

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

REVISÃO DE LITERATURA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Renata Ferretto

PORTO ALEGRE

2013/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

REVISÃO DE LITERATURA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Autor: Renata Ferretto

Orientador: Jorge José Bangel Jr.

Coorientador: João Ricardo de Souza Martins

**Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da Graduação em Medicina
Veterinária**

PORTO ALEGRE

2013/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Arlindo Ferretto e Doralice Zilli Ferretto por terem me educado e me ensinado a lutar por aquilo que se quer. À minha mãe, obrigada por estar sempre de braços abertos para me receber, por me deixar livre para escolher meus caminhos e saber exatamente a hora certa de falar, repreender e cobrar. Ao meu pai dedico tudo o que sou, estará sempre no meu coração e na minha memória.

As minhas irmãs Patrícia Fátima Ferretto e Cinara Ferretto que sempre se empenharam junto comigo para que conseguir fazer a minha faculdade. Pelo apoio, por ter me dado aquela “sacudida” para aprender a viver. Pelas brigas que de uma maneira ou outra acabam nos amadurecendo. Vocês foram peças essenciais para essa realização. Ao meu cunhado Adriano Gotardo, por estar sempre a disposição e pronto à ajudar.

Ao meu afilhado Henrique Ferretto Carbonari, que representou um recomeço em nossas vidas, por fazer os meus retornos para casa serem ainda mais maravilhosos, por poder olhar o seu rostinho e esquecer qualquer problema ou tristeza. Meu amado do coração.

Ao Jonas Perin, meu namorado e colega por ter entrado na minha vida no início do curso e estar ao meu lado hoje e sempre.

A toda a minha família, por todos entenderem as minhas ausências nos encontros de família, por terem torcido para que esse momento se concretizasse.

Ao professor e orientador Jorge José Bangel Jr., obrigada pelo empenho em tentar nos tornar pessoas e profissionais diferenciados.

Ao Dr. João Ricardo de Souza Martins, meu coorientador pelo apoio, ensinamentos e disponibilidade para me ajudar. Ao Dr. Guilherme Marcondes Klakfe que não mediu esforços para auxiliar na construção deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante a faculdade, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, em especial a Roberta Mazzocchin, a Mariana Menegat e a Cintia Simoni.

A todos os demais profissionais que tive contato, por terem dividido seu conhecimento e experiências.

Aos professores da UFRGS que de uma maneira ou outra contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Enfim, a todos que estiveram próximos e vivenciaram esses cinco anos e meio comigo.

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* está amplamente distribuído, predominando nas áreas tropicais e subtropicais. Segundo a FAO, 1984 80% da população bovina mundial está exposta à infestação de carrapatos. Trata-se de um parasito monóxeno com ciclo biológico dividido em uma fase parasitária e outra fase de vida livre, sendo o bovino seu hospedeiro preferencial. É responsável por inúmeras perdas econômicas na pecuária bovina, devido aos danos diretos ao animal ou por ser vetor de patógenos, como os protozoários do gênero *Babesia* e a bactéria do gênero *Anaplasma*, agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina. No Brasil, por exemplo, a perda devido ao seu impacto direto e indireto foi estimado em dois bilhões de dólares (GRISI *et al.*, 2002). O controle do carrapato do bovino baseia-se principalmente no uso de produtos químicos. O uso intensivo e indiscriminado de acaricidas tem levado ao desenvolvimento de resistência à maior parte das classes de químicas existentes no mercado (SPAGNOL; PARANHOS; ALBUQUERQUE; 2010). No Brasil, já foram registradas populações resistentes aos organofosforados (FARIAS, 1999), aos piretróides sintéticos, ao amitraz (FURLONG, 1999), a ivermectina (MARTINS; FURLONG, 2001; KLAFKE *et al.*, 2006) e mais recentemente ao fipronil (CASTRO-JANER *et al.*, 2010). Os indivíduos resistentes sobrevivem a pressão de seleção graças a mecanismos comportamentais e fisiológicos que permitem a sua adaptação evolutiva. As metodologias para diagnóstico da resistência são os bioensaios *in vitro* (baseados nos estágios de vida livre do carrapato) ou *in vivo* (testes de estábulo e de campo) e as técnicas moleculares. Entre os testes com adultos, o mais utilizado é o Teste de Imersão de Adultas (TIA) (DRUMOND *et al.*; 1973). O TIA é de fácil execução e os produtos comerciais podem ser usados, porém é necessário um número mínimo de teleóginas para sua realização. O bioensaio com larvas adotado como padrão pela FAO é o Teste do Pacote com Larvas (STONE; HAYDOCK, 1962), um teste rápido (resultados em 24 horas), simples, eficiente, de baixo custo e que requerer poucos equipamentos. As técnicas moleculares se caracterizam por identificar o genótipo da resistência e apresentarem resultados em menos tempo (24 horas) que os bioensaios (*in vivo* ou *in vitro*) os quais detectam o fenótipo (viva/morta). Porém, a detecção de resistência por esse método é limitada em função do pouco conhecimento de genes responsáveis pela resistência, sendo necessário realizar mais ensaios específicos com cada gene.

Palavras-chave: *R. microplus*, bovinos, acaricidas, resistência, diagnóstico

ABSTRACT

The tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus is widely distributed, predominantly in tropical and subtropical areas. According to the FAO, in 1984 80% of the world cattle population is exposed to tick infestation. It's a parasite monóxeno with biological cycle divided into a parasitic phase and another phase of life free, being the bovine its preferred host.. It is responsible for numerous economic losses in cattle due to direct injury to the animal or as being a vector of pathogens, such as protozoa of the genus Babesia and the bacteria of the genus Anaplasma, causative agents of bovine babesiosis. In Brazil, for example, the loss due to their direct and indirect impact was estimated at two billion dollars (GRISI et al., 2002). The control of cattle tick is mainly based on the use of chemicals. The intensive and indiscriminate use of acaricides has led to the development of resistance to most classes of chemicals on the market (SPAGNOL; PARANHOS; ALBUQUERQUE, 2010). In Brazil, have been recorded populations resistant to organophosphates (FARIAS, 1999), synthetic pyrethroids, to amitraz (FURLONG, 1999), ivermectin (MARTINS; FURLONG; 2001 and KLAFFE et al., 2006) and more recently fipronil (CASTRO-JANER et al., 2010). The resistant individuals survive the selection pressure due to physiological and behavioral mechanisms allowing their evolutionary adaptation. The methodologies for diagnosis of resistance are the in vitro bioassays (based on the free-living stages of ticks) or in vivo (stable testing and field) and molecular techniques. Between tests with adults, the most used is the Test of Adult Immersion (TIA) (DRUMOND et al., 1973). The TIA is easy to perform and the commercial products can be used, but requires a minimum number of ticks for its realization. The bioassay larvae adopted by FAO's Test Package with larvae (STONE; HAYDOCK, 1962), a rapid test (results in 24 hours), simple, efficient, inexpensive and require little