....	28
2.2.7 Amplificação da região COI .....	28
2.2.8 Purificação dos fragmentos de DNA amplificado .....	29
2.2.9 Sequenciamento e alinhamento dos fragmentos de DNA .....	29
<b>2.3 RESULTADOS</b> .....	30

2.3.1 Fauna de ácaros da família Macrochelidae encontrada em esterco bovino no município de Guaratinguetá .....	30
2.3.1.1 Lista das espécies encontradas nas amostras de Guaratinguetá. ....	30
2.3.2 Análises genéticas .....	37
2.3.2.1 Análises da região ITS II.....	38
2.3.2.2 Análise da região ITS (ITS I, 5.8S e ITS II) .....	40
2.3.2.3 Análises da região COI .....	43
<b>2.4 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	54
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	54
<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	55
3.2.1 Período e local de coleta de esterco bovino.....	55
3.2.1.1 Triagem das amostras de esterco bovino.....	55
3.2.1.2 Preparação do material acarológico para identificação .....	57
3.2.2 Análise estatística.....	58
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	58
3.3.1 Sazonalidade das espécies da Família Macrochelidae .....	58
3.3.2 Distribuição das espécies no centro e bordas das placas de fezes bovinas.....	62
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	70
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	70
<b>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	71
4.2.1 Adaptação da técnica de coprocultura para avaliar o efeito da predação de ácaros sobre populações de nematódeos gastrintestinais. ....	71
4.2.2 Recuperação dos ácaros das amostras tratadas.....	73
4.2.3 Coleta de Macrochelidae para estabelecimento de colônias. ....	74
4.2.3.1 Manutenção e criação de <i>Holostaspella bifoliata</i> .....	74
4.2.3.2 Criação de mosca doméstica ( <i>Musca domesticae</i> ) para alimentação dos ácaros macroquelídeos.....	75
4.2.3.3 Coleta e manutenção dos nematódeos gastrintestinais de ruminantes para a manutenção do <i>Holostaspella bifoliata</i> .....	76
4.2.4 Análises estatística .....	76
<b>4.3 RESULTADOS</b> .....	76

4.3.1 Resultados obtidos da recuperação de larvas de nematódeos .....	77
4.3.2 Recuperação dos <i>Holostaspella bifoliata</i> .....	80
<b>4.4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>4.5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>83</b>

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

O Vale do Paraíba é considerado o maior produtor de leite do estado de São Paulo, representando 14% do volume leiteiro de todo estado e a região de Guaratinguetá, que envolve 18 municípios, possui maior representatividade (IEA, 2017).

Um dos entraves na produção leiteira são os parasitas internos e externos que acometem os bovinos e causam grandes perdas econômicas estimadas em torno de 13,96 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2014).

No contexto atual o controle dos parasitas, tem se caracterizado por uma mentalidade pluralista em consequência da exigência dos consumidores quanto à segurança dos produtos de origem animal e no crescimento de pesquisa nos seguimentos de fitoterápicos, homeopáticos e controle biológico. Entretanto, os produtos químicos convencionais continuam sendo a principal ferramenta usada pelo produtor para o controle parasitário.

O uso do controle biológico na área agrônômica cresce ao redor de 17% ao ano e já representa 5% do mercado global dos defensivos agrícolas (SAVAGE, 2018). Na área veterinária esse crescimento ainda é incipiente e esbarra em questões regulatórias, principalmente no Brasil.

O emprego do controle biológico na área veterinária se desenvolve de maneira esparsa ao longo do tempo desde os estudos pioneiros de Pereira e Castro nos anos quarenta, através de seus estudos verificaram o desenvolvimento de ácaros com uma alimentação a base de ovos e larvas de moscas domésticas, e na década de noventa, com a entrada da mosca-dos-chifres, que foi controlada com o uso de besouros coprófagos e ácaros de esterco bovino no controle da *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: muscidae).

Excrementos em pastagens se constituem em um microecossistema complexo, que apresenta microclima específico e diversidade biótica (CICOLANI, 1992). A colonização dessas placas de esterco ocorre através de pequenos invertebrados que auxiliam na decomposição e ciclagem de nutrientes (LAVELLE et. al., 1996). Esse ambiente é constituído por grande diversidade de espécies de invertebrados dentre eles os ácaros da família Macrochelidae Vitzthum que possui uma grande diversidade de espécies encontradas nos

mais diversos ambientes como excrementos, serrapilheira e animais em decomposição (HALLIDAY, 2000).

Ácaros dessa família são predadores de pequenos invertebrados, que coabitam no solo, matéria orgânica em decomposição e fezes de animais. Algumas espécies de macroquelídeos possuem comportamento forético em coleópteros e moscas sinantrópicas (AXTELL, 1961; JALIL; RODRIGUEZ, 1970; KRANTZ, 1983; HALLIDAY, 1986). Pesquisas vêm evidenciando seu potencial na predação dos primeiros ínstares larvais de moscas sinantrópicas.

Pereira e Castro (1945) foram os primeiros a relatar a predação de ovos e larvas de moscas sinantrópicas. Mais tarde, Axtell (1969) e Krantz (1983) avaliaram o potencial predatório de algumas espécies deste grupo, relacionando-os a um possível uso no controle biológico dentro de um manejo integrado. O conhecimento da sazonalidade dos ácaros predadores pode auxiliar na melhor escolha da espécie no controle dos organismos pragas, levando em consideração sua frequência ao longo do ano e a maior densidade. Atualmente Azevedo et al. (2018) averiguaram o potencial de *Macrocheles embersoni* Azevedo, Berto e Castilho em populações de moscas dos estábulos.

Estudos relacionados com ácaros da família Macrochelidae são encontrados desde o final do século XVIII. As publicações relacionadas às estruturas morfológicas, relevantes para identificação dos ácaros aumentou muito com pesquisas recentes que acrescentou novos dados ao conhecimento sobre morfologia e taxonomia dos macroquelídeos (AZEVEDO et al., 2015). Como consequência da descrição de novas espécies no mundo, surgiram muitos sinônimos e homônimos de ácaros já descritos. Diante disso, Azevedo et al. (2015) sugerem a revisão completa desta família.

Os estudos taxonômicos clássicos eram baseados em observações das diferenças fenotípicas entre os organismos (NAVAJAS; FENTON, 2000). O crescimento exponencial dos estudos moleculares adiciona vastas informações genética a serem consideradas pela taxonomia, em uma abordagem integrativa que incorpora dados, moleculares, ecológicos, geográficos, comportamentais e fisiológicos de indivíduos de diferentes espécies (LOPES, 2009).

Segundo Navajas e Fenton (2000) o mtDNA e o rDNA são utilizados principalmente para determinação de relações filogenéticas, identificação de espécies e análise de estruturas populacionais e genéticas. No mtDNA há regiões que divergem rapidamente, enquanto outras regiões são altamente conservadas, podendo ser utilizadas em diferentes níveis taxonômicos.

A região do DNA mitocondrial COI (citocromo oxidase I) é muito variável, representando uma ótima ferramenta para os estudos evolutivos, portanto tem sido utilizada no entendimento da estrutura de populações, fluxo gênico, hibridização, biogeografia e relações filogenéticas para os níveis taxonômicos de gênero e espécie (HEBERT et al. 2003; AVISE et al. 1987).

Estudos filogenéticos baseados na região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA são indicados para distinção interespecífica, construção de filogenias e diagnóstico molecular (NAVAJAS et al. 1994, 1996, 2000, 2002; NIOGRET et al. 2007; HURTADO et al. 2008; MENDONÇA et al. 2011; SKORACKA et al. 2012).

Tendo em conta o potencial predatório dos macroquelídeos no caso das moscas, torna-se igualmente importante avaliar seu potencial papel na predação de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios dos nematódeos de interesse veterinário, que também se desenvolvem no bolo fecal. O estudo dos macroquelídeos como predadores de larvas de parasitos nematódeos do gado se alinha com os esforços para o desenvolvimento de alternativas não químicas no controle das verminoses.

## **1.2 OBJETIVOS**

### 1.2.1 Objetivos gerais

Levantamento da fauna de ácaros da família Macrochelidae em esterco de bovinos no município de Guaratinguetá – São Paulo.

Averiguar sua sazonalidade nesse ambiente, assim como a distribuição das espécies nas placas de esterco.

Avaliar o efeito predatório dos macroquelídeos em ínstares de larvas de nematódeos de interesse veterinário.

### 1.2.2 Objetivo específico



Estabelecer a posição taxonômica das espécies encontradas, já descritas ou novas, combinando os caracteres morfológicos e moleculares (sequenciamento).

Averiguar a sazonalidade das espécies para melhor compreender suas relações no meio onde vivem.

Avaliar a distribuição dos macroquelídeos na placa de esterco para verificar sua dominância e possível forma de colonização.

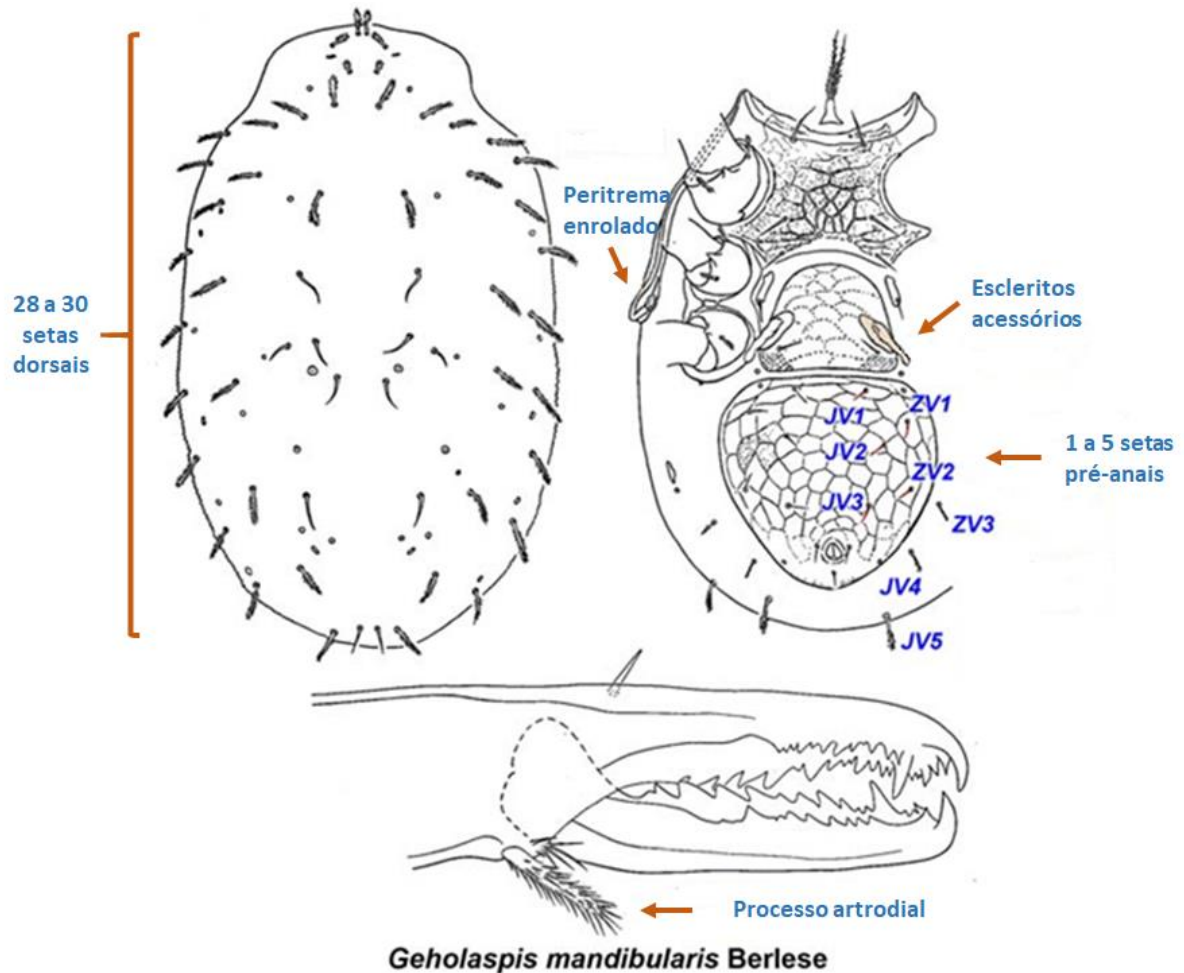
Criação de colônias de espécies de macroquelídeos, produzindo indivíduos para uso em modelos experimentais.

Quantificar a predação de nematódeos de interesse veterinário por espécies de Macrochelidae.

### **1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### 1.3.1 Família Macrochelidae Vitzthum (1930)

Na família Macrochelidae, estudos morfológicos já caracterizaram cerca de 550 espécies, distribuídas em 23 gêneros, embora apenas 470 sejam consideradas válidas (AZEVEDO et al., 2015). Os caracteres morfológicos comuns para diferenciar algumas fêmeas dessa família são: placas fortemente esclerotizadas, presença de pelo menos 28 pares de setas no escudo dorsal; três pares de setas localizadas no escudo esternal; escudo genital com um par de setas e um par de escleritos acessórios; presença de um a cinco pares de setas no escudo ventrianal e três setas perianais; peritrema geralmente enrolado em torno do estigma; membrana arthrodial na base do dígito móvel da quelícera com um processo arthrodial como uma escova alongado ou fibrilado (Figura 1).



**Figura 1.** Caracteres básicos presente na maioria das fêmeas da Família Macrochelidae. **Fonte.** Bregetova e Koroleva (1980)

Na identificação de macroquelídeos, vem sendo usadas chaves e publicações que relatam espécies da Europa, Ásia, Oceania e América do Norte. Os principais trabalhos publicados são: na Rússia (BREGETOVA; KOROLEVA, 1960), Grã-Bretanha (EVANS; BROWNING, 1956), Austrália (HALIDAY, 2000), Estados Unidos (KRANTZ; AINSCOUGH, 1990), Brasil (LIZASO; MENDES, 1992; MENDES; LIZASO, 1992; LIZASO et al., 1994), Japão (TAKAKU, 1997), Eslováquia (MAŠÁN, 2003), Indonésia (HARTINI; TAKAKU, 2003; HARTINI et al., 2005), Nova Zelândia (EMBERSON, 2010), Filipinas (TAKAKU et al 2012), Turquia (OZBEK; BALL 2014).

Azevedo et al. (2015) sugerem a necessidade de uma revisão completa da família Macrochelidae devido ao grande número de sinônimos e homônimos. O uso da taxonomia integrativa se faz necessário, portanto, para uma reorganização da classificação das espécies de Macrochelidae, incluindo informações de cunho ecológico, geográfico, molecular e

fisiológico, capazes de aprimorar a atual classificação baseada principalmente em características morfológicas.0

Os macroquelídeos representam uma família de ácaros predadores das quais muitas espécies são associadas à micro habitats edáficos como matéria orgânica em decomposição, fezes de animais e, carniça, onde se alimentam de pequenos invertebrados e ácaros (HALLIDAY, 2000; MAŠÁN, 2003; AZEVEDO et al., 2015)

Algumas espécies desta família como *Macrocheles merdarius*, por exemplo, são cosmopolitas, característica que pode estar relacionada com o seu comportamento forético. Espécies que vivem em ambientes mutáveis possui como forma de locomoção prender-se a um inseto. Segundo Hunter e Rosario (1988), esta relação indica uma história evolutiva.

A reprodução das espécies dessa família pode ser partenogenética arrenótoca ou telítoca. Pereira e Castro (1947) em seus estudos demonstraram que as fêmeas de *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) podem ser arrenótocas, gerando machos de ovos não fertilizados quando estão em um ambiente novo, sem machos de sua espécie para se reproduzirem. A telitoquia também já foi relatada em alguns macroquelídeos (CICOLANI, 1983; NORTON et al., 1993; HALLIDAY, 1993; MANNING; HALLIDAY, 1994). Existe uma possível correlação entre a estratégia reprodutiva e o ambiente onde vivem os ácaros. Espécies que colonizam ambientes mais instáveis são por sua maioria arrenótocas, uma vez que possuem comportamento forético e podem se acasalar com seu filho, enquanto espécies encontradas em ambientes mais estáveis, como a serapilheira, são, na sua maioria, telítocas uma vez que estes ambientes são contínuos e estáveis ao tempo (MANNING; HALLIDAY, 1994).

Estudos da predação desses ácaros sobre ovos e larvas de moscas tiveram início com o trabalho de Pereira e Castro (1945), que demonstraram a eficácia de *M. muscaedomestice* sobre a espécie *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). A partir da década de 1970, intensificaram-se os estudos biológicos e ecológicos dos macroquelídeos, visando o controle biológico da *Haematobia irritans* (L.) (Azevedo et al., 2015). Nestes estudos usaram-se espécies pertencentes a dois gêneros, *Macrocheles* Latreille e *Glyphtholaspis* Filipponi e Pegazzano. Além disso, foram realizados testes de predação com outras presas, incluindo moscas domésticas, moscas dos estábulos, nematódeos de vida livre, anelídeos e colêmbolos (FILIPPONI; DELUPIS, 1963; COSTA, 1966; MANNING; HALLIDAY, 1994; ROYCE; KRANTZ, 1991).

Observa-se uma maior difusão do uso de ácaros predadores, com várias espécies disponíveis comercialmente e diversas pesquisas em andamento para identificação de novas espécies de ácaros adequadas ao controle de pragas na agricultura. *Macrocheles robustulus*

(Berlese) já vem sendo comercializado para o controle de pupas da família Thripidae e fases iniciais de Sciaridae.

#### 1.3.1.1 Taxonomia e novas abordagens

Atualmente o uso das técnicas moleculares é uma ferramenta adicional na identificação de espécies. Para macroquélídeos as sequências de DNA disponíveis em bases de dados públicas não chegam a 200 registros. Destas sequências, apenas 12 espécies foram associadas a alguns desses registros (CRUICKSHANK; THOMAS, 1999; NIOGRET et al., 2007; KNEE, 2017; PEREZ-LEANOS et al., 2017). As demais sequências depositadas no GenBank limitam-se à identificação apenas de gênero, o que as torna irrelevantes para um estudo filogenético.

A taxonomia integrativa é uma ferramenta que se utiliza de marcadores moleculares, caracteres ecológicos geográficos e morfológicos (SEBERG et al., 2003; DAYRAT, 2005; DeSALLE et al., 2005; RUBINNOF, 2006; FONSECA et al., 2008). Segundo Niogret et al. (2007) os caracteres morfológicos muitas vezes são inconspícuos e o uso da análise genética podem auxiliar no esclarecimento das espécies.

O estudo genético se faz particularmente útil, exigindo sempre o cuidado na escolha de uma região gênica e marcadores adequados (BOCK, 2010). Há que se ter cautela para não escolher uma região conservada demais ou muito variável, que pode conflitar com aspectos morfológicos ou superestimar a quantidade de espécies (HOEF-EMDEN, 2007; RINDI et al., 2009).

O marcador genético ITS (Internal Transcribed spacer), tem sido usado amplamente em estudos de filogenia molecular. Esta região consiste de três porções distintas chamadas de ITS I, 5.8S e ITS II, que flanqueiam as cópias gênicas contíguas do rRNAs nuclear 18S e 28S. A conformação estrutural deste transcrito é crucial para maturação dos rRNAs 18S e 28S, de acordo com a conservação evolutiva, das suas sequências de DNA (COLEMAN, 2003). Apesar desta alta conservação evolutiva alguns nucleotídeos do ITS II aparentemente evoluem a uma taxa próxima à neutra, ou seja, não estão sujeitos a seleção natural (SCHLÖTTERER et al, 1994).

A recente decodificação dos genomas de milhares de organismos, especialmente com o envolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA de nova geração (NGS), levou à

proposta de “DNA barcoding”, que se trata de um marcador molecular consistindo em uma sequência relativamente curta de DNA presente em qualquer organismo de um determinado reino facilmente detectada por PCR (SHETH; THAKER, 2017). Este marcador atrai grande interesse pelas suas diversas potenciais aplicações, como, por exemplo, na análise de biodiversidade de amostras ambientais, em projetos de metagenômica ou na investigação da presença de organismos contaminantes em amostras de produtos comerciais (GOLDSTEIN; DeSALLE, 2011). Em qualquer desses casos o uso deste marcador torna-se uma ferramenta importante para se identificar a presença de vestígios biológicos de um organismo em uma amostra na eventualidade da ausência de qualquer outro vestígio do organismo original.

Apesar dos acalorados debates em torno do marcador ideal e do seu desempenho (RUBINOFF et al., 2006; ROE; SPERLING, 2007), convencionou-se que no reino animal ele corresponde à Citocromo Oxidase I mitocondrial, enquanto que corresponde à região do ITS do rRNA nuclear em fungos, e a dois loci pertencentes aos genes *rbcL* e *matK* nas plantas terrestres (CBOL WORKING GROUP, 2009).

### 1.3.1.2 Habitat e interações

Há uma grande diversidade de espécies de macroquelídeos já conhecidas, sendo que a maioria é encontrada no solo e em material orgânico em decomposição. Porém, já foram registradas espécies associadas a plantas, ninhos de aves, ninhos de pequenos mamíferos, reto do bicho-preguiça *Bradypus tridactylus* L. e até em corpos humanos em decomposição (KRANTZ, 1983; KRANTZ; WHITAKER, 1988; HALLIDAY, 2000; CHE KAMARUZAMAN et al, 2019). No Brasil Trajano e Gnaspini-Netto (1991) relataram a presença de *Macrocheles coprophila* e *Macrocheles* sp. e *Macrolaspis* sp. em cavernas.

Sendo o Brasil um dos países com maior biodiversidade no mundo, o número de estudos realizados em ambientes diversos, com o intuito de conhecer a diversidade de espécies da família Macrochelidae é ínfimo, seja por falta de recursos ou de interesse. Outros países tiveram sua fauna melhor investigada, como por exemplo, a Austrália, onde Halliday (2000) explorou vários nichos e interações foréticas. Outros autores, como Mašán (2003) na Eslováquia, fizeram trabalhos semelhantes.

Uma característica ecológica exercida por estes ácaros é a forésia em insetos, como por exemplo, besouros coprófagos que pode ser obrigatória ou facultativa. Este

comportamento está relacionado às espécies que vivem em excrementos e carcaças e utilizam a forésia como meio de dispersão (KRANTZ, 1998). De acordo com a catalogação feita por Azevedo (2017), os gêneros *Holocelaeno*, *Holostaspella* e *Macrocheles* são os mais encontrados em associação com moscas, besouros, aves e mamíferos. Krantz (1998) destacou que a presença de estruturas nas quelíceras, como um conjunto de nervuras no dígito fixo, o dente bidentado do dígito móvel e o *cribum* limitado a uma pequena faixa pós-anal, são características relacionadas com espécies foréticas. Para Niogret et al. (2006) o sucesso obtido pelos Macrochelidae foréticos deve-se à sua associação com vários hospedeiros e à sua estratégia de dispersão.

No Brasil, a forésia de *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) em moscas foi relatada por Pereira e Castro (1945, 1947) e Rodrigues e Prado (2004). O trabalho conduzido por Rodrigues et al. (2001) avaliou as espécies de macroquelídeos associadas a besouros coprófagos em pastagens nos municípios de Piracicaba-SP e Aquidauana-MS. Silva et al. (2011) relataram a presença de macroquelídeos em colmeias de meliponídeos, correspondendo a cerca de 30% da fauna de artrópodes associada às abelhas sem ferrão.

Ácaros predadores vem sendo estudados e comercializados no controle de pragas agrícolas. Neste contexto os macroquelídeos têm sido avaliados com a finalidade de serem empregados no controle de moscas sinantrópicas. As espécies mais estudadas pertencem ao gênero *Macrocheles*, sendo que *Macrocheles robustulus* (Berlese) é comercializado no continente Europeu para controle de pupas de Tripes (Thysanoptera).

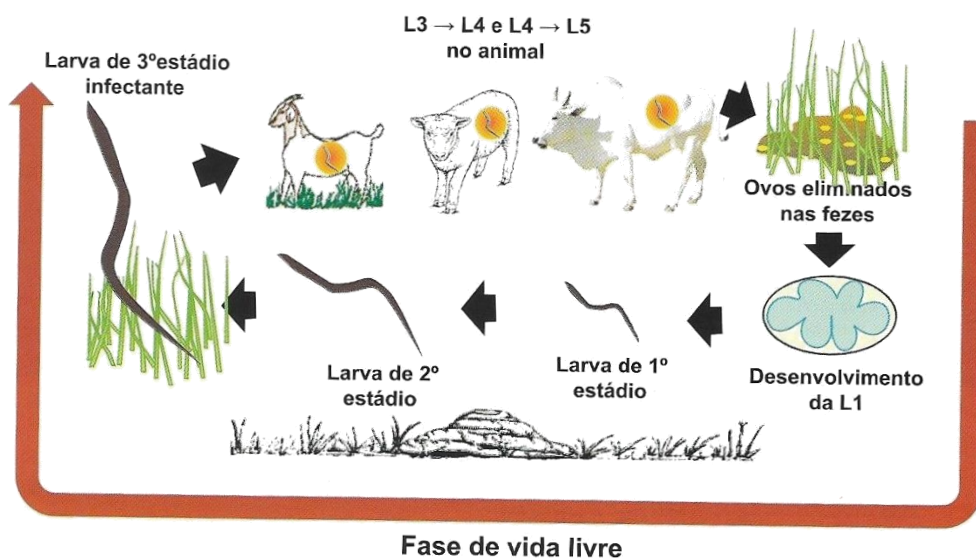
Nas décadas de quarenta, e nas de sessenta a noventa, devido às pragas de moscas sinantrópicas na pecuária (*Musca domestica*, *Lucilia* sp, *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans*), houve um aumento nas avaliações da predação por macroquelídeos (PEREIRA; CASTRO, 1945 e 1947; O'DONNELL; AXTELL, 1964; MANNING; HALLIDAY 1994; HALLIDAY; HOLM, 1987). Em estudos mais recentes a espécie *Macrocheles embersoni* demonstrou grande eficácia, em ensaios laboratoriais, na predação de *Stomoxys calcitrans* (Azevedo et al., 2018). Santos (2018) por sua vez avaliou a espécie *Macrocheles roquensis* como um possível predador da mosca das frutas (*Ceratitis capitata*)

Filipponi e Delupis (1963) e Hassan et al. (2002) verificaram que os *Macrocheles* se alimentam de outros invertebrados como *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae), *Poduromorpha Collembola* e *Frankliniella occidentalis*, além de nematódeos de vida livre e parasitas de plantas comerciais (*Rhitis inermiformis*, *Panagrellus* sp., *Aphelenchus avenae* e *Panagrellus redivivus*).

### 1.3.2 Nematódeos como parasitos gastrintestinais de ruminantes

Os nematódeos, em sua maioria, possuem forma cilíndrica e afilada em ambas as extremidades, com o corpo envolto por uma cutícula (URQUHART et al., 1998). Temperatura, precipitação, oxigênio, tipo de solo e pastagem são fatores que afetam os estágios pré-parasitários dos nematódeos gastrintestinais (CASTRO et al., 2004). O desenvolvimento das formas de vida livre é melhor alcançado em temperaturas de 20°C a 30°C. Segundo Lopes et al. (2017) a melhor forma de manejo desses parasitas está relacionada ao conhecimento prévio da dinâmica populacional e distribuição sazonal das larvas nos pastos associados com o uso de anti-helmínticos.

De modo geral, na fase de vida livre, os primeiros estágios dos nematódeos se desenvolvem no bolo fecal dos ruminantes (LOPES et al., 2017). A postura de ovos morulados pelas fêmeas é diária e, em condições adequadas, o ovo se desenvolve em larva de primeiro ínstar ( $L_1$ ) em até 24 horas. Durante as fases de  $L_1$  a  $L_2$  (segundo ínstar) e de  $L_2$  a  $L_3$  (terceiro ínstar), elas se alimentam de bactérias no bolo fecal. O desenvolvimento de  $L_1$  a  $L_3$  pode levar de 7 a 10 dias. A  $L_3$  é a forma infectante, que sai do bolo fecal para a pastagem, aguardando ser deglutida pelo seu hospedeiro (Figura 2), para completar seu ciclo. Dentro do animal, a forma  $L_3$  passa por mais duas mudas,  $L_4$  a  $L_5$ , para atingir a maturidade sexual



**Figura 2.** Fase de vida livre do ciclo biológico dos nematódeos gastrintestinais de ruminantes. **Fonte.** Domínio público.

Nematódeos em sua fase infectante (L<sub>3</sub>) são mais resistentes às variações climáticas, podendo sobreviver de 10 a 15 semanas nas pastagens, dependendo da espécie (BRAGA, 1980). Já no solo, Lyaku et al. (1988) observaram que larvas de *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. sobrevivem até nove semanas, enquanto que as larvas de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. resistem por até três semanas.

Segundo Almeida et al. (2005) na massa fecal, em média, é possível encontrar larvas de *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomus* spp. até 150 dias nas fezes bovinas, 100 dias nas de caprinos e 70 dias nos de ovinos, uma duração semelhante à da pastagem. Isso pode estar relacionado ao fato de se formar uma camada enrijecida no bolo fecal em decorrência à ação do sol que preserva seu interior, conservando as larvas de nematódeos das ações climáticas (CARVALHO, 1997). A massa fecal bovina possui maiores dimensões e teor de umidade em relação às de caprinos e de ovinos, que são pequenos cíbalos, fator, favorável ao desenvolvimento de nematódeos. No entanto, se as fezes de ovinos e caprinos estiverem em ambiente sombreado torna-se uma fonte de infecção por um período maior (COSTA, 2007).

Para a L<sub>3</sub> se deslocar do bolo fecal para as gramíneas ela realiza movimentos horizontais e verticais. Para a melhor eficiência da migração horizontal a chuva se torna imprescindível, facilitando este movimento. No seu deslocamento vertical o orvalho é o principal facilitador na subida da base para o ápice das gramíneas (LOPES et al., 2017).

No Brasil, os principais gêneros de nematódeos gastrintestinais são: *Bunostomum*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Ostertagia* e *Trichostrongylus*. Dentre os sintomas causados por nematódeos, pode ocorrer a anemia, dispepsia e gastrites

*Haemonchus* spp. é o principal responsável pela anemia, podendo um adulto ingerir até 0,08 ml de sangue. O repasto sanguíneo leva por volta de 12 minutos; em seguida ele muda de local, deixando uma substância anticoagulante na lesão que permanece sangrando por cerca de cinco minutos. As espécies do gênero *Haemonchus* apresentam uma coloração avermelhada devido ao hematofagismo. *Haemonchus contortus* medem de 1 a 3 centímetros e parasita caprinos e ovinos, enquanto que *Haemonchus placei* (medindo de 1 a 3 cm) e *Haemonchus similis* (de 0,8 a 1 cm) acometem os bovinos (LOPES et al., 2017).

Em bovinos, *Haemonchus* sp. representa cerca de 15% a 25 % da carga parasitária no Centro-oeste e Sudeste brasileiro. Para pequenos ruminantes, *Haemonchus* sp. corresponde a 40% a 80% da carga parasitária. As fêmeas deste gênero normalmente colocam cerca de 5.000 a 10.000 ovos por dia. Já as espécies de *Cooperia*, *Trichostrongylus* e *Ostertagia* põem



de 100 a 200 ovos por dia e *Oesophagostomum* de 3.000 a 8.000 (UENO; GONÇALVES, 1998)

### 1.3.2.1 Resistência aos anti-helmínticos

Os principais impactos causados pelos helmintos são o retardo no crescimento e mortalidade de animais (HAWKINS, 1993; STROMBERG et al., 2012). Os anti-helmínticos têm sido vitais no controle das verminoses dos ruminantes, porém o aparecimento de resistência tem comprometido o uso desta ferramenta, podendo ocasionar um grande problema sanitário na pecuária (LOPES et al., 2009)

Barnes et al. (1995) citam como exemplo os benzimidazóis, lançados no mercado em 1962. Mesmo com sua eficiência no controle dos nematódeos gastrintestinais, já em 1964 ocorriam relatos de cepas resistentes. Na África em 1985 houve os primeiros relatos de resistência de *Haemonchus* spp. a Ivermectina, apenas 32 meses após a introdução da droga (LO et al., 1985). Na Nova Zelândia o primeiro informe de resistência ao Monepantel, droga de última geração, ocorreu após dezessete tratamentos administrados em um rebanho de ovinos (SCOTT et al., 2013).

Outras medidas têm sido tomadas para controlar as verminoses em ruminantes, desde higiene, manejo, descanso das pastagens, pastejo rotacional, pastejo alternado e simultâneo entre ovinos e bovinos. Nos últimos anos houve grande avanço nas pesquisas relacionadas ao uso dos fitoterápicos, vacinas, homeopáticos e o controle biológico através de fungos nematófagos (LOPES et al. 2017).

Embora se saiba que os macroquelídeos são ácaros predadores associados às fezes dos animais domésticos, não existem estudos acerca de sua interação com os nematódeos gastrintestinais. A elucidação desta relação ecológica pode revelar a importância destes ácaros como predadores naturais de larvas e ovos destes helmintos, transformando os macroquelídeos num potencial agente de controle biológico, capaz de somar esforços e contrabalancear o problema da resistência dos vermes de interesse veterinário às drogas antiparasitárias.

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. R.; CASTRO, A.A.; SILVA, F.J.; FONSECA, A.H. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de infectantes, na estação seca da baixada fluminense, RJ. **Ver. Bras. Paras. Veter.**, Rio de Janeiro, v.14, n.1, p.89-94, 2005.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; MARTIN BALL, R.; BERMINGHAM, E.; TRIP, L.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridger Between Population Genetics and Systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v.18, p.489-522, 1987.

AXTELL, R.C. Macrochelidae (Acarina: Mesostigmata) as biological control agents for synanthropic flies. In: **PROCEEDINGS OF THE 2ND INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY**, 2.,1969, Sutton Bonington, England. *Article*. Budapest: Akademia Kiado. 1969. p.401–416.

AXTELL, R.C. New records of North American Macrochelidae (Acarina: Mesostigmata) and their predation rates on the house fly. **Ann. Entom. Soc. Am.**, v.54, p.748, 1961.

AZEVEDO, L. H. **Taxonomic studies of Macrochelidae mites (Acari: Mesostigmata) and their potential use to control *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera)**. 2017. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2017.

AZEVEDO, L.H.; EMBERSON, R.M; ESTECA, F.C.N.; MORAES, G.J. Macrochelid Mites (Mesostigmata: Macrochelidae) as Biological Control Agents. In: CARRILLO, D.; MORAES, G.J.; PEÑA, J.E. (Ed.). **Prospects for Biological control of Plant Feeding Mites and other harmful organisms**. 19. ed. Springer International Publishing Switzerland: *Springer International Publishing*, 2015. 103p. Chap. 4.

AZEVEDO, L.H.; FERREIRA, M.P.; CASTILHO, R.C; CANÇADO, P.H.D.; MORAES, G.J. Potential of *Macrocheles* species (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) as control agents of harmful flies (Diptera) and biology of *Macrocheles embersoni* Azevedo, Castilho and Berto on *Stomoxys calcitrans*(L) and *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Bio. Cont.**, v.123, p.1-8, 2018.

- BERNES, E.H.; DOBSON, R. J.; BARGER, I. A. Worn control and anthelmintic resistance: adventures with a model. **Paras. Tod.**, La Paz, v.11, n.1, p56-63, 1995.
- BOCK, C. **Genetic diversity and polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium* morphotype**. 2010. 48 f. Tese (Doktors der Naturwissenschaften)- Freie Universität Berlin, Germany, 2010.
- BRAGA, R. M. **Desenvolvimento e sobrevivência de ovos e de nematódeos gastrintestinais de bovinos sob condições naturais**. 1980. 90f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1980.
- BREGETOVA, N.G.; KOROLEVA, E.V. The macrochelid mites (Gamasoides, Macrochelidae) in the USSR. *Mag. Parasit. Stornik. Zool. Inst.*, v.19, p.32-154, 1960.
- CARVALHO, P. C. F. Relação entre a estrutura da pastagem e o comportamento ingestivo de ruminantes em pastejo. In: **SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS**, 1., 1997, Maringá – PR. Anais., Pretrolona: EFMG, 1997. P.25-52.
- CASTRO, A. A. **Distribuição e longevidade de infectantes de nematoides gastrintestinais de caprinos (*Capra hircus*) em solo e pastagem irrigados e não-irrigados no município de Seropédica, RJ, Brasil**.2004. 71f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.
- CBOL Plant Working Group. **A DNA barcode for land plants**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. p.106, n.31, p.12794-12797, 2009.
- CHE KAMARUZAMAN, N.A; MAŠÁN, P.; VELÁSQUEZ, Y.; GONZÁLEZ-MEDINA, G.; LINDSTRÖM, A; BRAIG, H.R.; PEROTT, M.A. *Macrocheles* species (Acari: Macrochelidae) associated with human corpses in Europe. **Exp. Ap. Acaro.**, v.76, p.453-471, 2018.
- CICOLANI, B. Foresia tra nematodi radditidi, acari macrochelidi e scarabei coprofagi: una originale strategia ecologica. IN: **ATTI XIII CONGRESSO NAZIONALE ITALIANO DI ENTOMOLOGIA**,27., 1983 Torino,1993. p. 629–634.
- CICOLANI, B. Macrochelid mites (Acari: Mesostigmata) occurring in animal droppings in the pasture ecosystem in central Italy. **Agri. Eco. Envi.**, v.40, p.47-60, 1992.

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trend. Gen.**, v.19, n.7, 2003.

COSTA, M. Notes on Macrochelids associated with manure and coprid beetles in Israel. I. *Macrocheles robustulus* (Berlese, 1904), development and biology. **Aca.**, v.8, n.4, p.532–548, 1966.

COSTA, M. S. F. **Dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais de bovinos na região do vale do Mucuri, MG.** 2007. 127f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

CRUICKSHANK, R. H.; THOMAS, R. H. Evolution of haploidy in Darmanyssidy mites (Acari: Mesostigmata). **Evolution.**, v.53, n.6, p.1796-1803, 1999.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Bio. Jo. Linn. Soc.**, v.84, p.407-415, 2005.  
DeSALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy: taxonomy. species delimitation and DNA barcoding. **Philo. Trans. Roy. Soc. B.**, v.360, p.1905-1916, 2005.

EMBERSON, R.M. A reappraisal of some basal lineages of the family Macrochelidae, with the description of a new genus (Acarina: Mesostigmata). **Zoo.**, v.2501, p.37–53, 2010.

EVANS G.O.; BROWNING, E. British mites of the subfamily Macrochelinae Tragarth (Gamasida, Macrochelidae) **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)**, v.4, p.1-55, 1956.

FILIPPONI, A.; DELUPIS, G. D. Sul regime dietetico di alcuni Macrochelidae (Acari: Mesostigmata), associati in natura a muscidi di interesse sanitario. **Riv. Paras.**, v.24, p.277–287, 1963.

FONSECA, G.; DERYCKE, S.; MOES, T. Integrative taxonomy in two free-living nematodes species complexes. **Biol. Jour. Lin. Soc.**, v.94, n.4, p. 737-753, 2008.

GOLDSTEIN P.Z.; DeSALLE R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. **Bio.**, v.33, n.2, p.135-47, 2011.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, A.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the

potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Rev. Bras. Parasito. Vet.**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HALLIDAY, R. B. The Australian species of *Macrocheles* (Acarina: Macrochelidae). **Invert. Taxon.**, v.14, p.273–326, 2000.

HALLIDAY, R. B. Two new species of *Macrocheles* from Australia (Acarina: Mesostigmata: Macrochelidae). **Aust. Entom.**, v.20, p.99–106, 1993.

HALLIDAY, R. B.; HOLM, E. Mites of the family Macrochelidae as predators of two species of dung-breeding pest flies. **Entom.**, v.32, p.333–338, 1987.

HALLIDAY, R.B. Mites of the genus *Glyphtholaspis* Filipponi and Pegazzano (Acarina: Macrochelidae) in Australia. **J. Aust. Entom. Soc.**, v.25, p.71–74, 1986.

HARTINI, S.; TAKAKU, G. Javanese species of the mite genus *Macrocheles* (Arachnida: Acari: Gamasida: Macrochelidae). **Zool. Sci.**, v.20, n.10, p.1261–1272, 2003.

HARTINI, S.; TAKAKU, G.; KOJIMA, J.; KATAKURA, H. Macrochelid mite fauna in the eastern part of the Lesser Sunda Islands, with description of two new species. **Entom. Sci.**, v.8, p.201–209, 2005.

HASSAN, M. F.; ALI, F. S.; HUSSEIN, A. M.; MAHGOUB, M. H. Biological studies on *Macrocheles muscaedomesticae* Scopoli fed on different stages of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. **Zeller. Egypt J Bio Pest Cont.**, v.12, p.43–46, 2002.

HAWKINS, J. A. Economic benefits of parasite control in cattle. **Veter. Para.**, Dublin, v.46, n.1-2, p.159-173, 1993.

HEBERT, P.D.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. Biol. Sci.**, v.270, p.313-321, 2003.

HOEF-EMDEN, K. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae) II: incongruences between the classical morphospecies concept and molecular phylogeny in smaller pyrenoid-less cells. **Phycol.**, v.46, n.4, p.402-428, 2007.

HUNTER, P. E.; ROSARIO, R. M. T. Associations of Mesostigmata with other arthropods. **An. Rev. Entom.**, v.33, p.393–417, 1988.

HURTADO M.A.; ANSALONI T.; JACAS J.A.; NAVAJAS M. Structure of *Tetranychus urticae* (Acari: Prostigmata) populations occurring in Spanish orchards (*Citrus reticulata* Blanco) and its relevance for pest management. **IOBC wprs Bulletin OILB srop.** v.38, p.243, 2008.

IEA Instituto de Economia Agrícola. **Análise e indicadores do agronegócio.** v.12, n.5, 2017.

JALIL, M.; RODRIGUEZ, J.G. Studies of Behaviour of *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae) with emphasis on its attraction to the house fly. **Ann Entom. Soc. Am.**, v.63, p.738–744, 1970.

KNEE, W. New *Macrocheles* species (Acari, Mesostigmata, Macrochelidae) associated with burying beetles (Silphidae, *Nicrophorus*) in North America. **ZooKeys.**, v.721, p.1-32, 2017.

KRANTZ G.W. Reflections on the Biology, Morphology and Ecology of the Macrochelidae. **Exp. & Appl. Aca.**, v.22, p.125–137, 1998.

KRANTZ, G. W. Mites as biological control agents of dung-breeding flies, with special reference to the Macrochelidae. In: HOY, M. A.; CUNNINGHAM, G. L.; KNUTSON, L. (Ed). **Biological control of pests by mites**, vol. 3304. University of California, Berkeley.1983a. p 91–98, Special publication.

KRANTZ, G. W.; WHITAKER, J.O. Jr. Mites of the genus *Macrocheles* (Acari: Macrochelidae) associated with small mammals in North America. **Acario.**, v.29, p.225–259, 1988.

KRANTZ, G.W, AINSCOUGH, B.D. Acarina: Mesostigmata (Gamasida). In: Dindal D.L. (Ed.) **Soil bio. guide.**, New York: Wiley, 1990. 1349p.

LAVELLE, P. Diversity of soil fauna and ecosystem function. **Biol. Intern.**, v.33, p.3-16, 1996.

LIZASO, N.M; MENDES, M.C. Novo gênero e nova espécie de Macrochelidae (Acarina) *Mesocheles lordosus gen.n., sp. n.*, de esterco bovino. **Rev. Bras. Entom.**, v.38, n.2, p.467-469, 1994.

LIZASO, N.M; MENDES, M.C.; SANTOS, A. M.M. Duas novas espécies de *Macrocheles* (Acarina: Macrochelidae) da região neotropical coletadas em esterco de aves poedeiras em granjas industriais. **Rev. Bras. Entom.**, v.36, n.3, p.597-601, 1992.

LO, P.; FINK, D.; WILLIAMS, J.; BLODINGER, J. P. Pharmacokinetics studies of ivermectin: effect of formulation. **Veter. Res. Com.**, London, v.9, n.2, p.251-268, 1985.

LOPES, P. **Taxonomia Alfa e distribuição dos representantes do gênero Aburria Reichenbach, 1853 (Aves: Cracidae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LOPES, W. D. Z. *et al.* Anthelmintic efficacy of oral trichlorfon solution against ivermectin resistant nematode strains in cattle. **Veter. Parasit.**, Dublin, v.166, n.1-2, p.98-102, 2009.

LOPES, W. E. Z.; COSTA, A. J.; BORGES, F. A.; VULCANI, V. A. S.; RABELO, R. E.; BICHUETTE, M. A. Nematódeos de Ruminantes Domésticos. In: LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J. (Org.). **Endoparasitoses de Ruminantes. Goiana**: Editora UFG, 2017. 242p.

LYAKU, J.R.S.; MONRAD, J.; KASSUKU, A.A. Larval ecology of bovine strongylid worms in tropical soil. I, In vitro on the longevity of infective strongylid larvae in different soil types. **Trop. Ani. Hel. Prod.**, London. v.20, n.1, p.190-192, 1988.

MANNING, M. J.; HALLIDAY, R. B. Biology and reproduction of some Australian species of Macrochelidae (Acarina). **Aust. Entom.**, v.21, p.89-94, 1994.

MAŠÁN, P. Macrochelid mites of Slovakia (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae). **Inst. Zool.** Slovak Academy of Sciences, Bratislava. p. 149, 2003.

MENDES, M.C; LIZASO, N.M. *Macrocheles novaodessensis, sp.n.* E *Macrocheles roquensis, sp.n.* Coletadas em esterco bovino na região neotropical (Acarina, Macrochelidae). **Rev Bras. Zool.**, v.9, n.3/4, p.357-361, 1992.

- MENDONÇA, R.S.; NAVIA, D.; DINIZ, I.R.; AUGER, P.; NAVAJAS, M. A critical review on some closely related species of *Tetranychus sensu stricto* (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences data bases. **Exp. Appl. Aca.**, v.55, p.1–23, 2011.
- NAVAJAS, M.; FENTION, B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. **Exp. App. Aca.**, v. 24, p.751-774, 2000.
- NAVAJAS, M.; GUTIERREZ, J.; BONATO, O.; BOLLAND, H.R.; MAPANGOU-DIVASSA, S. Intraspecific diversity of the cassava green mite *mononychollus progressivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. **Exp. Appl. Aca.**, v.18, p.351-360, 1994.
- NAVAJAS, M.; GUTIERREZ, J.; LAGNEL, J. Mitochondrial cytochrome oxidase I in Tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. **Bull. Entom. Res.** v.86, p.407-417, 1996.
- NAVAJAS, M.; PERROT-MINNOT, M.J.; LAGNEL, J.; MIGEON, A.; BOURSE, T.; CORNUET, J.M. Genetic structure of a greenhouse population of the spider mite *Tetranychus urticae*: spatio-temporal analysis with microsatellite markers. **Insect. Mol. Biol.**, v12, p.157-165, 2002.
- NIOGRET, J.; LUMARET, J. P.; BERTRAND, M. Review of the phoretic association between coprophilous insects and macrochelid mites (Acari: Mesostigmata) in France. **Elytron.**, v.20, p.99–121, 2006.
- NIOGRET, J.; NICOT, A.; STORDEUR, E.; BERTRAND, M. Combination of morphological character an ITS-sequence to characterize a new species of *Machocheles* (Acari: Macrochelidae). **Zoo.**, v.1386, p. 19-29, 2007.
- NORTON, R. A.; KETHLEY, J.B.; JOHNSTON, D. E.; O'CONNOR, B. M. Phylogenetic perspectives on genetic systems and reproductive modes of mites. In: WRENSCH, D. L.; EBBERT, M. A. (Ed.) **Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites**. Chapman and Hall, New York,1993. p. 8–99.



- O'DONNELL, A. E.; AXTELL, R. C. Predation by *Fuscuropoda vegetans* (Acarina: Uropodidae) on the house fly (*Musca domestica*). **Ann Entom. Soc. Am.**, v.58, p.403–404, 1964.
- ÖZBEK, H.H.; BAL D.A. New species of the genus *Geholaspis* Berlese, 1918 (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) for Turkish fauna from Kelkit Valley. **Mun. Ent. Zool.**, v.9, p.468–472, 2014.
- PEREIRA C.; CASTRO M.P. Contribuição para o conhecimento da espécie tipo de “*Macrocheles Latr*”. (“Acarina”): “*M. muscaedomesticae* (Scopoli, 1772)” Emend. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.16, n.13, p.153–186, 1945.
- PEREIRA, C.; CASTRO, M. P. Forese e partenogênese arrenótoca em “*Macrocheles muscaedomesticae*” (Scopoli) (“Acarina: Macrochelidae”) e sua significação ecológica. **Arq. Inst. Biol.**, v.18, p.71–89, 1947.
- PERES-LEANOS, A.; LOUSTALOT-LACLETTE, M. R.; NAZARIO-YEPIZ, N.; MARKOW, T. A. Ectoparasitic mites and their *Drosophila* hosts. **FLY.**, v.11, n.1, p.10-18, 2017.
- RINDI, F.; LAM D. W; LÓPEZ-BAUTISTA J. M. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). **Molec. Phylog. Evol.**, v.52, n.2, p.329-339, 2009.
- RODRIGUEIRO, T. S. C.; PRADO, A. P. *Macrocheles muscaedomesticae* (Acari: Macrochelidae) and a species of *Uroseius* (Acari: Polyaspididae) phoretic on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): effects on dispersal and colonization of poultry manure. **Iheringia Sér Zool.**, v.94, p.181–185, 2004.
- ROE, A. D.; SPERLING, F. A. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Mol. Phylog. Evol.**, v.44, n°1, p.325-345, 2007.
- ROYCE, L. A.; KRANTZ, G. W. A new rearing method for nematophagous mites. In: DUSBÁBEK, F., BUKVA, V. (Ed) **Modern acarology**. Academia, Prague and SPB Academic Publishing, The Hague, p. 619–622. v.2, 1991.

RUBINOFF, D.; CAMERON, S.; WILL, K. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. **The Jon. Here.**, V.97, n.6, p.581-94, 2006.

SANTOS, M. D. **Descrição de novas espécies de ácaros edáficos Rhodacaridae e predação de *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae) por *Macrocheles Roquenesis* (Acari: Macrochelidae).** 2018. 90 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2018.

SAVAGE, S. **Update on the rapidly growing biologicals sector in agriculture.** Food & Agriculture, 2018 Available from:

<https://www.forbes.com/sites/stevensavage/2018/03/15/update-on-the-rapidly-growing-biologicals-sector-in-agriculture/#1b8040a155be>. Acesso em: 20 mar. 2018.

SCHLÖTTERER, C.; HAUSER, M.T.; von HAESELER, A.; TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Mol.Biol.Evol.**, v.11, n°3, p.513-22, 1994.

SCOTT, I.; POMROY, W. E.; KENYON, P. R.; SMITH, G.; ADLINGTON, B.; MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veter. Paras.**, v.198, p.166 – 171, 2013.

SEBERG, O; HUMPHRIES, C.; KNAPP, S.; STEVENSON, D.; PETERSEN, G.; SCHARFF, N.; ANDERSEN, N. Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. **TRENDS in Ecol. Evo.**, v.18, n.2, p.63-65, 2003.

SHETH, B. P. & THAKER, V. S. DNA barcoding and traditional taxonomy: an integrated approach for biodiversity conservation. **Gen.**, v.60, n°7, p.618-628, 2017.

SILVA, R. T.; CARVALHO-ZILSE, G. A.; RAFAEL, J. A. Insetos associados a colônias de abelhas sem ferrão amazônicas em meliponário urbano e rural. XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM.2011, Manaus.

SKORACKA A.; KUCZYŃSKI L.; DE MENDONCA R.S.; DABERT M.; SZYDŁO W.; KNIHINICKI D.; TRUOL G.; NAVIA D. Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria*

tosichella (Keifer) (Acari, Eriophyoidea) revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. **Invert. Syst.**, v.26, p.417–433 2012.

STROMBERG, B. E. *et al.* *Coperia punctate*: Effect on cattle productivity? **Veter. Paras. Dub.**, v.183, n.1-2, p.284-291.2012.

TAKAKU, G. A new species of the genus *Macrocheles* (Acari: Macrochelidae) associated with *Eusilpha Kurosawai* M.Nishikawa, 1986 (Coleoptera: Silphidae). **Journal of Acarological Soc. Jap.**, v.6, n.6, p.117-122, 1997.

TAKAKU, G.; HARTINI, S.; DWIBADRA, D.; CORPUZ-RAROS, L. A. Macrochelid mites (Acari: Gamasina: Macrochelidae) in the Philippines. **J. Aca. Soc. Jap.**, vol. 21, n.2, p.95-124, 2012.

TRAJANO, E; GNASPINI-NETTO, P. Composição da fauna cavernícola Brasileira, com uma análise preliminar da distribuição dos táxons. **Rev. Bras. Zoo.**, v.7, n.3, p.383-407, 1991  
UENO, H.; GONÇAVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4 ed. Japão: **JICA**, 1998.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DURCAN, J. L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F. W. Parasitologia Veterinaria. 2 ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro. 273p.

## CAPÍTULO 2

### **Caracterização morfológica e molecular de ácaros da família Macrochelidae (Acari: Mesostigmata) encontrados no esterco bovino no município de Guaratinguetá – SP**

#### **RESUMO**

A família Macrochelidae é composta por ácaros predadores que habitam os mais diversos ambientes, tendo cerca de 470 espécies descritas das quais muitas estão presentes na matéria em decomposição. O presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento das espécies de macroquelídeos presentes no esterco bovino, usando caracteres morfológicos e moleculares para a identificação das mesmas. Foram realizadas coletas no município de Guaratinguetá – SP durante o ano de 2017 e início de 2018 para verificar a diversidade de ácaros de Família Macrochelidae. As amostras foram extraídas em funil de Berlese-Tullgen por quatro dias para recuperação dos ácaros. Os espécimes foram montados em lâminas permanentes em meio de Hoyer com a identificação das espécies através de revisão literária das chaves dicotômicas para esta família. A extração e amplificação do DNA foi definida para as regiões do rRNA ITS II, ITS I e para o mtDNA citocromo oxidase (COI). Posteriormente foi realizado o sequenciamento para montagem da árvore filogenética. Foram identificadas quatorze espécies de macroquelídeos, com dois novos registros de espécies no Brasil, e a presença de uma espécie nova do gênero *Holostaspella*. Através da região ITS II foi possível verificar o agrupamento das espécies sequenciadas confirmando os critérios para a identificação morfológica adotada. A região ITS I agrupou a espécie *Holostaspella bifoliata* monofileticamente ao grupo das espécies do gênero *Macrocheles*; já *Glyphtholaspis saprophila* se agrupou em um ramo separado dos outros dois gêneros. Na região COI, *Macrocheles robustulus* é um grupo parafilético a *Macrocheles subbadius* e *Glyphtholaspis americana* se agrupou com *Macrocheles mammifer*. A topologia das árvores da região ITS e COI apresentou aspectos similares e concordantes com as observações morfológicas.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os ácaros da família Macrochelidae Vitzthum possuem cerca de 470 espécies distribuídas em 23 gêneros (AZEVEDO et al. 2015). Recentemente um novo gênero foi descrito como uma morfoespécie e outras sete espécies para gêneros já existentes. Devido a algumas descrições originais de macroquelídeos com detalhes insuficientes, existe grande número de sinonímia e homonímia o que tem dificultado a identificação das espécies.

Os estudos taxonômicos clássicos eram baseados em observações das diferenças fenotípicas entre os organismos (NAVAJAS; FENTON, 2000). Atualmente passou-se a incorporar uma maior variedade de dados como ecológicos, comportamentais, fisiológicos e moleculares (LOPES, 2009). Segundo Niogret et al. (2007) os caracteres morfológicos muitas vezes são inconspícuos e o uso da análise genética pode auxiliar no esclarecimento. O uso da biologia molecular vem sendo amplamente empregada em ácaros de interesse econômico, agrário e veterinário (NAVAJAS; FENTON, 2000). Análise de estruturas morfológicas de valor taxonômico, tal como a quetotaxia das placas e pernas são empregados. No entanto, a identificação de espécies muito semelhantes com base nos caracteres morfológicos é muitas vezes incerta, como por exemplo, as espécies *Macrocheles glaber* (Müller) e *Macrocheles perglaber* (Filipponi & Pegazzano) (CICOLANI et al., 1981). A disponibilidade de registros da família Macrochelidae no GenBank é limitada, sendo necessário o sequenciamento de mais espécies com o objetivo de fornecer dados auxiliares para a identificação de espécies. O uso das sequências ITS e COI fornece informações apropriadas para o estudo filogenético das espécies de ácaros, a região ITS é apropriada para diferenciar espécies do mesmo gênero enquanto o COI é adequado em estudos de variabilidade genética intraespecífica (AVISE et al. 1987; NAVAJAS et al. 1994; HEBERT et al. 2003; NIOGRET et al. 2007; MENDONÇA et al. 2011).

Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento das espécies presentes em pastagem de gado no município de Guaratinguetá, combinando os aspectos morfológicos e genéticos para identificação das espécies encontradas, disponibilizando as sequências em bancos de dados públicos, aumentando assim o número de sequências da família Macrochelidae disponíveis para análise.

## 2.2 MATERIAIS E METÓDOS

### 2.2.1 Local de coleta

As amostragens foram feitas em propriedades localizadas no município de Guaratinguetá – SP, entre os anos de 2017 e 2018, sendo coletadas cinco (05) amostras mensais, excetuando-se os meses de novembro de 2017 e fevereiro e março de 2018, totalizando 55 amostras. Foram coletadas placas inteiras de esterco com aspecto externo seco (como uma casca que recobre a placa) e seu interior úmido. As coordenadas geográficas das propriedades rurais onde se efetuaram as coletas são as seguintes: 47°31'77" L (Long), 74°85'158" N (Lat.); 47°53'13" L (Long), 74°83' 469" N (Lat.); 47°63'42" L (Long.), 74°84' 4242" N (Lat.); 47°12'57" L (Long.), 74°85' 987" N (Lat.); 47°03'65" L (Long.), 74°80' 857" N (Lat.).

### 2.2.2 Triagem do material

No laboratório, colocou-se as amostras de esterco no funil de Berlese-Tullgen adaptado (OLIVEIRA et al., 2001), onde foram mantidas por quatro dias para a recuperação dos macroquélídeos eventualmente presentes (o tempo de quatro dias foi determinado empiricamente devido ao tamanho do funil e sua capacidade de processar o material), e acondicionados em frascos de vidro contendo álcool 70% devidamente identificados (Figura 1).



**Figura 1.** Amostras no funil de Berlese-Tullgren para recuperação dos ácaros. **Fonte:** Anjos, K.A., 2018

A triagem do material coletado foi realizada através de microscópio estereoscópio (Lupa) usando ferramenta de apoio (placas de Petri, pipeta Pasteur e agulhas modificadas na forma de pá). As espécies reconhecidas como pertencentes à família Macrochelidae foram separadas dos demais ácaros e insetos e mantidas em álcool etílico absoluto para a preservação do DNA. Espécies muito semelhantes aos macroquelídeos também eram separadas para montagem de lâminas para confirmação da espécie. Os demais ácaros e insetos foram preservados para futuros estudos e o material analisado foi depositado no Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico – SP.

### 2.2.3 Identificação morfológica da família Macrochelidae

Para observação e identificação dos macroquelídeos, os indivíduos foram montados em lâminas para microscopia foram montadas em meio de Hoyer. Os espécimes foram limpos e clarificados com solução de KOH 10% por um período de no mínimo cinco minutos em estufa a 50°C. Posteriormente os indivíduos foram montados inteiros ou dissecados; para dissecação os exemplares receberam um corte látero-longitudinal separando as placas ventrais da placa dorsal. As lâminas preparadas permaneceram em estufa a 50°C durante sete dias para secagem (MORAES; FLECHTMAN, 2008).

Apenas fêmeas das espécies foram montadas, devido à falta de chaves dicotômicas para as formas imaturos e para os machos das espécies. A identificação ocorreu através de microscopia óptica (Carlzeiss Jena) usando chaves de identificação para família, gênero e espécie de macroquelídeos. As espécies coletadas foram identificadas seguindo publicações taxonômicas de Evans e Brownig (1956), Filipponi e Pegazzano (1960), Halliday (1986), Halliday (2000), Mašán (2003), Hartini e Takaku (2010), Ahadiyat et al. (2014), Özbek et al. (2015), Azevedo et al. (2017), Krantz (2018).

#### 2.2.4 Extração de DNA

As fêmeas de macroquelídeos foram separadas em morfoespécies e acondicionadas em microtubos de 1,5 ml com álcool etílico absoluto em grupos de três ou quatro exemplares. Indivíduos de identificação inequívoca de acordo com critérios morfológicos, foram submetidos à extração de DNA para posterior sequenciamento do seu rRNA nuclear e da citocromo oxidase mitocondrial (COI). Estes indivíduos tiveram os seus músculos e órgãos internos removidos com o auxílio de agulhas para extração de DNA. O exoesqueleto foi fixado em lâminas permanentes para posterior identificação morfológica.

O protocolo de extração foi adaptado do método estabelecido por Li et al. (2003). Cada indivíduo foi refrigerado em nitrogênio líquido por 15 s e macerado com auxílio de um pistilo descartável. Foram adicionados 25µl de tampão de isolamento de DNA (100 mM de Tris pH 8,3 e 500 mM de KCL) e macerado com auxílio do pistilo. Novamente a amostra foi refrigerada em nitrogênio líquido por 15 s e macerado com pistilo. Em seguida foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 s e incubada em banho maria à temperatura de 100°C por 4 min. As amostras foram mantidas em freezer a – 20°C até a amplificação.

#### 2.2.5 Amplificação da região ITS II

A amplificação da região do ITS II foi realizada com os primers ITS4 Reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e 5.8S Forward (5' – CTTAGTCCTTAAATCGATGAAAAACATAG -3'). A PCR foi realizada num volume de



25 µl contendo 2µl da extração de DNA dos ácaros, utilizando a enzima Dream Taq Green™ polimerase na concentração recomendada pelo fabricante (Thermo Scientific®) de 0,2 mM de cada dNTP, de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e de 10 nM de cada oligonucleotídeo. A amplificação foi feita em um termociclador Multigene-Minimodelo TC-020-24 com a seguinte programação: 95°C durante 3 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 52°C durante 30 s e 72°C por 1 min. Ao final dos 40 ciclos foram adicionados 5 min a 72°C para permitir a síntese das fitas de DNA parcialmente amplificadas. Os controles negativos foram executados simultaneamente.

#### 2.2.6 Amplificação da região ITS (ITS I, 5.8S e ITS II)

A amplificação da região contendo o ITS I e o ITS II foi realizada com os primers ITS4 Reverse (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') e ITS1 Forward (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGA -3') A PCR foi realizada num volume de 25 µl contendo 1,5 µl da extração de DNA dos ácaros, utilizando a enzima Dream Taq Green™ polimerase na concentração recomendada pelo fabricante (Thermo Scientific®) de 0,2 mM de cada dNTP, de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e de 10 nM de cada oligonucleotídeo. A amplificação foi realizada no termociclador Multigene-Minimodelo TC-020-24 com a seguinte programação: 94°C durante 3 min, seguidos por 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 49°C durante 1 min e 72°C por 1 min. Ao final dos 35 ciclos foram adicionados 5 min a 72°C para permitir a síntese das fitas de DNA parcialmente amplificadas. Os controles negativos foram executados simultaneamente.

#### 2.2.7 Amplificação da região COI

A amplificação da região da Citocromo Oxidase foi realizada com o par de primers LCO1490 + HCO2198 (FOLMER et al., 1994; KNEE, 2017). A PCR foi realizada num volume de 25 µl contendo 2µl da extração de DNA dos ácaros utilizando a enzima 2X Taq DNA Polimerase Red™ na concentração recomendada pelo fabricante. (Ampliqon®): 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 75 mM Tris-HCl pH 8.5, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S0<sub>4</sub>, Tween 20 0,1%, 10 nM de cada oligonucleotídeo e 0,25 U/µL de Taq DNA polimerase. A amplificação

realizada no termociclador Multigene-Mini™, modelo TC-020-24 com o seguinte programa: ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 s, reanelamento dos primers a 45°C durante 45 s, 72°C durante 1 min e uma extensão final a 72°C durante 5 min. para permitir o alongamento dos fragmentos de DNA sintetizados de forma incompleta. Os controles negativos foram executados simultaneamente.

#### 2.2.8 Purificação dos fragmentos de DNA amplificado

A purificação dos fragmentos de DNA foi realizada através de precipitação com polietilenoglicol (Schmitz; Riesner, 2006). Nele o produto de PCR de 400 a 600 pb foi purificado em microtubo de 1,5 mL com uma mistura de 1,6 µl de EDTA a 0,5 M, 21 µl de PEG 6000 a 50% e 8,1 µl de NaCl a 5 M. Em seguida foi agitado em vórtex por 1 min, centrifugado durante 10 min a 14.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Em seguida foram acrescentados 125 µl de etanol 70% e o tubo centrifugado por 10 min a 14.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi seco a 37°C por 30 min e resuspenso em 10 µl de água ultrapura.

#### 2.2.9 Sequenciamento e alinhamento dos fragmentos de DNA

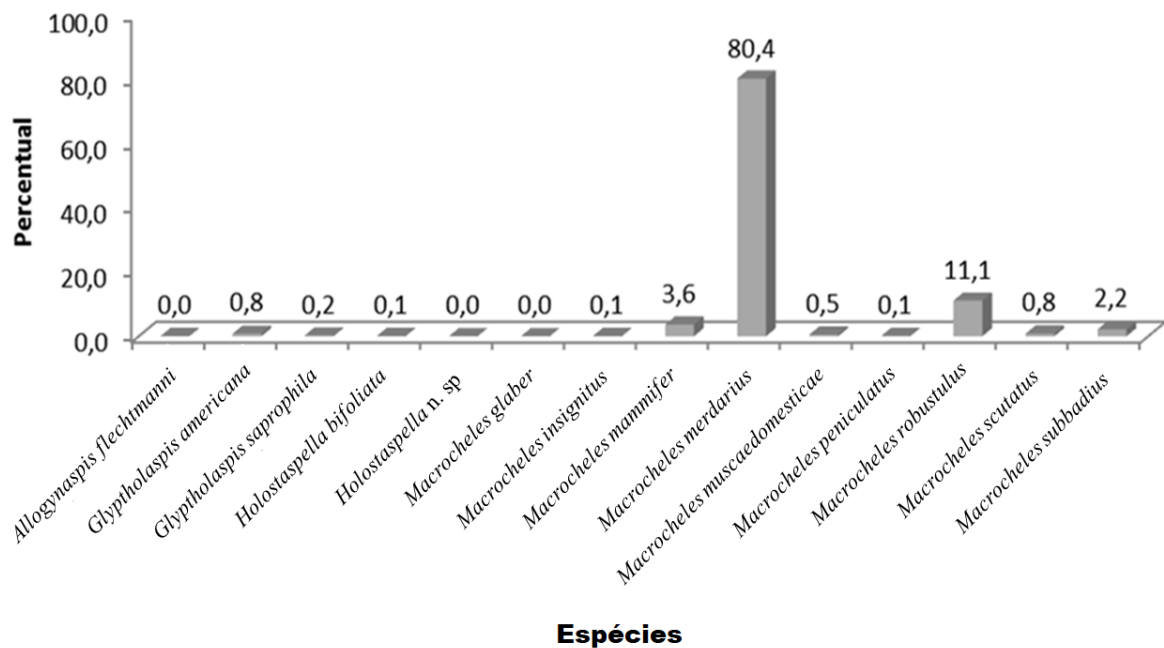
O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado com o reagente Big Dye 3.1™ (Life Technologies®) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 xL (Life Technologies®).

O alinhamento foi feito com auxílio do programa ClustalW para posterior montagem de árvores filogenéticas pelo programa Mega10.0.5™ utilizando-se os métodos de Neighbor-Joining, máxima parcimônia e máxima probabilidade com simulações de 10.000 repetições (bootstraps). Todos estes programas foram utilizados, à exceção dos bootstraps, com os seus parâmetros originais.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Fauna de ácaros da família Macrochelidae encontrada em esterco bovino no município de Guaratinguetá

Observou-se que das 55 amostras de esterco bovino coletadas ao longo do ano de 2017 e início de 2018 foram obtidos 16.116 ácaros pertencentes à família Macrochelidae com quatorze espécies. Destes indivíduos, 9.246 eram fêmeas, 1.255 machos e 5.615 imaturos. A espécie *Macrocheles merdarius* (Berlese) teve a maior representatividade seguida das espécies *Macrocheles robustulus* (Berlese), *Macrocheles mammifer* Berlese e *Macrocheles subbadius* (Berlese) respectivamente. As demais espécies representaram um índice abaixo de 1% (Figura 2).



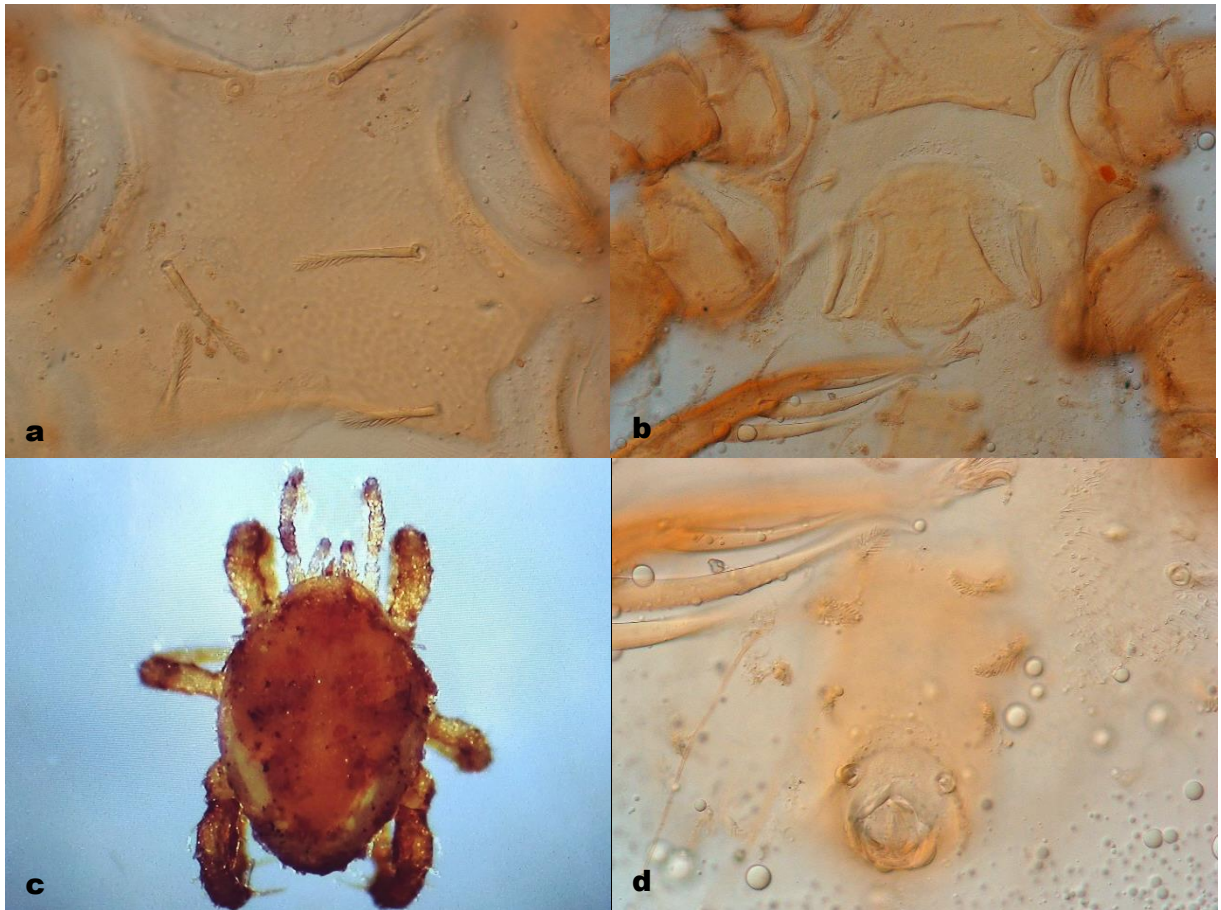
**Figura 2.** Porcentagem de fêmeas de macroquelídeos recuperadas das coletas no período de março de 2017 a abril de 2018. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

#### 2.3.1.1 Lista das espécies encontradas nas amostras de Guaratinguetá.

Família Macrochelidae Vitzthum, 1930

Gênero *Allogynaspis* Krantz, 2018

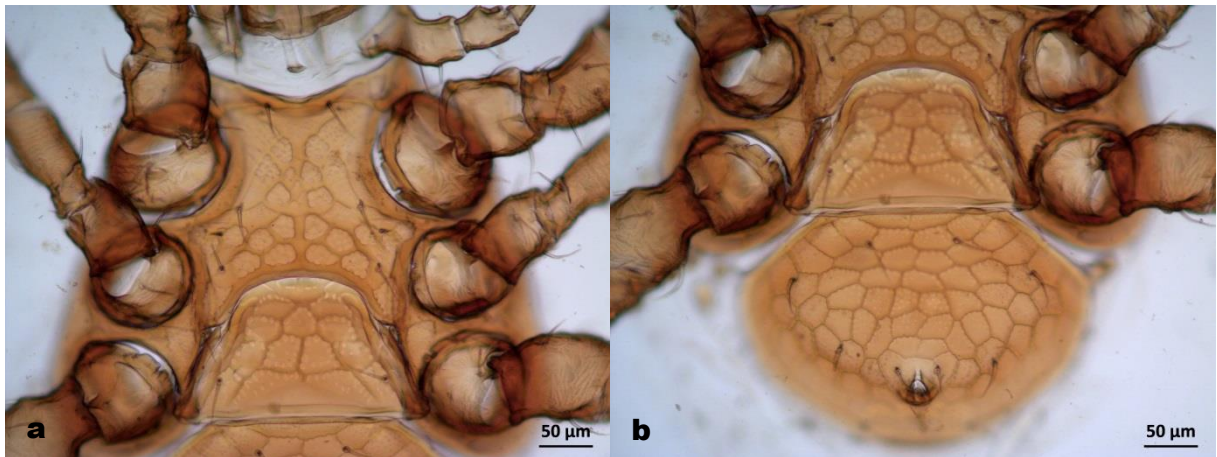
*Allogynaspis flechtmanni* Krantz, 2018



**Figura 3.** *Allogynaspis flechtmanni* (a) Escudo esternal. (b) Escudo metaesternal. (c) Escudo dorsal. (d) Escudo ventrianal. Aumento de 35 x (c) e 400 x (a, b e d). **Fonte:** Anjos, K.A., 2019 e Azevedo, L. H., 2019

Gênero *Glypholaspis* Filipponi & Pegazzano, 1960

*Glypholaspis americana* (Berlese, 1888)



**Figura 4.** *Glypholaspis americana*. (a) Escudos esternal. (b) Escudo ventrianal. Aumento 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Glypholaspis saprophila* Mašán, 2003



**Figura 5.** *Glypholaspis saprophila* (a) Escudos ventrais. (b) Escudo dorsal. Aumento 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

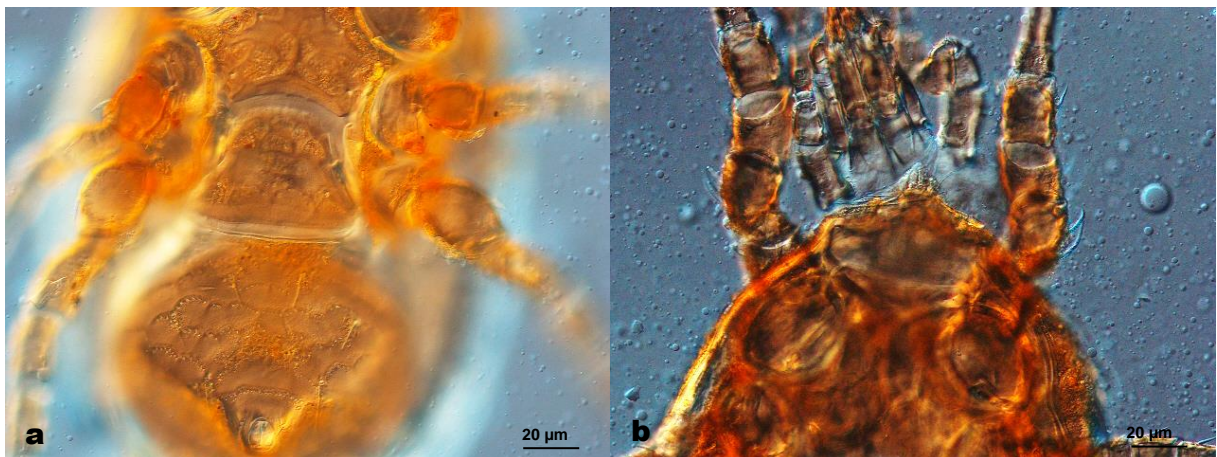
Gênero *Holostaspella* Berlese, 1903

*Holostaspella bifoliata* (Trägårdh, 1952)



**Figura 6.** *Holostaspella bifoliata*. (a) Escudos ventrais. (b) Projeção na margem superior e cerda j1. Aumento 100x (a) e 200 x (b). **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

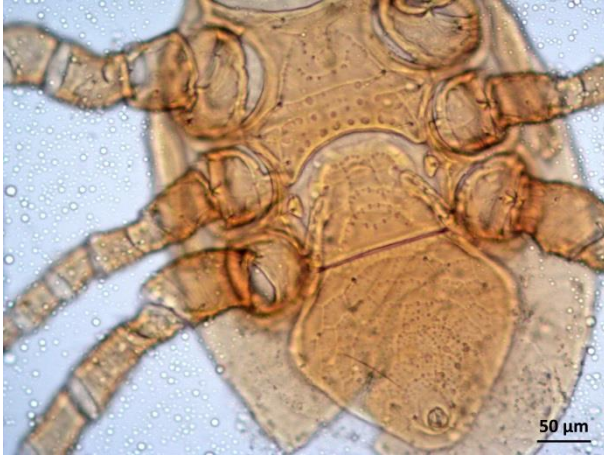
*Holostaspella* n. sp.



**Figura 7.** *Holostaspella* n. sp. (a) Escudos ventral. (b) Projeção na margem superior e cerda j1 da espécie. Aumento 200 x. **Fonte:** Azevedo, L.H., 2019

*Macrocheles* Latreille, 1829

*Macrocheles glaber* (Müller, 1860)



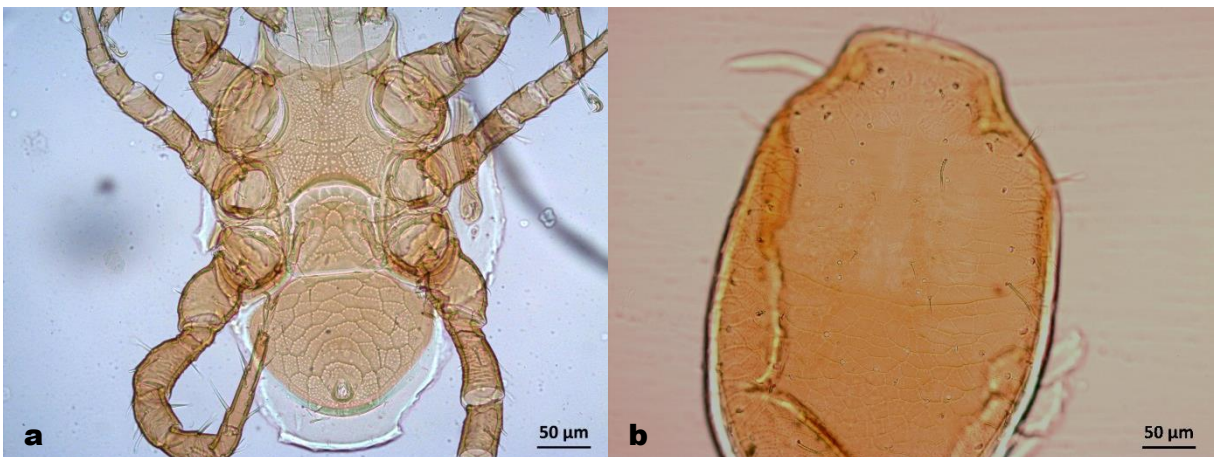
**Figura 8.** *Macrocheles glaber*. Escudos ventrais. Aumento 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles insignitus* Berlese, 1918



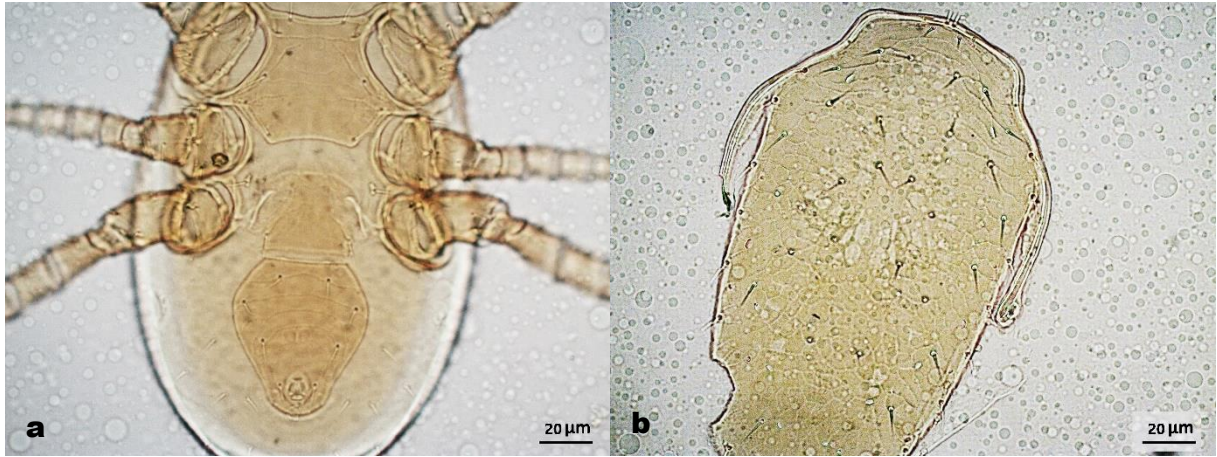
**Figura 9.** *Macrocheles insignitus*. Escudos ventrais. Aumento 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles mammifer* Berlese, 1918



**Figura 10.** *Macrocheles mammifer*. (a) Escudos ventrais. (b) Escudo dorsal. Aumento 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles merdarius* (Berlese, 1889)



**Figura 11.** *Macrocheles merdarius*. (a) Escudos ventrais. (b) Escudo dorsal. Aumento 200 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli, 1772)



**Figura 12.** *Macrocheles muscaedomesticae*. Escudos ventrais. Aumento de 100 x e 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles peniculatus* Berlese, 1918





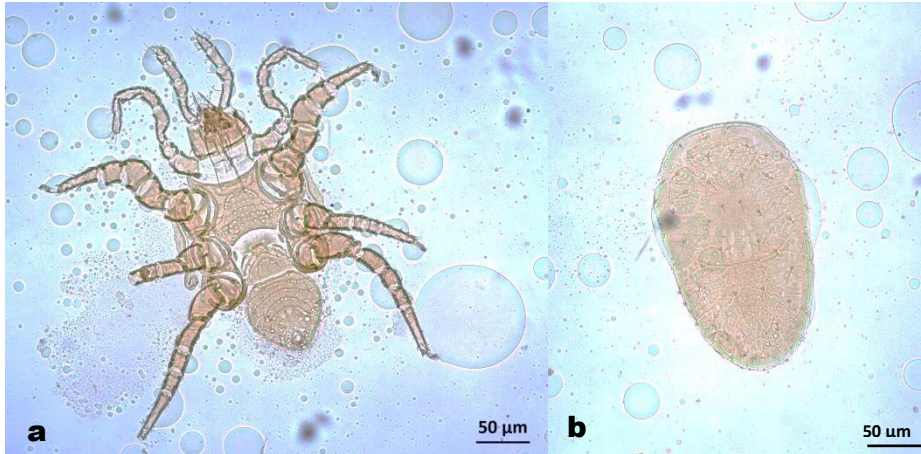
**Figura 13.** *Macrocheles peniculatus*. Escudos ventrais. Aumento 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles robustulus* (Berlese, 1904)



**Figura 14.** *Macrocheles robustulus*. (a)Escudos ventrais. (b)Escudo dorsal. Aumento 100 x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles scutatus* (Berlese, 1904)



**Figura 15.** *Macrocheles scutatus* (a) Escudos ventrais. (b) Escudo dorsal. Aumento 100x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

*Macrocheles subbadius* (Berlese, 1904)



**Figura 16.** *Macrocheles subbadius* (a) Escudos ventrais. Aumento 100x. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

### 2.3.2 Análises genéticas

Das quatorze espécies identificadas morfológicamente apenas algumas espécies foram sequenciadas, pois nem todas apresentaram amplificação dos fragmentos de DNA esperados pelo PCR, o que restringiu as análises moleculares.

### 2.3.2.1 Análises da região ITS II

O ITS II foi amplificado a partir de 21 espécimes de macroquelídeos representando sete espécies de três gêneros (*Glypholaspis*, *Holostaspella* e *Macrocheles*) sequenciados neste estudo e alinhados entre si. As análises de Neighbour-Joining (K2P) mostraram que não houve distância intraespecífica em nenhuma das espécies analisadas. Os resultados obtidos mostraram que a região ITS II possui um intervalo de comprimento de 173 pb a 260 pb.

Nota-se que as espécies identificadas morfológicamente se agruparam nos mesmos ramos da árvore filogenética, principalmente porque não houve variabilidade genética intraespecífica em nenhuma delas, conforme a tabela I. As espécies pertencentes aos gêneros *Macrocheles* e *Glypholaspis*, conforme o esperado, se agruparam em dois ramos parafiléticos distintos. O mesmo não ocorreu para o gênero *Holostaspella* que se agrupou monofileticamente com as espécies do gênero *Macrocheles*. Este agrupamento apresenta uma segurança significativa devido ao alto valor de bootstraps (99%).

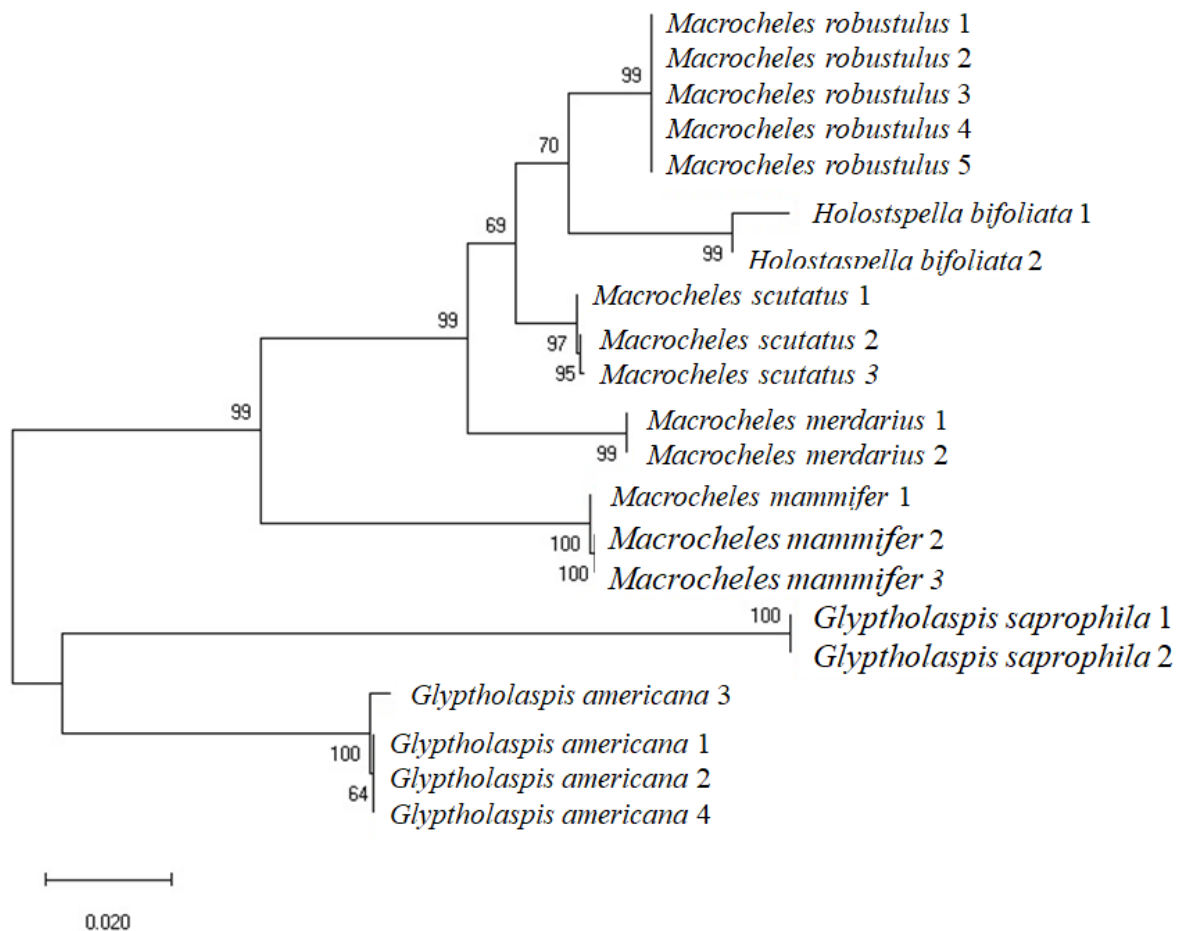
A Tabela I demonstra a proximidade genética encontrada entre a espécie *Holostaspella bifoliata* (Trägårdh) e as espécies *Macrocheles robustulus* (Berlese) e *Macrocheles scutatus* (Berlese), que foi de 3,02 e 3,88 respectivamente. Essas espécies se agruparam parafileticamente com *Macrocheles merdarius* (Berlese) com alto suporte bootstraps (99%) com uma média de distância interespecífica de 23,56. *M. merdarius* somado ao grupo anterior se agrupou parafileticamente com *Macrocheles mammifer* Berlese com uma média de distância genética interespecífica de 40,89. Ambas as espécies do gênero *Glypholaspis* se agruparam parafileticamente em relação as demais espécies dos gêneros *Holostaspella* e *Macrocheles* com as respectivas médias de distância para *Glypholaspis americana* (Berlese) 47,55 e *Glypholaspis saprophila* Mašán 63,9. A distância interespecífica destas duas espécies foi de 46,38 (Figura 17).

A distância genética interespecífica da espécie *G. americana* em relação às demais foi de 36,52% a 54,19% sendo menor a distância com *G. saprophila*, que por sua vez mostrou uma maior distância entre as espécies *M. mammifer* (55,62%) e *M. merdarius* (41,24%). As espécies *H. bifoliata*, *M. robustulus* e *M. scutatus* foram as mais próximas entre si com valores menores que 4%. *M. mammifer* apresentou a maior distância entre as demais espécies com índice acima de 50%. *M. merdarius* e *M. scutatus* exibiram uma distância de 28,98% entre si (Tabela I).

**Tabela I.** Matriz de distâncias genéticas alinhadas aos pares das espécies sequenciadas para a região ITS II

Espécie	Nº de indivíduos analisados	<i>Macrocheles robustulus</i>	<i>Macrocheles scutatus</i>	<i>Macrocheles mammifer</i>	<i>Macrocheles merdarius</i>	<i>Glypholaspis americana</i>	<i>Glypholaspis saprophila</i>	<i>Holostaspella bifoliata</i>
<i>Macrocheles robustulus</i>	5	0	3,45	40,09	24,57	34,48	63,79	3,02
<i>Macrocheles scutatus</i>	3	3,45	0	40,09	21,98	33,62	64,65	3,88
<i>Macrocheles mammifer</i>	3	40,09	40,09	0	42,06	42,55	64,65	40,52
<i>Macrocheles merdarius</i>	2	24,57	21,98	42,06	0	30,47	61,8	24,14
<i>Glypholaspis americana</i>	4	34,48	33,62	42,55	30,47	0	46,38	34,05
<i>Glypholaspis saprophila</i>	2	63,79	64,65	64,65	61,8	46,38	0	64,65
<i>Holostaspella bifoliata</i>	2	3,02	3,88	40,52	24,14	34,05	64,65	0

**Fonte:** Anjos, K.A., 2019



**Figura 17.** Árvore filogenética da região ITS II dos macroquelídeos coletados do município de Guaratinguetá. Construída através do programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis versão 10.0.5 (MEGA). **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

### 2.3.2.2 Análise da região ITS (ITS I, 5.8S e ITS II)

Foram sequenciadas cinco espécies, sendo que quatro foram depositadas no genbank com os seguintes números de acesso: *Glyphtholaspis saprophila* (MK547113); *Holostaspella bifoliata* (MK547115); *Macrocheles merdarius* (MK543493) e *Macrocheles scutatus* (MK547084).

O trecho correspondente ao ITS I, 5.8S e parte do ITS II das espécies sequenciadas foi alinhado com as sequências já disponíveis para essa família do GenBank (DQ986380, DQ479400, DQ986377 e DQ986379). Os resultados obtidos através das análises de alinhamento de todas as sequências (entre si aos pares) mostraram que a sua distância

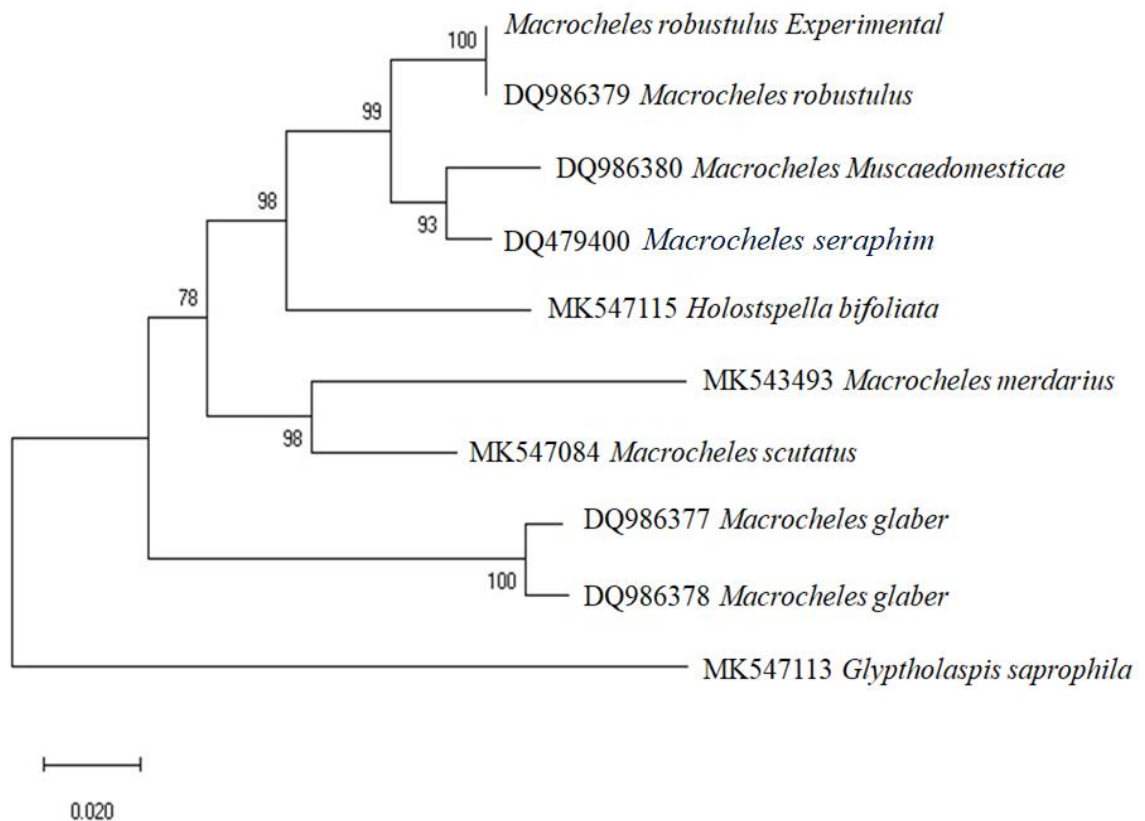
interespecífica variou entre 25,14 e 4,97 (Tabela II). A espécie *Macrocheles robustulus* sequenciada neste estudo não teve variação intraespecífica com a sequência da mesma espécie disponível no GenBank, tendo se agrupado parafileticamente às sequências de *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) e de *Macrocheles seraphim* Niogret & Nicot (Figura 18), com uma média de distância genética de 5,1. Estas espécies citadas se agruparam parafileticamente com *Holostaspella bifoliata*, com uma distância genética média de 9,77 (Tabela II).

As espécies *M. scutatus* e *M. merdarius* se agruparam parafileticamente com *M. robustulus*, *M. muscaedomesticae*, *M. seraphim* e *H. bifoliata*, com uma média de distância genética de 11,00 e 15,15, respectivamente. Por sua vez, todas estas seis espécies se agruparam parafileticamente com duas sequências ligeiramente diferentes de *Macrocheles glaber* (Müller) disponíveis no GenBank, com distância genética de 1,69 entre si. A média da distância genética destas duas sequências de *M. glaber* com o grupo de seis sequências citadas acima é de 16,8 e 16,69, respectivamente. Finalmente, a análise de Neighbor Joining posicionou a sequência obtida de *G. saprophila* de forma parafilética com todas as sequências restantes, com uma média de distância genética de 24,08 (Figura 18).

**Tabela II.** Matriz de distâncias genéticas alinhadas aos pares das espécies sequenciadas para a região ITS (ITS I, 5.8S, ITSII).

Espécies	MK547113 <i>Glyphotaspis saprophila</i>	MK547115 <i>Holostaspella bifoliata</i>	MK543493 <i>Macrocheles merdarius</i>	MK547084 <i>Macrocheles scutatus</i>	Experimental <i>Macrocheles robustus</i>	DQ986380 <i>Macrocheles muscaedomesticae</i>	DQ479400 <i>Macrocheles seraphim</i>	DQ986377 <i>Macrocheles glaber</i>	DQ986378 <i>Macrocheles glaber</i>	DQ986379 <i>Macrocheles robustus</i>
MK547113 <i>Glyphotaspis saprophila</i>	0	23,78	25,14	21,25	22,48	24,04	25,62	25,44	25,16	23,88
MK547115 <i>Holostaspella bifoliata</i>	23,78	0	15,64	9,3	8,61	10	10,12	16,59	16,56	9,19
MK543493 <i>Macrocheles merdarius</i>	25,14	15,64	0	9,5	13,32	15,72	15,94	20,71	20,89	15,64
MK547084 <i>Macrocheles scutatus</i>	21,25	9,3	9,5	0	9,69	12,36	12,66	15,44	15,63	10,96
Experimental <i>Macrocheles robustus</i>	22,48	8,61	13,32	9,69	0	5,24	4,97	14,8	15,21	0
DQ986380 <i>Macrocheles muscaedomesticae</i>	24,04	10	15,72	12,36	5,24	0	2,93	17,08	17,05	5,22
DQ479400 <i>Macrocheles seraphim</i>	25,62	10,12	15,94	12,66	4,97	2,93	0	15,53	15,49	3,85
DQ986377 <i>Macrocheles glaber</i>	25,44	16,59	20,71	15,44	14,8	17,08	15,53	0	1,69	14,96
DQ986378 <i>Macrocheles glaber</i>	25,16	16,56	20,89	15,63	15,21	17,05	15,49	1,69	0	15,37
DQ986379 <i>Macrocheles robustus</i>	23,88	9,19	15,64	10,96	0	5,22	3,85	14,96	15,37	0

\*Espécies que possuem sequencias no GenBank depositado por outros autores: DQ986380 *Macrocheles muscaedomesticae*, DQ479400 *Macrocheles seraphim*, DQ986377 *Macrocheles glaber*, DQ986378 *Macrocheles glaber*, e DQ986379 *Macrocheles robustulus* **Fonte:** Anjos, K.A., 2019



**Figura 18.** Árvore filogenéticas da região ITS alinhadas com as sequências presentes no Genbank. Construída através do programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis versão 10.0.5 (MEGA). **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

### 2.3.2.3 Análises da região COI

As sequências obtidas para a região COI apresentaram um intervalo de comprimento de 460 pb a 640 pares de bases. O trecho correspondente ao COI, das espécies sequenciadas foi alinhado com as sequências para essa família já disponíveis no GenBank (MG41011, MF19274, MF1927, MF192, MF192752, MF192754, MG4095).

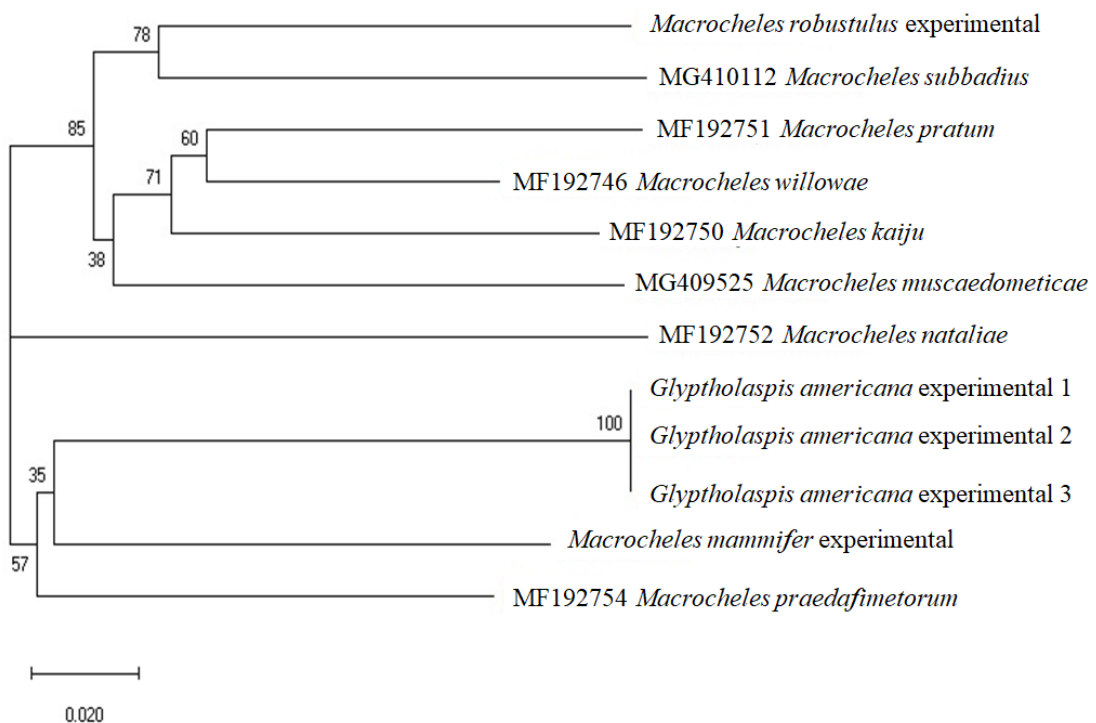
Os resultados obtidos através das análises de alinhamento de todas as sequências (entre si aos pares) mostraram que a sua distância interespecífica variou entre 18,07 a 24,82 (Tabela III). A espécie *Macrocheles robustulus* (Berlese) sequenciada neste estudo se agrupou



parafileticamente à sequência de *Macrocheles subbadius* (Berlese) do GenBank, com uma distância genética de 18,35.

*M. robustulus* apresentou, em média uma distância genética dos demais membros do seu grupo parafilético igual a 20,32. *M. robustulus* e *M. subbadius* se agruparam parafileticamente a um grupo composto pelas espécies *Macrocheles pratense* Kne, *Macrocheles willowae* Kne, *Macrocheles kaiju* Kne e *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli), conforme mostrada na figura 5. Somadas, essas seis sequências se agruparam parafileticamente com *Macrocheles nataliae* Kne e com um grupo composto pelas espécies *M. mammifer*, *Macrocheles praedafimitorum* Kne e *Glyphtholaspis americana* (Berlese). Neste último grupo de três espécies *M. praedafimitorum* se agrupou parafileticamente com *G. americana* e *Macrocheles mammifer* Berlese, que por sua vez se bifurcou em dois ramos, uma para cada espécie (Figura 19).

Os três espécimes de *G. americana* submetidos a sequenciamento não apresentaram variação genética intraespecífica. No entanto, em relação a *M. praedafimitorum* a distância interespecífica foi de 19,42. *M. mammifer* por sua vez apresentou distância genética 18,17 e 19,96 em relação a *M. praedafimitorum* e *G. americana*, respectivamente.



**Figura 19.** Árvore filogenética da região COI, alinhamento das sequências obtidas no estudo com as presentes do GenBank. Construída através do programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis versão 10.0.5 (MEGA).

**Fonte:** Anjos, K.A., 2019

**Tabela III.** Matriz de distâncias genéticas alinhadas aos pares das espécies sequenciadas para a região COI

Espécies	<i>Macrocheles mammifer exprimental</i>	<i>Glyphtholaspis americana experimental 1</i>	<i>Glyphtholaspis americana experimental 2</i>	<i>Glyphtholaspis americana experimental 3</i>	<i>Macrocheles robustus experimental</i>	MG409525 <i>Macrocheles muscaedomesticae</i>	MF192754 <i>Macrocheles praedafimetorum</i>	MF192752 <i>Macrocheles nataliae</i>	MF192750 <i>Macrocheles kaiju</i>	MF192751 <i>Macrocheles pratun</i>	MF192746 <i>Macrocheles willowae</i>	MG410112 <i>Macrocheles subbadius</i>
<i>Macrocheles mammifer exprimental</i>	0.00	19.96	19.96	19.96	21.94	21.40	18.17	21.58	21.58	21.76	23.38	22.30
<i>Glyphtholaspis americana experimental 1</i>	19.96	0.00	0.00	0.00	22.66	23.20	19.42	23.74	20.32	23.02	24.82	24.64
<i>Glyphtholaspis americana experimental 2</i>	19.96	0.00	0.00	0.00	22.66	23.20	19.42	23.74	20.32	23.02	24.82	24.64
<i>Glyphtholaspis americana experimental 3</i>	19.96	0.00	0.00	0.00	22.66	23.20	19.42	23.74	20.32	23.02	24.82	24.64
<i>Macrocheles robustus experimental</i>	21.94	22.66	22.66	22.66	0.00	19.42	19.78	24.64	19.96	20.68	21.22	18.35
MG409525 <i>Macrocheles muscaedomesticae</i>	21.40	23.20	23.20	23.20	19.42	0.00	20.86	23.20	18.71	19.06	20.86	20.86
MF192754 <i>Macrocheles praedafimetorum</i>	18.17	19.42	19.42	19.42	19.78	20.86	0.00	20.86	20.68	23.20	23.92	20.32
MF192752 <i>Macrocheles nataliae</i>	21.58	23.74	23.74	23.74	24.64	23.20	20.86	0.00	21.94	23.20	23.02	24.10
MF192750 <i>Macrocheles kaiju</i>	21.58	20.32	20.32	20.32	19.96	18.71	20.68	21.94	0.00	17.09	17.81	21.58
MF192751 <i>Macrocheles pratun</i>	21.76	23.02	23.02	23.02	20.68	19.06	23.20	23.20	17.09	0.00	17.63	19.06
MF192746 <i>Macrocheles willowae</i>	23.38	24.82	24.82	24.82	21.22	20.86	23.92	23.02	17.81	17.63	0.00	21.22
MG410112 <i>Macrocheles subbadius</i>	22.30	24.64	24.64	24.64	18.35	20.86	20.32	24.10	21.58	19.06	21.22	0.00

\*Espécies que possuem sequencias no GenBank: MG409525 *Macrocheles muscaedomesticae*, MF192754 *Macrocheles praedafimetorum*, MF192752 *Macrocheles nataliae*, MF192750 *Macrocheles kaiju*, MF192751 *Macrocheles pratun*, MF192746 *Macrocheles willowae*, MG410112 *Macrocheles subbadius*. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

## 2.4 DISCUSSÃO

A importância do conhecimento da biodiversidade fornece dados capazes de auxiliar a estabilidade dos ecossistemas impedindo possíveis perturbações que comprometam a sustentabilidade do meio ambiente.

O esterco bovino é um microecossistema rico em material metabólico que favorece o desenvolvimento de uma fauna de invertebrados como ácaros, insetos, nematódeos e outros. No presente estudo, a fauna de ácaros comumente encontrados foi constituída pelas famílias Uropodidae, Oribatidae, Acaridae, Parasitidae, Laelapidae e principalmente pela família Macrochelidae.

O conhecimento da fauna dos ácaros macroquelídeos no Brasil foi influenciado pela entrada da *Haematobia irritans* (L.) (moscas dos chifres) uma das mais importantes pragas do rebanho bovino a partir dos anos 70, espécie cujo três primeiros estádios larvais se desenvolvem no esterco bovino (GUIMARÃES et al, 2001). No estado de São Paulo o levantamento da fauna de esterco bovino foi conduzido principalmente pelos trabalhos de Mendes e Lizaso (1992), Lizaso e Mendes (1994), Mendes (1996), Azevedo et al (2017).

No levantamento da fauna de macroquelídeos em esterco bovino para o município de Guaratinguetá, a maior incidência observada foi das espécies do gênero *Macrocheles*, seguida pelo gênero *Glyphtholaspis*, *Holostaspella* e *Allogynaspis* foi determinada. A diversidade encontrada supera os encontrados por Mendes (1996), Marchiori et al. (2001) e Azevedo et al. (2017), que foram de nove, seis e dez espécies respectivamente.

As espécies *Glyphtholaspis saprophila* e *Macrocheles scutatus* são relatadas neste estudo pela primeira vez no território brasileiro. Além disso, a espécie *Allogynaspis flechtmani* Krantz, considerada de vida livre, esteve presente no esterco bovino. Foi encontrada uma nova espécie para o gênero *Holostaspella*. Neste levantamento foram encontradas duas espécies do gênero *Glyphtholaspis*: *Glyphtholaspis americana* e *G. saprophila*. Nos levantamentos realizados em esterco bovino por Mendes (1996), Marchiori et al. (2001) e Azevedo et al. (2017) relataram apenas espécie deste gênero: *Glyphtholaspis confusa*.

A espécie mais abundante foi *Macrocheles merdarius*, fato que se assemelha aos obtidos por Azevedo et al. (2017). Entretanto, estes resultados discordam dos obtidos por Cicolani (1992), Mendes (1996) e Marchiori et al. (2001), onde a maior quantidade de

espécies encontradas foram, respectivamente, *Macrocheles glaber* (Müller), *Macrocheles pegraber* Filipponi & Pegazzano e *Glyptholaspis confusa* (Foà).

A grande quantidade de espécimes de *M. merdarius* neste estudo pode estar relacionada a sobrevivência da espécie, que devido ao seu pequeno porte, pode servir como presa de ácaros maiores, fato que foi observado durante os procedimentos na criação desses ácaros em laboratório. Também pode estar relacionada a colonização do esterco, uma vez que esta espécie é forética em besouros coprófagos como citado por Rodrigues et al. (2001). Além disso, *M. merdarius* é uma das primeiras a colonizar o esterco fresco (Cicolani, 1992) apresenta vantagem alimentar em relação as espécies que colonizam mais tardiamente o esterco.

Azevedo et al. (2015) realizaram um grande levantamento do histórico da família Macrochelidae e relataram a necessidade de uma revisão desses ácaros, uma vez que as descrições originais das espécies não apresentam dados morfológicos suficientes, gerando sinonímias. Nessa mesma linha, Niogret et al., (2007) considera que os caracteres morfológicos são por vezes inconspícuos e alguns deles podendo ser inadequados para classificar as espécies.

No Brasil, devido à escassez dos estudos taxonômicos relacionados a esta família, não existe uma chave de identificação própria para as espécies. Diante disso, a identificação das espécies neste trabalho foi realizada através do uso de diversas chaves elaboradas em outros países com caracteres específicos das espécies encontradas no exterior. As dificuldades encontradas na identificação estão relacionadas às espécies de aspectos semelhante, tamanho reduzido e/ou pelo impedimento na visualização de alguns caracteres. Isso levou à busca de outra ferramenta, a biologia molecular, para a confirmação da identificação morfológica.

A reduzida quantidade de sequências de DNA de espécies da família Macrochelidae disponíveis em bases de dados públicas limitou a análise dos resultados, bem como as sequências obtidas de diferentes espécies em cada um dos marcadores escolhidos.

O marcador genético ITS tem sido usado amplamente em estudo de filogenia molecular. Esta região consiste de três porções distintas chamadas de ITS I, 5.8S e ITS II que flanqueiam as cópias gênicas contíguas do rRNA nuclear 18S e 28S. A conformação estrutural deste transcrito é crucial para maturação dos rRNA 18S e 28S, de acordo com a conservação evolutiva das suas sequencias de DNA (COLEMAN, 2003).

Apesar da alta conservação evolutiva alguns nucleotídeos do ITS II aparentemente evoluem a uma taxa próxima a neutra, ou seja, não estão sujeitos a seleção natural (SCHLÖTTERER et al, 1994). Os resultados da árvore filogenética para esta região

corroboram estas características do ITS II, uma vez que indivíduos identificados morfologicamente como pertencentes a uma mesma espécie não apresentaram variabilidade genética intraespecífica.

Os espécimes de *Macrocheles robustulus* alinhados entre si para a região do ITS demonstraram a ausência de intraespecificidade, apesar da separação geográfica entre elas. O agrupamento parafilético desta espécie com as espécies *Macrocheles muscaedomesticae* e *Macrocheles seraphim* coincide com o obtido por Niogret et al (2007) e por Niogret e Nicot (2008) para as mesmas espécies avaliadas. Por sua vez *Holostaspella bifoliata* forma um grupo monofilético com as três espécies citadas acima, evidenciando um padrão evolutivo entre esses dois gêneros. Esse resultado foi similar ao obtido neste mesmo estudo para a região do ITS II entre as espécies *M. robustulus*, *H. bifoliata*, *M. scutatus* e *M. merdarius*.

As espécies *M. scutatus* e *M. merdarius*, para região ITS se mantiveram próximas a *H. bifoliata*, porém em um ramo mais distante de *M. robustulus*. A espécie *G. saprophila*, por sua vez, se manteve separada das espécies dos outros dois gêneros.

O posicionamento filogenético inesperado da espécie *H. bifoliata* junto às demais espécies de *Macrocheles* diverge em relação à morfologia que as posicionam em gêneros diferentes. Entretanto, em uma abordagem de taxonomia integrativa, vários aspectos são considerados na classificação de um organismo como: ecológicos, geográficos, biológicos e moleculares, entre outros, cada um com o peso relativo diferente a ser avaliado de forma específica.

Segundo Mašán (2003) há diferenciação morfológica pelas seguintes características: o gênero *Holostaspella* possui uma projeção na margem anterior do escudo dorsal onde se insere a cerda j1; o fêmur II com formações (esporão ou proeminência) esclerotizadas; seta mv do tarso II possui forma de espinho e o escudo ventrianal pode ter até 4 setas pré-anais. O gênero *Macrocheles* não possui projeção, geralmente a margem anterior é arredondada; o fêmur II não possui formações esclerotizadas; tarso II não apresentam modificações nas setas e o escudo ventrianal contém, no máximo, 3 setas pré-anais.

Lizaso et al. (1992) descreveram duas espécies, *Macrocheles badernus* e *Macrocheles jocosus* para região neotropical. Nota-se que ambas apresentam escudo dorsal levemente afunilado na região anterior (onde se insere a cerda j1), quase como uma projeção, aspectos semelhantes ao gênero *Holostaspella*.

Há evidência de um padrão evolutivo entre grupos que podem estar relacionados com o fluxo gênico e com as modificações ambientais. Entretanto, uma avaliação cuidadosa exige

maiores estudos usando outros marcadores para melhor esclarecer a posição do gênero *Holostaspella*.

O uso do citocromo c oxidase I mitocondrial como marcador genético tem sido mais uma ferramenta na identificação de espécies de animais (Hebert et al. 2003). Este marcador também é conservado evolutivamente à semelhança do ITS. Porém, esta conservação é menor em comparação com ITS II, o que permite o estudo de variabilidade genética intraespecífica. A partenogênese tem considerável participação na reprodução dos ácaros da família Macrochelidae e, isto aumenta o seu viés de transmissão hereditária apenas nas linhagens das fêmeas. Em contraste com o ITS II, este padrão até onde se sabe não é sujeito a recombinação.

Apesar das poucas espécies analisadas com o marcador COI, a árvore filogenética obtida agrupou as espécies do gênero *Macrocheles* de forma similar ao agrupamento obtido nas árvores filogenéticas para o ITS. Esse resultado também confirma as observações morfológicas usadas como critério de determinação de espécie. Pode-se estabelecer um paralelo entre o ramo monofilético onde se encontram as espécie *M. robustulus* e *Macrocheles kaiju* com o ramo correspondente ao relatado por Knee (2017), onde estão as espécies *M. kaiju* e *Macrocheles subbadius*. Entretanto, nesse estudo foram adicionadas as sequências correspondentes às espécies *M. robustulus* e *M. muscaedomesticae*, que se agruparam no mesmo grupo correspondente ao estudo de Knee (2017).

Também foi observado que *M. robustulus* se mostrou evolutivamente mais próxima de *Macrocheles subbadius*, em contraste com as distâncias encontradas por Knee (2017), que o posicionou mais próximo de *Macrocheles pratense*.

Os três espécimes de *G. americana* sequenciados não apresentaram distância intraespecífica. Verifica-se que *G. americana* se agrupou com *Macrocheles mammifer*, de forma similar ao apresentado na árvore filogenética do ITS II. Essas duas espécies são morfolologicamente semelhantes, o que pode ser um indício de que *M. mammifer* foi a primeira espécie do gênero *Macrocheles* a se diferenciar do ancestral em comum com o gênero *Glyptolaspis*.

## 2.6 CONCLUSÃO

As amostras obtidas no município de Guaratinguetá mostraram uma grande diversidade de ácaros da Família Macrochelidae presentes no esterco bovino, com quatorze espécies, duas delas novos registros de ocorrência no Brasil, *Glyptholaspis saprophila* e *Macrocheles scutatus* e, uma nova espécie do gênero *Holostaspella*.

O estudo molecular confirmou a identificação morfológica das espécies sequenciada. Demonstrou também que o gênero *Holostaspella* está mais próximo geneticamente do gênero *Macrocheles* do que do gênero *Glyptholaspis*.

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHADIYAT, A.; BAROOZEH, S.; FARAHANI, V.R.F.; AJELLEH, S.M. Further information on morphological characteristics of *Macrocheles mammifer* Berlese (Mesostigmata: Eviphidoidea: Macrochelidae). *Pers. Jour. Acar.*, v.3, n.3, p.235–240, 2014.
- AMPLIQON. PCR Enzymes & Reagentes. Odense, Denmark. 2018
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; MARTIN BALL, R.; BERMINGHAM, E.; TRIP, L.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridger Between Population Genetics and Systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v.18, p.489-522, 1987.
- AZEVEDO, L. H.; CASTILHO, R. C.; BERTO, M. M.; MORAES, G. J. Macrochelid mites (Mesostigmata: Macrochelidae) from São Paulo state, Brasil, with description of a new species of *Macrocheles*. **Zoo.** v.4269, n.3, p.413-426, 2017.
- AZEVEDO, L.H.; EMBERSON, R.M; ESTECA, F.C.N.; MORAES, G.J. Macrochelid Mites (Mesostigmata: Macrochelidae) as Biological Control Agents. In: CARRILLO, D.; MORAES, G.J.; PEÑA, J.E. (Ed.). **Prospects for Biological control of Plant Feeding Mites and other harmful organisms**. 19. ed. Springer International Publishing Switzerland: *Springer International Publishing*, 2015. 103p. Chap. 4.
- CICOLANI, B. Macrochelid mites (Acari: Mesostigmata) Occurring in animal droppings in the pasture ecosystem in central Italy. *Agric. Eco. Environ.* v. 40, p. 47-60, 1992

- CICOLANI, B.; BIANCHI BULLINI, A.P.; BULLINI, L. Morphological and genetic differentiation between *Macrocheles glaber* and *Macrocheles perglaber* (Acari: Mesostigmata). *Internat. J. Acarol.* v.7, p.221-224, 1981.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trend. Gen.*, v.19, n.7, 2003.
- EVANS G.O.; BROWNING, E. British mites of the subfamily Macrochelinae Tragarth (Gamasida, Macrochelidae) **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)**, v.4, p.1-55, 1956.
- FILIPPONI, A.; PEGAZZANO, F. Acari del genere *Glyphtholaspis* nom. nov. pro *Macrocheles* (*Macrocheles*) Berl., 1918 (Mesostigmata, Macrochelidae). **Redia**, v.45, p.133–171, 1960
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Bio.**, v.3, p.294–297, 1994.
- GUIMARÃES, J.H; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitas de Importância Veterinária. São Paulo: Editira Pleiade/ FAPESP, 2001. 218 p
- HALLIDAY, R. B. The Australian species of *Macrocheles* (Acarina: Macrochelidae). **Invert. Taxon.**, v.14, p.273–326, 2000
- HALLIDAY, R.B. Mites of the genus *Glyphtholaspis* Filipponi and Pegazzano (Acarina: Macrochelidae) in Australia. **J. Aust. Entom. Soc.**, v.25, p.71–74, 1986
- HARTINI, S.; TAKAKU, G. Mites of the genus *Holostaspella* (Acari: Gamasida: Macrochelidae) in Indonesia. *Entom. Sci.* v.13, p.107–115, 2010.
- HEBERT, P.D.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. Biol. Sci.** v.270, p.313-321, 2003.
- KNEE, W. New *Macrocheles* species (Acari, Mesostigmata, Macrochelidae) associated with burying beetles (Silphidae, *Nicrophorus*) in North America. **ZooKeys.** v.721, p.1-32, 2017.



KRANTZ, G. W. *Allogynaspis flechtmanni*, a new genus and species of the subfamily Macrochelinae (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) from southeastern Brazil, with comments on cheliceral dentition, reproductive strategies, and postepigynal platelets. **Zoo.**, v.4455, n.1, p.150-160, 2018.

LI, A. Y. et al. Survey of resistance to permethrin and diazinon and use of a multiplex polymerase chain reaction assay to detect resistance alleles in the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L). **J. Med. Entom.**, v.40, n.6, p.942-949, nov.2003

LIZASO, N.M.; MENDES, M.C.; SANTOS, A. M.M. Duas novas espécies de *Macrocheles* (Acarina: Macrochelidae) da região neotropical coletadas em esterco de aves poedeiras em granjas industriais. **Rev. Bras. Entom.**, v.36, n.3, p.597-601, 1992.

LOPES, W. D. Z. et al. Anthelmintic efficacy of oral trichlorfon solution against ivermectin resistant nematode strains in cattle. **Veter. Paras.**, Dublin, v.166, n.1-2, p.98-102, 2009.

MARCHIORI, C. H.; OLIVEIRA, A. T.; LINHARES, A. Artrópodes Associados a Massas Fecais Bovinas no Sul do Estado de Goiás. **Neo. Entom.**, v.30, n.1, p.19-24, 2001.

MAŠÁŇ, P. Macrochelid mites of Slovakia (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae). **Inst. Zoo.**, Slovak Academy of Sciences, Bratislava. p. 149, 2003.

MENDES. M.C; LIZASO, N.M. *Macrocheles novaodessensis*, sp.n. E *Macrocheles roquensis*, sp.n. Coletadas em esterco bovino na região neotropical (Acarina, Macrochelidae). **Revta Bras. Zool.**, v.9, n.3/4, p.357-361, 1992.

MENDES. M.C; LIZASO, N.M. *Macrocheles novaodessensis*, sp.n. E *Macrocheles roquensis*, sp.n. Coletadas em esterco bovino na região neotropical (Acarina, Macrochelidae). **Rev Bras. Zool.**, v.9, n.3/4, p.357-361, 1992.

MENDONÇA, R.S.; NAVIA, D.; DINIZ, I.R.; AUGER, P.; NAVAJAS, M. A critical review on some closely related species of *Tetranychus sensu stricto* (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences data bases. **Exp. Appl. Aca.** v.55, p.1–23, 2011.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C.H. Manual de Acarologia. Ribeirão Preto: Holos, 2008. 308 p.

NAVAJAS, M.; FENTION, B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. **Exp. Appl. Aca.** v. 24, p.751-774, 2000.

NAVAJAS, M.; GUTIERREZ, J.; BONATO, O.; BOLLAND, H.R.; MAPANGOU-DIVASSA, S. Intraspecific diversity of the cassava green mite *mononychollus progressivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. **Exp. Appl. Aca.** v.18, p.351-360, 1994.

NIOGRET J.; NICOT A. Combined approach using morphology and ITS-sequences for description of three new species of *Macrocheles* (Acari: Macrochelidae). *Zoot.*, v.1873, p.39–49, 2008.

NIOGRET, J.; NICOT, A.; STORDEUR, E.; BERTRAND, M. Combination of morphological character an ITS-sequence to characterize a new species of *Machocheles* (Acari: Macrochelidae). **Zoo.**, v.1386, p. 19-29, 2007.

OLIVEIRA, A. R.; MORAES, G. J.; DEMÉTRIO, C. G. E.; NARDO, E. A. E. Efeito do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* sobre Oribatida edáficos (Arachnida: Acari) em um campo de soja, Jaguariúna. **Embr. Meio Amb.** 2001

ÖZBEK, H.H.; DOĞAN, S.; ALI BAL, D. The genus *Macrocheles* Latreille (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) from Kelkit Valley (Turkey), with three newly recorded mite species. *Tur. J. Zoo.* v.39, p.1–13, 2015

RODRIGUES, S. R.; MARCHINI, L. C.; MENDES, M. C. Ácaros da família Macrochelidae (Gamasida) associados com Besouros coprófagos (Scarabaeidae). **Revista Brasileira de Entomologia.** v.45, n.3, p.207-214, 2001.

SCHLÖTTERER C.; HAUSER M.T.; von HAESELER, A.; TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evo.** v.11, n.3, p.513-22, 1994.

SCHMITZ A.; RIESNER D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006.

## CAPÍTULO 3

### **Sazonalidade das espécies da família Macrochelidae presente em placas de esterco bovino no município de Guaratinguetá.**

#### **RESUMO**

O conhecimento acerca da presença de diferentes espécies de macroquelídeos no esterco bovino ao longo do ano ainda é consideravelmente limitado. O presente trabalho teve como objetivo determinar a partir de coletas mensais, entre 2017 e 2018, avaliar a sazonalidade dos ácaros da Família Macrochelidae, bem como realizar estimativas de densidade populacional das principais espécies presentes em placas de esterco bovino de propriedades localizadas em Guaratinguetá, SP. As cinco amostras das placas de esterco obtidas mensalmente foram divididas em duas partes (borda e centro). A obtenção dos ácaros foi feita no funil de Berlese-Tullgen. A fauna presente foi bem diversificada durante os meses avaliados, exceto no mês de junho 2017. As espécies não apresentaram comportamento sazonal sendo encontradas na maioria das amostras; dentre as espécies, *Macrocheles merdarius* e *Macrocheles robustulus* foram as mais frequentes, com alternância entre elas, isto é, *M. merdarius* teve a maior quantidade no período de primavera/verão e *M. robustulus* no outono/inverno. A distribuição dos ácaros nas placas de esterco foi mais evidente nas bordas que no centro.

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

O esterco bovino é um microecossistema que apresenta um conjunto de organismos que estão em constante interação. Das espécies de artrópodes encontrados no esterco, muitos são fungívoros, outros bacteriófagos ou predadores, como os ácaros pertencentes à família Macrochelidae.

O conhecimento da sazonalidade dos macroquelídeos presentes no esterco bovino é importante para se avaliar a possibilidade do seu emprego no controle biológico na área veterinária, uma vez que já foi comprovada a sua ação predatória em moscas sinantrópicas.

Este estudo teve como objetivo avaliar a sazonalidade das espécies de macroquelídeos e sua distribuição na placa de esterco bovino coletadas em propriedades localizadas em Guaratinguetá - SP.

## **3.2 MATERIAIS E METÓDOS**

### **3.2.1 Período e local de coleta de esterco bovino**

As amostragens foram feitas em propriedades localizadas no município de Guaratinguetá – SP, entre os anos de 2017 e 2018, sendo coletadas cinco (05) amostras mensais, excetuando-se os meses de novembro de 2017 e fevereiro e março de 2018, totalizando 55 amostras. Foram coletadas placas inteiras de esterco com aspecto externo seco (como uma casca que recobre a placa) e seu interior úmido. As coordenadas geográficas das propriedades rurais onde se efetuaram as coletas são as seguintes: 47°31'77" L (Long), 74°85'158" N (Lat.); 47°53'13" L (Long), 74°83' 469" N (Lat.); 47°63'42" L (Long.), 74°84' 4242" N (Lat.); 47°12'57" L (Long.), 74°85' 987" N (Lat.); 47°03'65" L (Long.), 74°80' 857" N (Lat.).

#### **3.2.1.1 Triagem das amostras de esterco bovino**

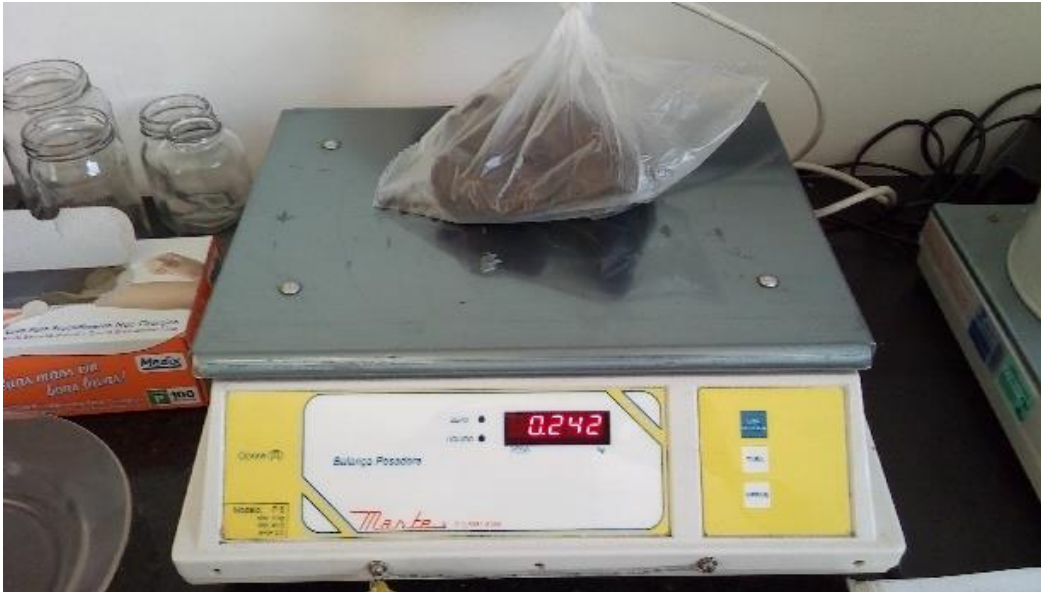
As amostras foram divididas em duas partes, centro e borda, para uma avaliação das espécies de macroquelídeos e da colonização do bolo fecal. Para separação das partes usou-se uma lata, com 12,5 cm de altura e 31,4 cm de diâmetro, e de uma pá de jardim (Figura 1).



**Figura 1.** Separação de uma placa de esterco bovino. **Fonte:** Anjos, K.A., 2018

O material dividido foi posteriormente pesado em balança modelo P6-n° 399/05 para obtenção do peso úmido (PU) e posta em funil de Berlese-Tullgen adaptado (OLIVEIRA et al., 2001). O material foi mantido nestas condições por 4 dias para a recuperação dos macroquelídeos eventualmente presentes (o tempo de 4 dias foi determinado em função do tamanho do funil). Em seguida o material foi acondicionado em frascos com álcool 70% devidamente identificado (Figura 2). Após a extração da fauna existente, as amostras de esterco foram novamente pesadas para obtenção do peso seco (PS). Com os valores de peso úmido e peso seco foi calculado a porcentagem do teor de umidade relativa das amostras segundo Santos (1991).

$$U=[(PU - PS)] \times 100$$



**Figura 2.** Pesagem da parte úmida do esterco bovino. **Fonte:** Anjos, K.A., 2018

A triagem do material coletado foi realizada através de microscópio estereoscópio (Lupa) usando ferramenta de apoio (pipeta Pasteur e agulhas modificadas na forma de pá). As espécies reconhecidas como pertencentes à família Macrochelidae foram separadas dos demais ácaros e insetos e mantidas em álcool etílico absoluto para preservação do DNA.

### 3.2.1.2 Preparação do material acarológico para identificação

A preparação e identificação dos macroquelídeos foi realizada através da montagem de lâminas em meio Hoyer (MORAES; FLECHTMAN, 2008). Apenas as fêmeas das espécies foram montadas, devido à falta de chaves dicotômicas para as formas juvenis e para os machos das espécies.

Os espécimes foram limpos e clarificados com uma solução de KOH a 10% por no mínimo cinco minutos em estufa a uma temperatura de 50°C. Os indivíduos foram posteriormente montados inteiros ou dissecados; os exemplares que foram dissecados receberam um corte látero-longitudinal, separando as placas ventrais da placa dorsal. As lâminas em meio de Hoyer permaneceram em estufa a 50°C durante sete dias para secagem (MORAES; FLECHTMAN, 2008). A identificação ocorreu através de microscopia óptica (Carlzeiss Jena®) com o uso de chaves taxonômicas para família, gênero e espécie de macroquelídeos.

### 3.2.2 Análise estatística

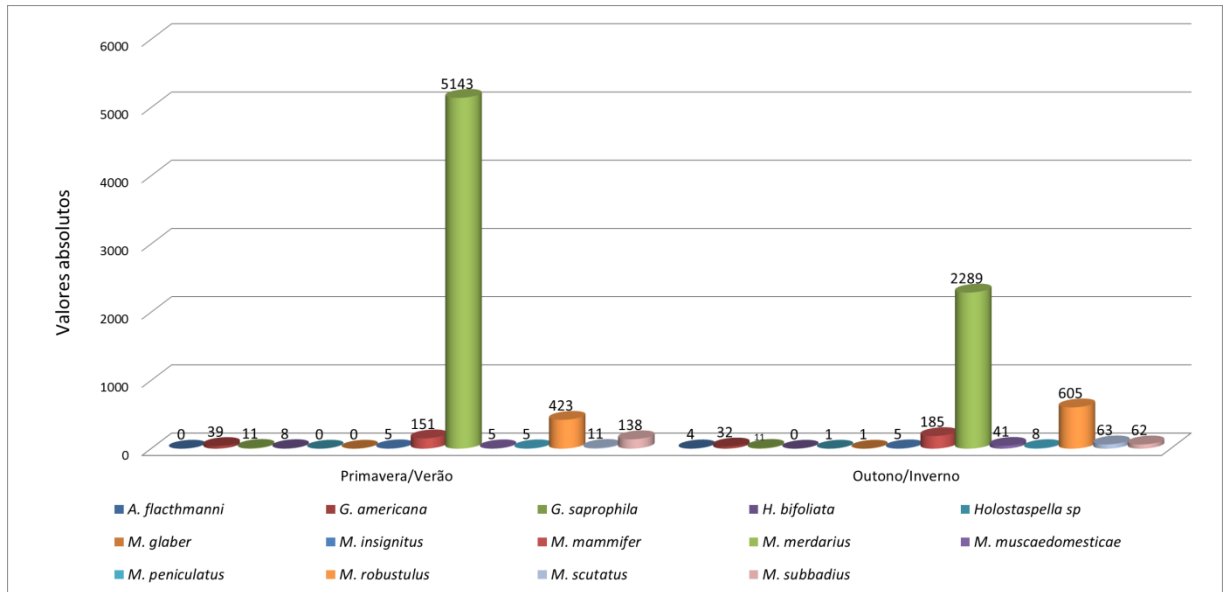
A análise estatística foi aplicada para avaliar a frequência absoluta das espécies durante o período de coleta e a sua distribuição no bolo fecal. Os dados foram analisados através do programa estatístico SAS 9.2. Para as análises de frequência das espécies durante o ano de coleta e da distribuição das mesmas no bolo fecal os dados foram analisados através de frequências absolutas e percentuais usando software S.A.S System for Windows versão 9.2. (SAS. Institute Inc, 2011).

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Sazonalidade das espécies da Família Macrochelidae

Os dados obtidos foram organizados em dois grupos: segundo as estações do ano e segundo a distribuição das espécies nos meses de coleta.

Referente as estações do ano, observa-se a ocorrência das espécies, *Macrocheles scutatus* (Berlese), *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli), *Macrocheles mammifer* Berlese e *Macrocheles robustulus* (Berlese) ao longo do ano, no entanto no período de Outono/Inverno a quantidade foi maior em relação ao período Primavera/Verão. *Macrocheles merdarius* (Berlese) se destaca por sua abundância nos dois períodos com a frequência maior na Primavera/Verão (5.143) (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição sazonal das fêmeas de Macrochelidae nas estações Primavera/Verão e Outono/Inverno.

**Fonte:** Anjos, K.A., 2019

De acordo com as análises ao longo do período amostrado, Primavera/Verão e Outono/Inverno, a espécie *M. merdarius* teve a maior representatividade ao longo dos dois períodos, sendo que no mês de outubro a frequência dessa espécie foi de 96,52% da fauna dos macroquelídeos. Nota-se uma situação similar com a espécie *M. robustulus* para o período Outono/Inverno, com a frequência de 100% no mês de junho. As espécies *Macrocheles glaber* (Müller), *Macrocheles peniculatus* Berlese, *Glyphtholaspis saprophila* Mašán, *Allogynaspis flechtmani* Krantz, *Holostaspella bifoliata* (Trägårdh) e *Holostaspella* n. sp ocorreram de forma esporádica no período de amostragem (Tabela I). A frequência da espécie *M. merdarius* ao longo dos meses se manteve alta com exceção dos meses de maio a julho, que apresentaram uma baixa temperatura. No entanto, nos meses de dezembro de 2017 e janeiro de 2018, apesar das condições climáticas serem favoráveis à presença desta espécie, foram encontrados poucos exemplares. *Macrocheles scutatus* foi encontrado em cinco meses, abril, agosto, setembro, outubro e dezembro, sendo que a sua maior frequência foi no mês de agosto, quando se obteve 55 espécimes (Tabela 1) neste mês a média de temperatura foi de 20°C e de UR de 65% (Figura 5). *Macrocheles mammifer* Berlese foi encontrado em maior número nos meses de março e abril de 2017 e janeiro de 2018 com o pico em abril (Tabela I).

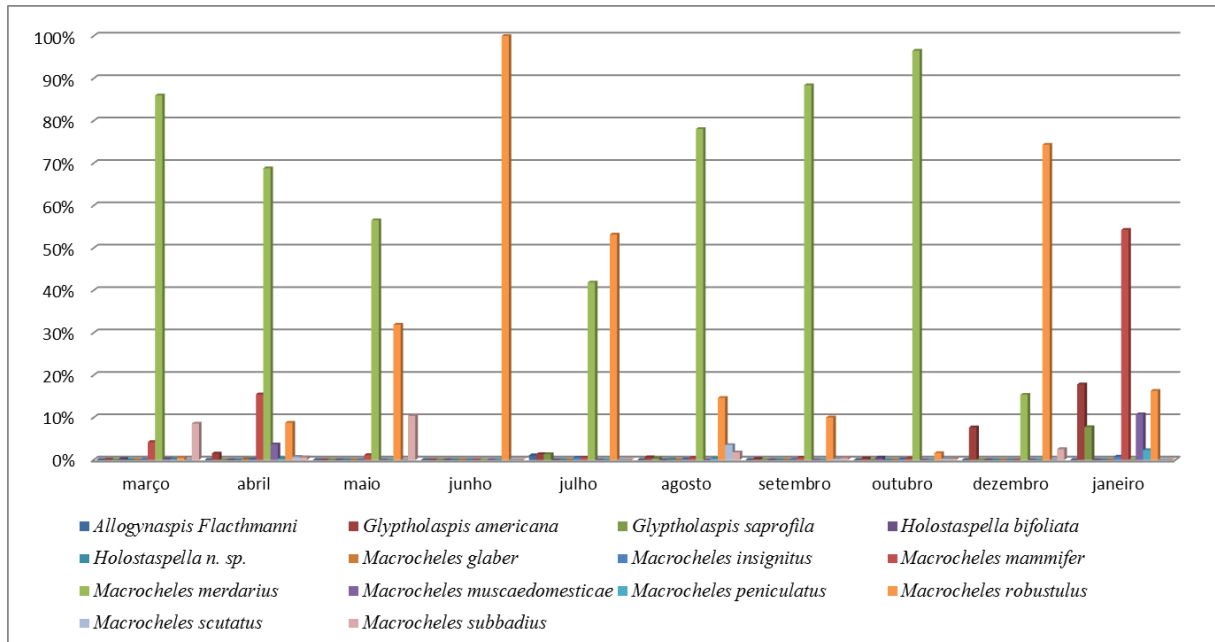


**Tabela I.** Distribuição das fêmeas de macroquelídeos de acordo com o mês.

Mês	Espécie														Total
	<i>A. flachtmani</i>	<i>G. americana</i>	<i>G. saprophila</i>	<i>H. bifoliata</i>	<i>Holostaspella sp</i>	<i>M. glaber</i>	<i>M. insignitus</i>	<i>M. mammifer</i>	<i>M. merdarius</i>	<i>M. muscaedomesticae</i>	<i>M. peniculatus</i>	<i>M. robustulus</i>	<i>M. scutatus</i>	<i>M. subbadius</i>	
Janeiro	0 (0%)	23 (17,8%)	10 (7,75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,78%)	70 (54,26%)	0 (0%)	1 (0,78%)	3 (2,33%)	21 (16,28%)	0 (0%)	0 (0%)	129 (100%)
Março	0 (0%)	1 (0,07%)	0 (0%)	3 (0,21%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,07%)	59 (4,22%)	1201 (85,97%)	3 (0,21%)	2 (0,14%)	7 (0,5%)	0 (0%)	120 (8,59%)	1397 (100%)
Abril	0 (0%)	17 (1,52%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,09%)	1 (0,09%)	173 (15,47%)	769 (68,78%)	41 (3,67%)	3 (0,27%)	98 (8,77%)	8 (0,72%)	7 (0,63%)	1118 (100%)
Mai	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (1,15%)	147 (56,54%)	0 (0%)	0 (0%)	83 (31,92%)	0 (0%)	27 (10,38%)	260 (100%)
Junho	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)
Julho	4 (1,1%)	5 (1,38%)	5 (1,38%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,55%)	2 (0,55%)	152 (41,87%)	0 (0%)	0 (0%)	193 (53,17%)	0 (0%)	0 (0%)	363 (100%)
Agosto	0 (0%)	10 (0,64%)	6 (0,38%)	0 (0%)	1 (0,06%)	0 (0%)	2 (0,13%)	7 (0,45%)	1221 (78,07%)	0 (0%)	5 (0,32%)	229 (14,64%)	55 (3,52%)	28 (1,79%)	1564 (100%)
Setembro	0 (0%)	9 (0,26%)	1 (0,03%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,06%)	19 (0,54%)	3105 (88,39%)	1 (0,03%)	0 (0%)	352 (10,02%)	9 (0,26%)	15 (0,43%)	3513 (100%)
Outubro	0 (0%)	3 (0,35%)	0 (0%)	5 (0,58%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,12%)	3 (0,35%)	831 (96,52%)	0 (0%)	0 (0%)	14 (1,63%)	2 (0,23%)	2 (0,23%)	861 (100%)
Dezembro	0 (0%)	3 (7,69%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (15,38%)	0 (0%)	0 (0%)	29 (74,36%)	0 (0%)	1 (2,56%)	39 (100%)
Total no ano	4 (0,04%)	71 (0,76%)	22 (0,23%)	8 (0,08%)	1 (0,01%)	1 (0,01%)	10 (0,10%)	336 (3,63%)	7432 (80,38%)	46 (0,49%)	13 (0,14%)	1028 (11,11%)	74 (0,80%)	200 (2,16%)	9246

\**A* = *Allogynaspis*, *G* = *Glyptolaspis*, *H* = *Holostaspella*, *M* = *Macrocheles*. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

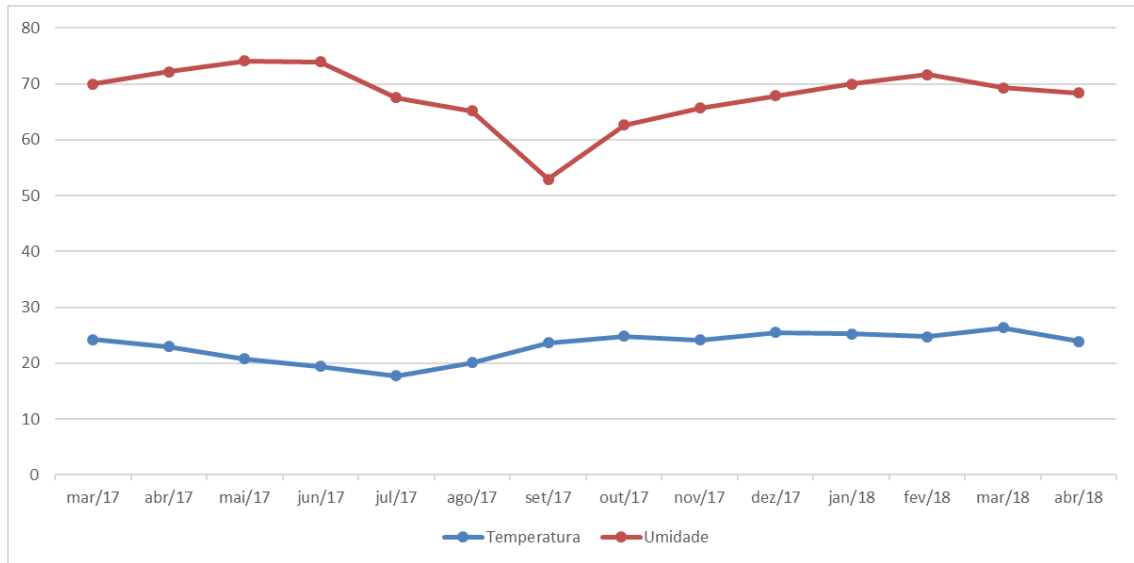
Verifica-se o mesmo perfil de distribuição das espécies segundo as estações do ano para o município de Guaratinguetá. Durante o período de coleta, não houve diferença significativa da temperatura e umidade relativa entre as estações do ano (Figura 4).



**Figura 4.** Distribuição mensal das espécies de macroquelídeos. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

O mês de janeiro se destaca pela alta frequência das espécies *M mammifer*, *Glyphotholaspis americana* (Berlese), *G. saprophila* e *M. muscaedomesticae* e *M. peniculatus* e pela queda na população de *M. merdarius* e *M. robustulus* (Figura 4).

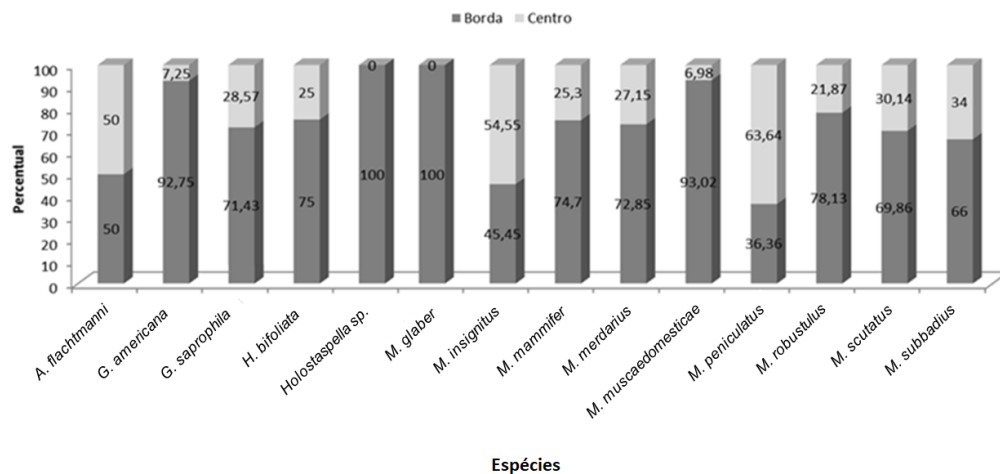
A média da umidade relativa do ar (UR) no mês de junho 2017 foi acima dos 70% e a única espécie presente foi *M. robustulus* (tabela 1). Já no mês de julho deste mesmo ano a média da UR foi semelhante a junho (67,5%). No entanto a média de temperatura foi a mais baixa para o ano de 2017 (17,71°C), sendo que foram encontradas outras espécies nas amostragens coletadas, com a predominância de *M. robustulus* (Figura 5).



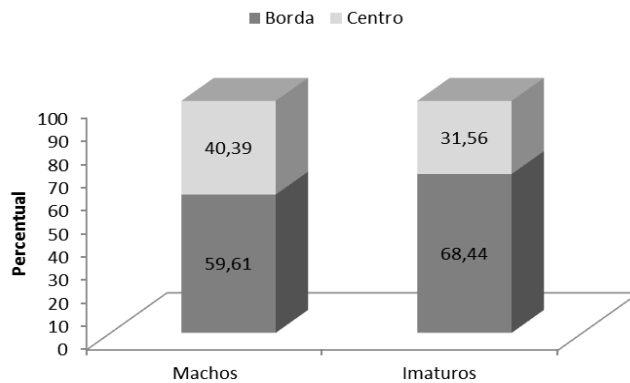
**Figura 5.** Temperatura em °C e Umidade Relativa do Ar (UR) em % - Média Mensal em um Intervalo de Meses para o município de Guaratinguetá dos anos de 2017 e 2018. **Fonte:** Instituto do Controle do Espaço Aéreo (ICEA - Guaratinguetá).

### 3.3.2 Distribuição das espécies no centro e bordas das placas de fezes bovinas

As placas de esterco apresentavam um aspecto médio, isto é, sem excesso de umidade e nem ressecadas (teor de umidade de 52% a 78%) com uma faixa de idade de cinco a sete dias. A análise indica que a frequência dos espécimes (fêmeas, machos e imaturos) se concentravam em sua maioria nas bordas (Figura 6 e 7).



**Figura 6.** Aspecto de colonização das espécies de macroquelídeos no centro e borda das 55 placas de fezes bovinas amostradas. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019



**Figura 7.** Aspecto de colonização dos machos e imaturos de ácaros Macrochelidae no centro e bordas das 55 placas de fezes bovinas. **Fonte:** Anjos, K.A., 2019

As espécies *A. flechtmani* e *Macrocheles insignitus* Berlese foram encontradas na mesma proporção nas duas partes. As espécies *G. americana* e *M. muscaedomesticae* estavam presentes quase que exclusivamente nas bordas das placas. Já a espécie *M. peniculatus* apresentou uma porcentagem de 64% na parte central (Tabela II).

**Tabela II.** Distribuição da frequência das partes do esterco de acordo com cada espécie.

Espécies	Partes da Placa	
	Borda	Centro
<i>Allogynaspis flachtmanni</i> (n= 4)	2 (50%)	2 (50%)
<i>Glyphotaspis americana</i> (n= 69)	64 (92,75%)	5 (7,25%)
<i>Glyphotaspis saprophila</i> (n=21)	15 (71,43%)	15 (71,43%)
<i>Holostaspella bifoliata</i> (n= 8)	6 (75%)	2 (25%)
<i>Holostaspella</i> sp.	1 (100%)	0 (0%)
<i>Macrocheles glaber</i> (n= 2)	1 (50%)	0 (0%)
<i>Macrocheles insignitus</i> (n= 11)	5 (45,45%)	6 (54,55%)
<i>Macrocheles mammifer</i> (n= 336)	251 (74,7%)	85 (25,3%)
<i>Macrocheles merdarius</i> (n= 7502)	5465 (72,85%)	2037 (27,15%)
<i>Macrocheles muscaedomesticae</i> (n= 43)	40 (93,02%)	3 (6,98%)
<i>Macrocheles peniculatus</i> (n= 11)	4 (36,36%)	7 (63,64%)
<i>Macrocheles robustulus</i> (n= 951)	743 (78,13%)	208 (21,87%)
<i>Macrocheles scutatus</i> (n= 73)	51 (69,86%)	22 (30,14%)
<i>Macrocheles subbadius</i> (n= 200)	132 (66%)	68 (34%)
Machos (n= 1228)	732 (59,61%)	496 (40,39%)
Imaturos (n= 5573)	3814 (68,44%)	1759 (31,56%)

**Fonte:** Anjos, K.A., 2019

### 3.4 DISCUSSÃO

A fauna do esterco bovino pode ser influenciada pelos fatores climáticos e pelo uso de produtos químicos, que são aplicados ao longo do ano para o controle de parasitas que acometem os bovinos. Estudos realizados por Axtell (1963 a) e Mattos (1992) mostraram que a acarofauna pode ser afetada pelo uso de acaricidas.

Em nossas análises as espécies *Macrocheles merdarius* e *Macrocheles robustulus* foram as mais abundantes representando 80,4% e 11,1% da acarofauna encontrada respectivamente. Cicolani (1992) analisando amostras de esterco bovino na região de Apennines, Itália, cita que a espécie *Macrocheles perglaber* Filipponi & Pegazzano foi a maior representante, somando 75%. Dos indivíduos recuperados. Glida et al. (2003) verificaram que as espécies *Macrocheles glaber* (Müller) e *M. perglaber* (67% e 16%) apresentaram maior representatividade em esterco equino coletado em Montpellier, na França.

O conhecimento da sazonalidade dos ácaros predadores pode auxiliar na escolha da melhor espécie no controle dos “organismos pragas”, levando em consideração sua frequência ao longo do ano e a sua maior densidade. O presente estudo averiguou que a maior abundância das espécies *Macrocheles merdarius* e *Macrocheles subbadius* (Berlese) foi durante a primavera e o verão. Já *Macrocheles robustulus* e *Macrocheles scutatus* apresentaram maior incidência nos meses de outono e inverno. No estudo de Glida et al. (2003) para a região do mediterrâneo, a maior frequência de macroquelídeos capturados foi nos meses da primavera e do outono. Entretanto, Mendes (1996) e Marchiori et al. (2001) observaram maior incidência de indivíduos desta família nos meses da primavera e do verão. O estudo realizado por Mattos (1992) é o que mais se assemelha aos resultados observados neste trabalho. Neste estudo ele verificou que a abundância das espécies de macroquelídeos se deu em dois momentos, sendo um pico nos meses mais quentes no ano de 1986, e outro nos meses mais frios no ano de 1987.

As espécies encontradas não apresentaram comportamento sazonal, uma vez que a maioria das espécies estava presente em todas as estações. Algumas apenas apresentavam comportamento diferencial.

O fato das espécies *M. robustulus* e *M. merdarius* se mostrarem frequentes e abundantes ao longo do ano, contribui na escolha destas espécies como potenciais predadores no controle biológico de nematódeos de importância veterinária. Entretanto, as espécies que apareceram esporadicamente também podem ser usadas no controle destes vermes, uma vez

que coincidi a melhor época de seu desenvolvimento com o aumento da população de nematódeos. A forésia é um importante meio de dispersão de muitas espécies que habitam ambientes instáveis como o esterco de animais ou carcaças. Segundo Krantz (1998) fatores químicos, comportamentais e ecológicos são importantes para a associação forética. As espécies relatadas neste estudo, como *Glypholaspis americana*, *M. glaber*, *Macrocheles insignitus*, *M. merdarius*, *Macrocheles muscaedomesticae*, *Macrocheles peniculatus*, *M. robustulus* e *M. subbadius* são frequentemente associados com besouros e dípteros, sendo algumas delas encontradas em himenópteros. Segundo Singh et al (1967) o movimento migratório das espécies *M. muscaedomesticae*, *M. merdarius* e *M. subbadius* está relacionado à temperatura e umidade relativa do meio onde vivem.

A colonização da placa de esterco ocorre através de pequenos invertebrados que auxiliam a decomposição e a ciclagem da matéria orgânica do solo (LAVELLE et al., 1996). A atração dos primeiros invertebrados (insetos e ácaros) deve-se pelo odor dos gases que são eliminados muitos ácaros vêm através da forésia e outros através do solo. A colonização das fêmeas foréticas de macroquelídeos está fortemente relacionada com o seu portador que por sua vez tem suas atividades influenciadas pelas condições climáticas (LUMARET; KIRK, 1987). A abundância das espécies depende do número de fêmeas fundadoras ao chegar ao novo ambiente e à sua taxa reprodutiva (GLIDA et al. 2003). O município de Guaratinguetá, localizado na Região Sudeste do Brasil se caracteriza por um clima tropical quente e úmido (primavera/verão) e outro frio e seco (outono/inverno). Segundo os dados do Instituto do Controle do Espaço Aéreo de Guaratinguetá, durante o ano de 2017 teve a média da temperatura variando de 17,7°C a 26,3°C. Nessas condições pode-se observar uma grande diversidade de ácaros da família Macrochelidae nas placas de esterco bovino, com exceção do mês de junho (média de temperatura de 19°C e umidade relativa de 75%), que apresentou baixa frequência e diversidade de espécies.

A temperatura adequada ao desenvolvimento influencia a taxa de reprodução das fêmeas de macroquelídeos. Filipponi (1971) observou que algumas dessas espécies apresentaram aumento da fertilidade em função da temperatura: *Macrocheles penicilliger* alcançou maior taxa da fertilidade em 24°C, e para a espécie *M. subbadius* a temperatura ideal seria de 27°C. A fertilidade de *M. muscaedomesticae* em diversas temperaturas (de 10°C a 40°C) indica que o melhor desenvolvimento está dentro de uma faixa que varia de 28°C a 34°C (FILIPPONI et al., 1971).

Cicolani (1992) relata que *M. merdarius* é a primeira das espécies a colonizar a placa de esterco, com identificação do ácaro a partir do terceiro dia da deposição do excremento na

pastagem e, por volta do quinto dia, surgem as espécies *M. scutatus*, *M. subbadius* e *Holostaspella* sp. No presente trabalho verificou-se uma abundância de *M. merdarius*, fato que pode estar relacionado à observação do autor. Por princípio lógico, as primeiras espécies que colonizam as fezes possuem maiores chances de explorar os recursos do substrato e, conseqüentemente, de se reproduzir.

A espécie *Allogynaspis flechtmani* considerada por Krantz (2018) como de vida livre, foi encontrada nas amostras deste trabalho, o que indica que a colonização possivelmente foi realizada via solo ou até mesmo por forésia.

Na análise de centro e de borda para se avaliar a distribuição dos macroquelídeos observou-se que a fauna acarológica já estava bem estabelecida, uma vez que a quantidade de formas jovens, fêmeas e machos foram altos indicando a ocorrência de várias gerações.

Segundo Mendes et al. (2016) a presença dos macroquelídeos na parte central e na borda do esterco bovino está relacionada com a colonização destes ácaros, sendo que na porção central a entrada se faz através da forésia e na borda ocorre também pelo solo.

De modo geral a maior densidade das espécies se encontrava nas bordas. *G. americana* e *M. muscaedomesticae* estavam concentradas quase que exclusivamente nas bordas da placa. Já a espécie *M. peniculatus* teve uma maior presença no centro, fato que sugere colonização por meio de forésia. *A. flechtmani* e *M. insignitus* estavam distribuídas igualmente nas duas porções.

Este estudo revela que a maioria das espécies se concentra nas bordas. Lopes et al. (2017) sugerem que a maior densidade dos macroquelídeos nas bordas possivelmente está relacionada ao ressecamento da parte superior, que desfavorece a entrada e saída de ácaros. No entanto, a umidade inferior das bordas facilita o fluxo da fauna. Além disso, outro fator que pode ser considerado é a saída das larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de bovinos, que tendem a eclodir partir do 7º a 10º dia, já que estes vermes podem ser uma fonte alimentar desses ácaros.

A forésia é um importante meio de dispersão de muitas espécies que habitam ambientes instáveis como o esterco de animais ou carcaças. Segundo Krantz (1998) fatores químicos, comportamentais e ecológicos são importantes para a associação forética. As espécies relatadas neste estudo, como *G. americana*, *M. glaber*, *M. insignitus*, *M. merdarius*, *M. muscaedomesticae*, *M. peniculatus*, *M. robustulus* e *M. subbadius* são frequentemente associadas com besouros e dípteros sendo algumas também encontradas em himenópteros. Segundo Singh et al (1967) o movimento migratório das espécies *M. muscaedomesticae*, *M.*

*merdarius* e *M. subbadius* está relacionada à temperatura e à umidade relativa no meio onde vivem.

### 3.5 CONCLUSÃO

A fauna dos ácaros da família Macrochelidae encontrados em esterco bovino no município de Guaratinguetá no ano de 2017 e início do ano de 2018 mostrou-se bem diversificado durante todo o ano, com queda no mês de junho.

As espécies não apresentaram comportamento sazonal, sendo encontradas na maioria dos meses. Dentre as espécies observadas *Macrocheles merdarius* e *Macrocheles robustulus* foram as mais frequentes, com alternância entre elas, isto é, *M. merdarius* teve a maior quantidade no período de primavera/verão e *M. robustulus* no outono/inverno.

A distribuição dos ácaros nas placas de esterco apresentou maior concentração nas bordas do que no centro.

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AXTELL, R.C. Effect of Macrochelidae (Acarina: Mesostigmata) on house fly production from dairy cattle manure. **J. Econ. Entom.**, v.56, p.317-321, 1963a.

CICOLANI, B. Macrochelid mites (Acari: Mesostigmata) occurring in animal droppings in the pasture ecosystem in central Italy. **Agri. Eco. Env.**, v.40, p.47-60, 1992.

FILIPPONI, A. Influence of temperature on population increase of four dung-living macrochelid mites within optimum range. *In*: M. Daniel and B. Rosický. (Eds), **Proceedings of the 3rd International Congress of Acarology**, Aug. 31–Sept. 6, 1971, S. Junk, The Hague and Academia, Prague, 1971, p. 775-779.

GLIDA, H.; BERTRAND, M.; PEYRUSSE, V. A limiting factor in the abundance of predatory phoretic mites (Acari: Macrochelidae): the seasonal abundance of their phorionts (dung beetles) in Southern France. **Canadian J Zool.** v.81, p.2066-2072, 2003.



ICEA. Instituto do Controle do Espaço Aéreo, Guaratinguetá. Disponível em:

[https://www.decea.gov.br/?i=midia-e-](https://www.decea.gov.br/?i=midia-e-informacao&p=noticias&tag=DTCEA%20Guaratinguet%C3%A1)

[informacao&p=noticias&tag=DTCEA%20Guaratinguet%C3%A1](https://www.decea.gov.br/?i=midia-e-informacao&p=noticias&tag=DTCEA%20Guaratinguet%C3%A1). Acesso em: 14 mar 2019.

KRANTZ G.W. Reflections on the Biology, Morphology and Ecology of the Macrochelidae. **Exp. & Appl. Aca.**, v.22, p.125–137, 1998.

LAVELLE, P. Diversity of soil fauna and ecosystem function. **Biol. Intern.**, v.33, p.3-16, 1996.

LOPES, W. E. Z.; COSTA, A. J.; BORGES, F. A.; VULCANI, V. A. S.; RABELO, R. E.; BICHUETTE, M. A. Nematódeos de Ruminantes Domésticos. In: LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J. (Org.). **Endoparasitoses de Ruminantes. Goiana**: Editora UFG, 2017. 242p.

LUMARET, J.P.; AND KIRK, A. Ecology of dung beetles in the French Mediterranean region (Coleoptera: Scarabaeidae). **Acta Zool. Mex.** (ns), v.24, p.1–55, 1987.

MARCHIORI, C. H.; OLIVEIRA, A. T.; LINHARES, A. Artrópodes Associados a Massas Fecais Bovinas no Sul do Estado de Goiás. **Neo. Entom.**, v.30, n.1, p.19-24, 2001.

MATTOS, M.R. Macrochelideos associados a fezes acumuladas em granjas de aves poedeiras do município de Montemor, Estado de São Paulo: Levantamento, taxonomia e estudos populacionais (Acari: Gamasida: Macrochelidae). 1992. 76f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - IB., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

MENDES, J. Artropodofauna associada a fezes bovinas em pastagens e alguns aspectos da biologia dos estágios imaturos de *Hematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) na região de São Carlos, SP. 1996. 127 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – UNICAMP, Universidade de Campinas, Campinas, 1996.

MENDES, M. C.; ANJOS, K.A.; DUARTE, F.C; GODOI, F. E. M.; SILVA, S. B. A.; SAMPAIO, P. H. S. Distribution of Macrochelidae Mites in peripheral and central portions of cattle dung. In: 8<sup>th</sup> SIMPOSIUM OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF ACAROLOGIST, 89., 2016, Valencia (Spain) Resumo, Valencia (Spain) 2016. p.5-114.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C.H. Manual de Acarologia. Ribeirão Preto: Holos, 2008. 308 p.

OLIVEIRA, A. R.; MORAES, G. J.; DEMÉTRIO, C. G. E.; NARDO, E. A. E. Efeito do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* sobre Oribatida edáficos (Arachnida: Acari) em um campo de soja, Jaguariúna. **Embr. Meio Amb.** 2001.

SAS. The SAS system for Windows. Release 9.2. Inst., Cary, NC. 2011.

SANTOS, A. M. 1991. Ácaros associados ao esterco de aves poedeiras em granjas industriais: subsídios para o controle biológico de dípteros sinantrópicos. 93 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991

SINGH, P.; McELLISTREM, M. T.; RODRIGUEZ, J. G. The response of some macrochelids to temperature and humidity (Acarina: Macrochelidae). *Acaro.*, v.9, p.1–20, 1967.

## CAPÍTULO 4

**Avaliação do potencial de controle biológico de *Holostapella bifoliata* (Mesostigmata: Macrochelidae) no controle de larvas infectantes de nematódeos gastrointestinais de importância veterinária.**

### RESUMO

Estudos têm evidenciado o potencial predatório dos macroquelídeos para uso no controle de moscas sinantrópicas, porém não há trabalhos relatando seu papel no controle de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a pressão exercida das espécies de macroquelídeos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de bovinos, equinos e ovinos. O teste foi realizado através da adaptação da coprocultura (Roberts e O'Sullivan, 1950) associada a técnica de Berlese-Tullgen. Para realização dos testes, colônias da espécie *Holostaspella bifoliata* foram estabelecidas juntamente colônias de moscas domésticas, estas como fonte de alimento para os ácaros até o início dos testes. Também foram colocadas para as colônias de *H. bifoliata* larvas de nematódeos gastrintestinais extraídos pelo método de coprocultura. Os resultados obtidos demonstraram diminuição das larvas infectantes de nematódeos das culturas tratadas, variando em um intervalo entre 40% a 90% para as culturas com fezes bovinas e 20% a 75% para fezes de equinos. Embora os resultados dos testes em fezes de ovinos não tenham alcançado significado estatístico, verificou-se a diminuição das populações de larvas de nematódeos nas repetições 1, 3 e 7 e houve a maior número de ácaros recuperados nas 2, 6 e 7 dentre todos os teste. Estes resultados demonstraram eficácia de predação da espécie *H. bifoliata* sobre as populações de nematódeos gastrintestinais de todas as espécies testadas, podendo, no futuro, ser usada dentro de um manejo integrado de pragas.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O primeiro estudo de predação foi realizado por Pereira e Castro em 1945 no Instituto Biológico de São Paulo, no qual foi avaliado o efeito predatório da espécie *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) sobre ovos e larvas de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). Os estudos sobre predação de pequenos invertebrados pelos macroquelídeos vêm crescendo ao longo dos anos incluindo outras espécies como *M. domestica*, *Lucilia sp.*, *Haematobia irritans* (L) e *Stomoxys calcitrans* (L.) (O'DONNELL; AXTELL, 1964; MANNING; HALLIDAY, 1994; HALLIDAY; HOLM, 1987; AZEVEDO et. al, 2018).

Estudos avaliaram que os macroquelídeos também são predadores de invertebrados como *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae), Poduromorpha Collembola e *Frankliniella occidentalis*, além de nematódeos de vida livre e parasitas de plantas comerciais como *Rhitis inermiformis*, *Panagrellus sp.*, *Aphelenchus avenae* e *Panagrellus redivivus* (FILIPPONI; DELUPIS, 1963; HASSAN et al., 2002).

Embora ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais estejam presentes nas fezes dos animais domésticos, a literatura sobre o papel dos macroquelídeos no controle de parasitos de interesse veterinário tem se limitado ao estudo de artrópodes, mais especificamente, aos dípteros *M. domestica*, *H. irritans* e *S. calcitrans*.

A busca por alternativas para o controle de parasitos gastrintestinais e a crescente procura dos consumidores por uma alimentação orgânica abriram espaço para novas pesquisas sobre o controle biológico de nematódeos. Sendo assim o presente estudo procurou avaliar o potencial da espécie *Holostaspella bifoliata* (Trägårdh) no controle de populações de nematódeos gastrintestinais de bovinos, equinos e ovinos, utilizando para tanto um modelo *in vitro* adaptado da técnica de coprocultura (Roberts e O'Sullivan, 1950) associada a técnica de Berlese-Tullgen, avaliando tanto a população de larvas de nematódeos quanto as de ácaros

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Adaptação da técnica de coprocultura para avaliar o efeito da predação de ácaros sobre populações de nematódeos gastrintestinais.

A avaliação *in vitro* foi conduzida nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2018. O método foi adaptado a partir da técnica de coprocultura para obtenção de larvas de nematódeos gastrintestinais proposta por Roberts e O'Sullivan (1950). Para tanto, amostras de

fezes bovinas, ovinas e equinas foram coletadas diretamente do reto dos animais, para não haver contaminação com a fauna do solo. Efetuou-se contagem do número de ovos por grama de fezes (opg) conforme técnica de Whitlock (1948) podendo assim determinar o número de ovos de nematódeos presentes nas amostras e, conseqüentemente, estimar o número de larvas a ser obtido das coproculturas.

As amostras continham trinta gramas de fezes que foram colocadas em frasco de vidro de boca larga mantido em estufa B.O.D a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $70\% \pm 10\%$  UR. O material foi umedecido conforme a necessidade. Após dois dias de incubação, foram depositadas fêmeas de *H. bifoliata* nos frascos com coproculturas, nas amostras tratadas e as amostras controles permaneciam sem ácaros. O material foi mantido sob as condições citadas acima por mais oito dias, totalizando dez dias de incubação das coproculturas, tempo necessário para que as larvas cheguem ao terceiro estágio, sua forma infectante. Também foram mantidos coproculturas sem o acréscimo de ácaros como controle (Figura 1).

Para a mesma coleta de fezes de bovinos foram realizadas duas culturas, uma controle e outra contendo duas fêmeas adultas de *H. bifiliata* para comparação da estimativa do número de larvas de nematódeos entre ambas. A bateria de testes com fezes de bovinos foi realizada com sete amostras.

Com relação às fezes dos equinos foram realizadas três culturas para cada coleta, uma controle e outras contendo duas fêmeas adultas de *H. bifiliata*, nesse caso além da comparação da estimativa do número de larvas foram recuperados os ácaros de uma das culturas. A bateria de testes com fezes de equinos foi realizada com seis amostras.

Para as amostras de fezes de ovinos, as quantidades coletadas impediram a preparação de culturas em triplicata ou duplicata. Neste caso, as amostras controle e tratada foram pareadas duas a duas, utilizando como critério contagens de opg aproximadas, portanto cada um dos sete testes foi realizado com fezes de dois animais. Às amostras tratadas foram adicionadas um única fêmea adulta de *H. bifiliata*.

As larvas infectantes foram recuperadas, enchendo-se os frascos de cultivo com água morna, tampando-os com placas de Petri e invertendo-os bruscamente. Os conjuntos foram mantidos levemente inclinados com o auxílio de um suporte de madeira, adicionou-se água morna na parte externa das placas de Petri. Após duas horas, a suspensão contida em cada placa foi coletada com pipeta Pasteur e reservada em tubos Falcon, após a coleta o volume de água foi repostado para que a mesma operação fosse repetida mais seis vezes ao longo de 24 horas.

Para a contagem das quantidades de larvas recuperadas, os tubos ficaram em repouso durante 24 horas para sedimentação das larvas, foram dispensados os sobrenadantes até que restasse um volume de 5 ml para cada tubo, os quais foram homogeneizado com o auxílio de pipetas de 1000 $\mu$ l. Após a homogeneização 10 $\mu$ l da suspensão com nematódeos foram pipetadas, e colocadas em lâminas de microscopia. Foi também aplicado o mesmo volume de lugol para matar as larvas e facilitar a contagem. O processo foi repetido 10 vezes para cada amostra controle e tratada, foi calculada a média de larvas por amostra. O cálculo da estimativa de larvas foi realizado usando a seguinte formula:

$$\begin{aligned} \text{Média de larvas em } 10\mu\text{l} \times 1000 &= \text{n}^\circ \text{ de nematódeos em } 1\text{ml} \\ \text{N}^\circ \text{ de nematódeos em } 1\text{ml} \times 5 &= \text{total de nematódeos recuperados.} \end{aligned}$$



**Figura 1.** Teste de predação em coprocultura para avaliar a ação de ácaros macroquelídeos sobre populações de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais. Teste executado com *Holostaspella bifoliata* em (a) fezes bovinas, culturas tratadas e controles; (b) fezes ovinas, culturas tratadas; (c) fezes ovinas, controles; (d) fezes equinas, culturas tratadas e controles. **Fonte:** Anjos, K. A., 2019.

#### 4.2.2 Recuperação dos ácaros das amostras tratadas.

Para as fezes de ovinos e bovinos os ácaros foram recuperados analisando toda a água restante dos frascos após a recuperação de larvas de nematódeos. Esta recuperação foi realizada utilizando pipeta Paster e placa de Petri e observada ao microscópio estereoscópio (Lupa).

Com relação às fezes de equinos, cuja bateria de testes foi realizada em triplicata, justamente para que uma das amostras tratadas fosse exclusivamente destinadas a recuperação de ácaros, os ácaros foram recuperados utilizando o funil de Berlese-Tullgen.

#### 4.2.3 Coleta de Macrochelidae para estabelecimento de colônias.

No laboratório as amostras de esterco bovino foram colocados em um funil de Berlese-Tullgen adaptado (OLIVEIRA et al., 2001), mantidas por quatro dias para a recuperação dos macroquelídeos eventualmente presentes, e acondicionados em potes plásticos contendo uma base de gesso e carvão ativado na proporção de 9:1 (ABBATIELLO, 1965). Em seguida, os ácaros presentes nos potes foram triados e separados dos demais em novos potes contendo o mesmo substrato. Após a separação as espécies de macrochelídeos foram mantidos em estufas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $70\% \text{ UR} \pm 10\% \text{ UR}$ , no escuro, simulando as condições de calor e umidade das massas fecais. Ofereceu-se alimentação a base de ovos de moscas domésticas e larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais. Não obstante os esforços exaustivos para manutenção de maior número de espécies, apenas *H. bifoliata* estabeleceu colônias espontaneamente nas condições experimentais, sendo capaz de se reproduzir por várias gerações.

##### 4.2.3.1 Manutenção e criação de *Holostaspella bifoliata*

A colônia de *Holostaspella bifoliata* foi estabelecida a partir da captura de indivíduos presentes em amostras de esterco bovino do município de Guaratinguetá – SP, em janeiro de 2018, das quais se recuperou os espécimes através do funil de Berlese-Tullgen.

Os ácaros foram criados em potes plásticos com 8 cm diâmetro e 7 cm altura, sobre base de gesso e carvão ativado, na proporção de 9:1 com 0,5 cm de altura (ABBATIELLO,

1965). A base foi mantida sempre umedecida e ofereceu-se aos ácaros uma camada de vermiculita para proporcionar abrigo e reduzir o canibalismo. Os potes foram mantidos em estufas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $70\% \text{ UR} \pm 10\% \text{ UR}$ , no escuro, simulando as condições de calor e umidade das massas fecais.

As colônias eram alimentadas com ovos e larvas de primeiro ínstar de moscas domésticas da criação do Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico e larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de diferentes animais domésticos coletadas em diferentes localidades do estado, como parte da rotina do Laboratório de Parasitologia Animal do Centro de Pesquisa de Sanidade Animal (CPSA).

#### 4.2.3.2 Criação de mosca doméstica (*Musca domesticae*) para alimentação dos ácaros macroquelídeos.

A criação de mosca doméstica (*Musca domestica* L.) foi conduzida baseada nas metodologias estabelecidas por Justus (2002) e Ambrós (2003). As colônias foram formadas a partir de larvas coletadas em esterco bovino coletado no município de Guaratinguetá.

As colônias de mosca doméstica foram mantidas em uma sala climatizada com temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar de 60% dentro de uma gaiola com 8 cm diâmetro e 7 cm de altura (Figura 2)



**Figura 2.** Colônia de mosca doméstica mantida em sala climatizada. **Fonte:** Anjos, K. A., 2019.



A alimentação das moscas adultas continha uma mistura de leite em pó, levedo de cerveja e açúcar numa proporção de 1:1:1. A água foi fornecida para as moscas através de uma garrafa e um tecido de algodão. Para a postura de ovos foi disponibilizada uma mistura contendo farelo de trigo, leite em pó e levedo de cerveja, numa proporção de 19:2:1, respectivamente. Adicionava-se água a este substrato de postura até que tivesse um aspecto úmido mais ainda bem aerado. Antes da utilização, o substrato umedecido era deixado fermentando por, no mínimo, 48 horas. Uma alíquota de substrato fermentado era depositada em uma placa de Petri e deixada dentro da gaiola das moscas adultas durante 6 horas, para que as fêmeas realizassem a postura. Para a manutenção da colônia de moscas parte dos ovos eram separados e mantidos no mesmo substrato no qual faziam a postura dos ovos, em um pote com 8 cm de diâmetro 7 cm e de altura, tampado com tecido para o nascimento de novas moscas.

#### 4.2.3.3 Coleta e manutenção dos nematódeos gastrintestinais de ruminantes para a manutenção do *Holostaspella bifoliata*

Os nematódeos foram recuperados de fezes ovinas e bovinas sempre que disponíveis seguindo o método de Roberts e O'Sullivan (1950), descrito anteriormente.

Após a recuperação, as larvas eram mantidas em um tubo Falcon dentro de geladeiras e retiradas apenas para alimentação dos ácaros.

#### 4.2.4 Análises estatística

A análise estatística foi realizada pelo método de Mann-Whitney com o software Livre R, a fim de averiguar se houve diferença significativa entre as culturas tratadas e controles.

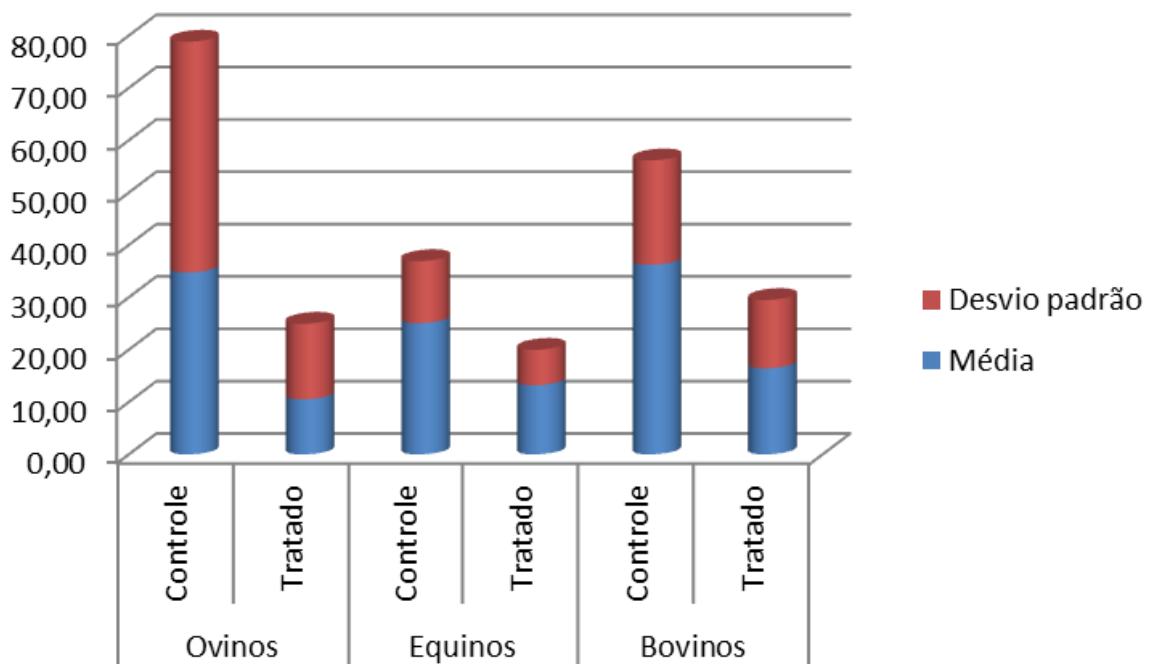
### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Resultados obtidos da recuperação de larvas de nematódeos

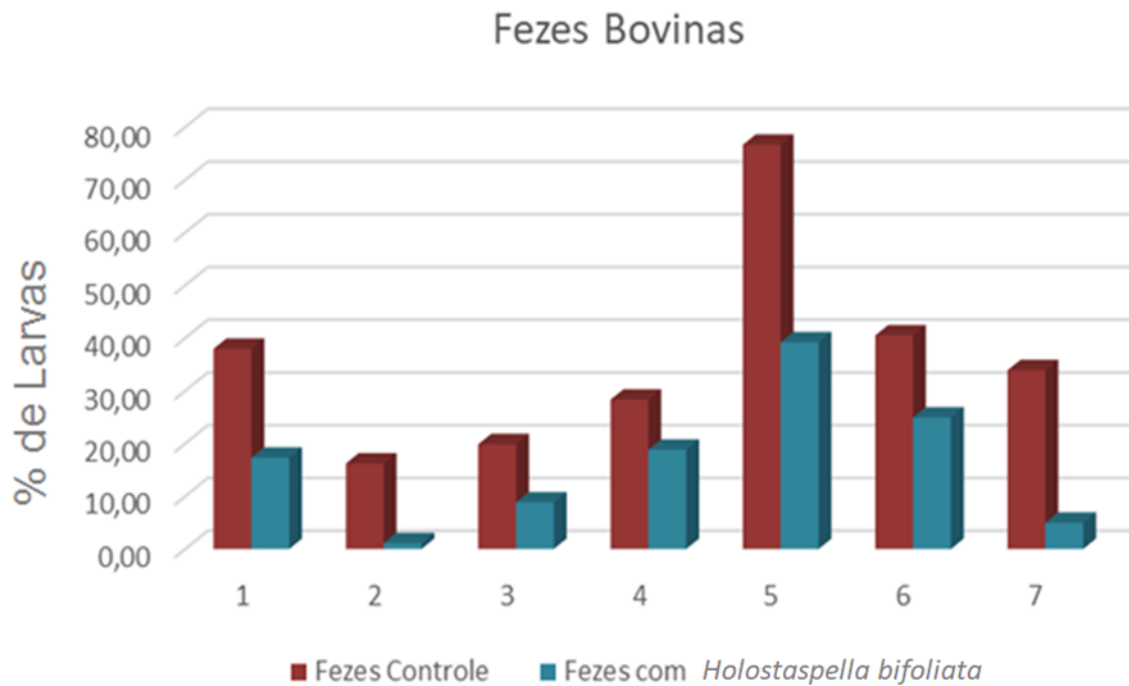
Os resultados obtidos para as fezes bovinas demonstraram uma redução significativa para o grupo tratado ( $p = 0,048$ ) em todas as amostras. A média da recuperação foi de 36,21% (desvio padrão:  $\pm 19,96\%$ ) para o controle e 16,45% (desvio padrão:  $\pm 13,04\%$ ) para o grupo tratado.

As coproculturas de fezes equinas mostraram uma redução significativa do grupo tratado ( $p = 0,037$ ) com uma média de 25,05% (desvio padrão:  $\pm 11,88$ ) para o grupo controle e 13,22% (desvio padrão:  $\pm 6,75$ ) para amostras tratadas.

Em relação aos testes com as fezes de ovinos, o resultado não foi significativo ( $p = 0,338$ ) sendo que a média para o controle foi de 34,75% (desvio padrão:  $\pm 44,09$ ) e para as amostras tratadas de 10,50% (desvio padrão:  $\pm 14,46$ ) (Figura3).

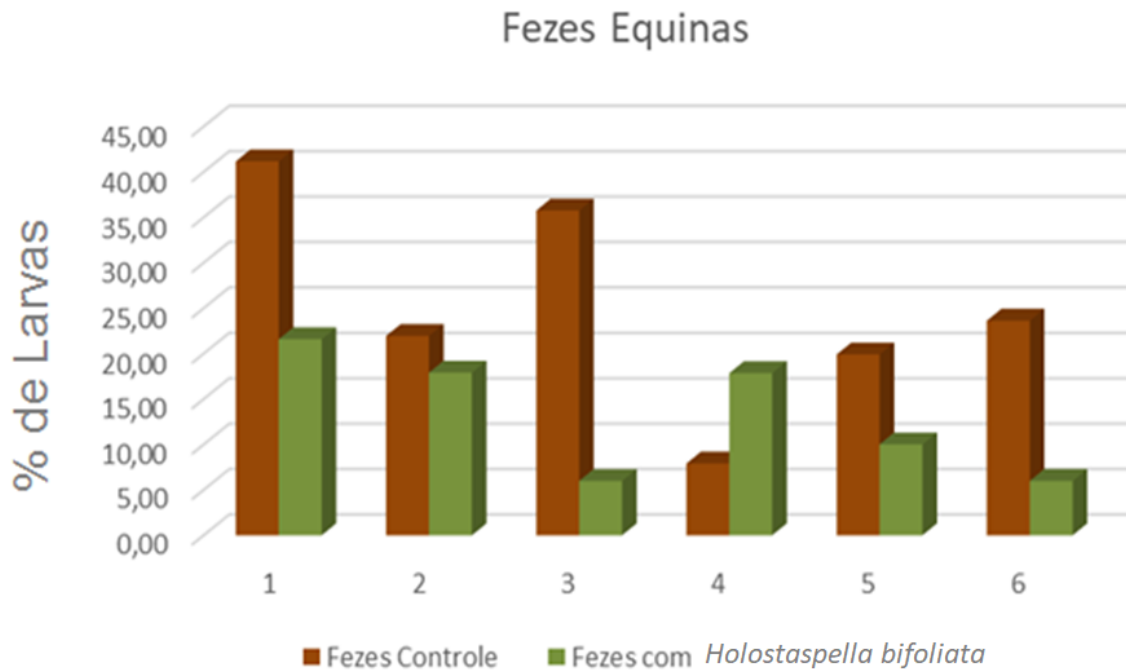


**Figura 3:** Média e desvio padrão da recuperação de larvas de nematódeos dos frascos controles e tratados das culturas de fezes ovinas, equinas e bovinas.



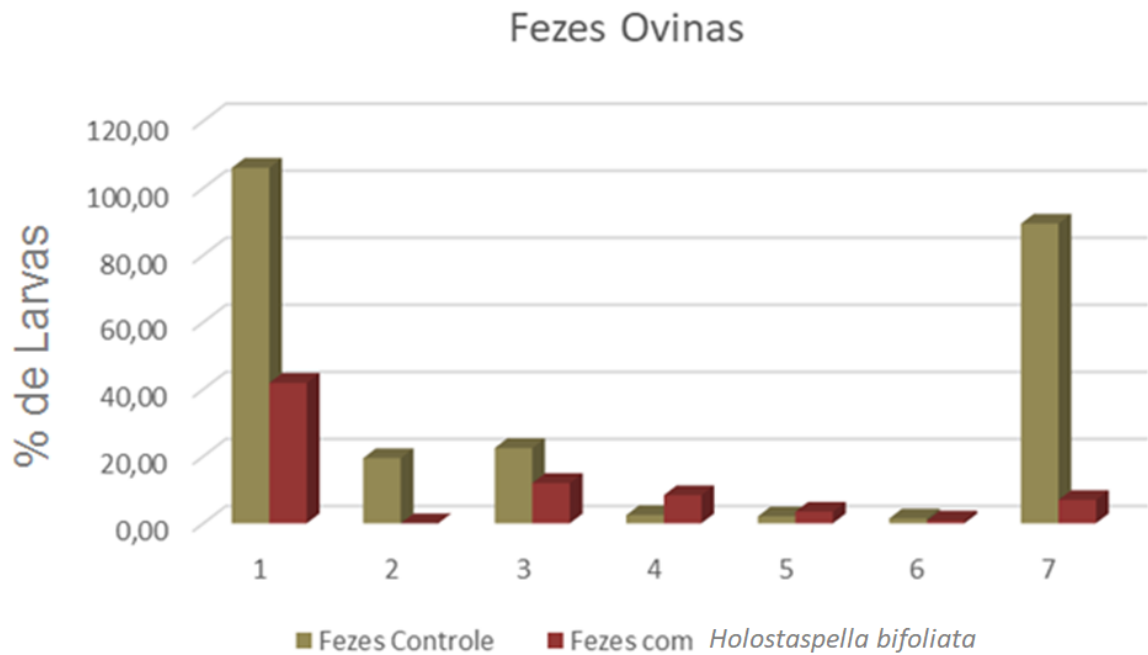
**Figura 4.** Recuperação (%) de larvas de nematódeos das sete amostras de fezes bovinas (frascos controles e tratados). **Fonte:** Anjos, K. A., 2019.

Em uma análise individual dos resultados para as fezes bovinas nota-se que nas amostras 2 e 7 a redução da população de nematódeos foi de aproximadamente 90% em comparação com a quantidade de larvas recuperadas da cultura controle. Para os pares de amostras 1, 3 e 5, a redução de larvas recuperadas em comparação aos controles foi  $\geq 50\%$  em relação aos controles. Já para as repetições 4 e 6, a queda populacional dos nematódeos foi de aproximadamente 40% quando comparada às respectivas culturas controle (Figura 4).



**Figura 5:** Recuperação (%) de larvas de nematódeos dos potes controles e tratados das fezes equinas. **Fonte:** Anjos, K. A., 2019.

As amostras obtidas da coprocultura de fezes de equinos obtiveram um resultado semelhante ao observado no teste com as fezes bovinas (Figura 5). Nas amostras 3 e 6, a redução chegou a aproximadamente 75% em comparação com os controles. Para as amostras 1 e 5, a redução foi de cerca de 50%. Na amostra 2 verificou-se uma redução de apenas 20% em relação ao controle. Ocorreu inversão no caso da cultura número 4, na qual a população de larvas recuperadas foi maior na cultura tratada, o que pode estar relacionado com a idade das fêmeas depositadas naquela cultura e/ou com a homogeneização da amostra.



**Figura 6.** Recuperação (%) de larvas de nematódeos dos potes controles e tratados das fezes dos ovinos. **Fonte:** Anjos, K. A., 2019.

Em relação aos testes dos ovinos, é importante ressaltar que as fezes do controle e tratadas eram de animais diferentes, mas que possuíam opgs, e que cada animal tem sua própria reação imunológica que afeta as populações de nematódeos de maneiras diversas. Apesar deste fato é possível notar que nas repetições 1, 3 e 7 houve uma redução quantitativa das populações de nematódeos e para a amostra número 2 não houve recuperação de larvas no tratado. Já para as amostras 4 e 5 houve uma maior recuperação das larvas de nematódeos dos frascos tratados e no amostra 6 a recuperação foi muito próxima entre os frascos controle e tratado (1,46 e 0,81).

#### 4.3.2 Recuperação dos *Holostaspella bifoliata*

Observando a tabela I podemos verificar que não houve recuperação de ácaros nas fezes bovinas. Nas amostras 2, 6 e 7 dos ovinos houve respectivamente 19, 2, 6 ácaros recuperados sendo que apenas uma fêmea foi adicionada nas amostras tratadas mostrando que houve crescimento populacional significativo, principalmente na amostra 2. Nas fezes equinas foram recuperados dois ácaros em todas as amostras. O método usado para recuperação dos

ácaros usando a divisão das fezes em triplica apresentou-se a melhor forma de avaliar a população de ácaros.

**Tabela I.** Número de *Holostaspella bifoliata* recuperados das fezes de diferentes espécies.

Nº da amostra	Espécies		
	Bovino	Ovino	Equino
1	0	0	2
2	0	19	2
3	0	0	2
4	0	0	2
5	0	0	2
6	0	2	2
7	0	6	-

\*Fezes bovinas e ovinas a recuperação de ácaros foi através da análise da água.

\*\*Fezes equinas a recuperação de ácaros foi através do funil de Bersese.

#### 4.4 DISCUSSÃO

Os ácaros predadores de pequenos invertebrados vêm apresentando grande sucesso no controle de pragas em diversas culturas vegetais. No caso da família Macrochelidae, apenas *Macrocheles robustulus* é comercializado para o controle de tripses (Thysanoptera) e controle de moscas Scaridae. Na área animal, estudos de avaliação da sua viabilidade como controle biológico de moscas sinantroópicas vêm sendo realizados desde a década de 1940, (*Musca domestica*, *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans*) (PEREIRA; CASTRO, 1945 e 1947; O'DONNELL; AXTELL, 1964; MANNING; HALLIDAY 1994; HALLIDAY; HOLM, 1987).

Rodrigues et al. (1962) e Azevedo et al (2019) utilizaram nematódeos com o objetivo de usá-los como alimento alternativo para populações laboratoriais de macroquelídeos, e demonstraram a eficácia desse alimento no aumento da fertilidade das fêmeas em cativeiro. Porém as técnicas usualmente empregadas em testes de predação não permite uma análise quantitativa do número de nematódeos predados, não sendo possível avaliar a pressão que os macroquelídeos exercem sobre essas populações.

Estudos acerca do papel predatório exercido pelos macroquelídeos sobre as populações de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais são revestidos de caráter inédito. Sabe-se que os primeiros ínstares desses vermes se desenvolvem no bolo fecal,

ambiente onde muitas espécies de macroquelídeos habitam. Os ovos morulados ou larvados desses nematódeos parasitários estão presentes no bolo fecal no momento de sua formação. Logo, a busca dos macroquelídeos por este substrato deve, muito provavelmente, se basear na existência desta fonte de alimento. Isso é consistente com relatos sobre a colonização das placas de esterco nas pastagens já no terceiro dia após a defecação (CICOLANI, 1992), momento no qual as larvas de primeiro ínstar dos nematódeos parasitários já estão presentes e à mercê dos predadores macroquelídeos.

Os helmintos gastrintestinais costumam causar impactos nos rebanhos de animais domésticos, tais como retardo no crescimento e mortalidade dos animais parasitados, acarretando perdas econômicas (HAWKINS, 1993; STROMBERG et al., 2012). Os anti-helmínticos tem sido vitais no controle das verminoses dos ruminantes, porém o aparecimento de resistência tem comprometido o uso desta ferramenta, podendo ocasionar um grande problema sanitário na pecuária (LOPES et al., 2009).

Desta forma parece ser possível explorar a relação ecológica entre predadores macroquelídeos e as larvas de parasitos gastrintestinais presentes nas fezes depositadas nas pastagens pelos animais domésticos. Isto poderia se somar a outras medidas que vêm sendo tomadas para controlar as verminoses em ruminantes, incluindo higiene, manejo, descanso das pastagens, pastejo rotacional, pastejo alternado e simultâneo entre ovinos e bovinos, bem como aos avanços relacionadas ao uso dos fitoterápicos, vacinas, homeopáticos e o controle biológico através de fungos nematófagos (LOPES et al. 2017).

Espera-se que, uma vez dominado o processo de criação industrial de *Holostaspella bifoliata*, e possivelmente de outros macroquelídeos cujo potencial predatório seja evidenciado no futuro por meio da técnica ora proposta, seja possível lançá-los nas pastagens, como parte de um esquema de manejo de pragas afim de diminuir a quantidades de larvas infectantes e reduzir os prejuízos decorrentes do parasitismo animal.

Outro aspecto relevante se refere aos efeitos de drogas parasitárias, mais especificamente, as lactonas macrocíclicas. Estudos sobre os efeitos da molécula sobre a fauna presente nas placas de fezes bovinas, realizados quando da introdução desta família química no mercado (RONCALLI, 1987), ignoraram quaisquer consequências sobre os ácaros que posteriormente colonizam as massas fecais. Desta maneira, levando-se em conta as observações de Axtell (1963 a) e de Mattos (1992) acerca dos efeitos deletérios de produtos químicos sobre populações de macroquelídeos, é bastante provável que espécies importantes com grande potencial predatório tenham sido prejudicadas ou até mesmo extintas antes de serem sequer reconhecidas como agentes de controle biológico para a pecuária.

#### 4.5 CONCLUSÃO

A adaptação do teste de coprocultura para avaliar a pressão exercida pelas espécies de macroquelídeos em populações de nematódeos gastrintestinais foi bem sucedida, principalmente com relação a recuperação das larvas de nematódeos.

A divisão das fezes em triplicata para que um frasco ficasse reservado unicamente para recuperação de ácaros mostrou-se a forma mais prática e eficaz para recuperação de ácaros.

A colônia de *Holostaspella bifoliata* se desenvolveu somente com a dieta restrita oferecida no laboratório.

Os testes demonstraram bons resultados, evidenciando que em meio selvagem as larvas infectantes dos nematódeos gastrintestinais possivelmente fazem parte da dieta fisiológica do *H. bifoliata*.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATIELLO, M. J. A culture chamber for rearing soil mites. *Turttox News*, Chicago. 1965, v.43, n.7, p. 162-164, 1965.

AMBROS GINARTE, C. M. **Efeitos de extratos de plantas e inseticidas de segunda e terceira gerações em populações de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)**. 2003. 136p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2003.

AXTELL, R.C. Effect of Macrochelidae (Acarina: Mesostigmata) on house fly production from dairy cattle manure. **J. Econ. Entom.**, v.56, p.317-321, 1963a.

AZEVEDO, L.H.; FERREIRA, M.P.; CASTILHO, R.C; CANÇADO, P.H.D.; MORAES, G.J. Potential of *Macrocheles* species (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) as control agents of harmful flies (Diptera) and biology of *Macrocheles embersoni* Azevedo, Castilho and



Berto on *Stomoxys calcitrans*(L) and *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Bio. Cont.**, v.123, p.1-8, 2018.

AZEVEDO, L.H; LEITE, L.G; CHACON-OROZCO, J.G; MOREIRA, M.F.P.; FERREIRA, M.P.; GONZÁLES-CANO, L.M.; BORGES, V.; RUEDA-RAMÍREZ, D.; MORAES, G.J.; PALEVSKY, E. Free living nematodes as alternative prey for soil predatory mites: An interdisciplinary case study of conservation biological control. **Biol. Cont.** v.132, p.128-134, 2019.

CICOLANI, B. Macrochelid mites (Acari: Mesostigmata) Occurring in animal droppings in the pasture ecosystem in central Italy. *Agric. Eco. Environ.* v. 40, p. 47-60, 1992.

FILIPPONI, A.; DELUPIS, G. D. Sul regime dietetico di alcuni Macrochelidae (Acari: Mesostigmata), associati in natura a muscidi di interesse sanitario. **Riv. Paras.**, v.24, p.277–287, 1963.

HALLIDAY, R. B.; HOLM, E. Mites of the family Macrochelidae as predators of two species of dung-breeding pest flies. **Entom.**, v.32, p.333–338, 1987.

HASSAN, M. F.; ALI, F. S.; HUSSEIN, A. M.; MAHGOUB, M. H. Biological studies on *Macrocheles muscaedomesticae* Scopoli fed on different stages of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. **Zell. Egy. J. Bio. Pes. Cont.**, v.12, p.43–46, 2002.

HAWKINS, J. A. Economic benefits of parasite control in cattle. **Veter. Paras.**, Dublin, v.46, n.1-2, p.159-173, 1993.

JUSTUS, A. **Morfometria, assimetria flutuante e tabelas de vida e de fertilidade em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)**. 2002. 90 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2002.

LOPES, W. D. Z. *et al.* Anthelmintic efficacy of oral trichlorfon solution against ivermectin resistant nematode strains in cattle. **Veterinary Parasitology.**, Dublin, v.166, n.1-2, p.98-102, 2009.

LOPES, W. E. Z.; COSTA, A. J.; BORGES, F. A.; VULCANI, V. A. S.; RABELO, R. E.; BICHUETTE, M. A. Nematódeos de Ruminantes Domésticos. In: LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J. (Org.). **Endoparasitoses de Ruminantes. Goiana**: Editora UFG, 2017. 242p.

MANNING, M. J.; HALLIDAY, R. B. Biology and reproduction of some Australian species of Macrochelidae (Acarina). **Aust. Entom.**, v.21, p.89–94, 1994.

MATTOS, M.R. Macrochelideos associados a fezes acumuladas em granjas de aves poedeiras do município de Montemor, Estado de São Paulo: Levantamento, taxonomia e estudos populacionais (Acari: Gamasida: Macrochelidae). 1992. 76f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - IB., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

O'DONNELL, A. E.; AXTELL, R. C. Predation by *Fuscuropoda vegetans* (Acarina: Uropodidae) on the house fly (*Musca domestica*). **Ann Entomol Soc Am.**, v.58, p.403–404, 1964.

OLIVEIRA, A. R.; MORAES, G. J.; DEMÉTRIO, C. G. E.; NARDO, E. A. E. Efeito do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* sobre Oribatida edáficos (Arachnida: Acari) em um campo de soja, Jaguariúna. **Embr. Meio Am.**, 2001.

PEREIRA C.; CASTRO M.P. Contribuição para o conhecimento da espécie tipo de “*Macrocheles Latr*”. (“Acarina”): “*M. muscaedomesticae* (Scopoli, 1772)” Emend. **Arq., Inst. Biol.**, São Paulo, v.16, n.13, p.153–186, 1945.

PEREIRA, C.; CASTRO, M. P. Forese e partenogênese arrenótoca em “*Macrocheles muscaedomesticae*” (Scopoli) (“Acarina: Macrochelidae”) e sua significação ecológica. **Arq. Inst. Biol.**, v.18, p.71–89, 1947.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em < <http://www.R-project.org>>, Acessado em 28 de fevereiro de 2019.

ROBERTS, F. H. S.; O’SULLIVAN, P. J. Methods for eggs counts and larval cultures for Strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Aust. Jour. Agric. Rese.**, v.1, p.99-192, 1950.

ROCALLI, R. A. Environmental Aspects of Use of Ivermectin and Abamectin in Livistock: Effects on Cattle Dung Fauna. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) **Ivermectin and Abamectin**. Springer-Verlag, 1989. 173p, Chap. 12.

RODRIGUEZ, J. G.; WADE, C. F.; WELLS, C. N. Nematodes as a natural food for *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae), a predator of the house fly egg. Ann. **Ent. Soc. Amer.**, v.55, n.5, p. 507-511, 1962.

STROMBERG, B. E. *et al.* *Coperia punctate*: Effect on cattle productivity? **Veter. Paras.**, Dublin, v.183, n.1-2, p.284-291.2012.

WHITLOCK, H. V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **Jour. Co. Sci. Ind. Rese.**, v.21, p.177-180,1948.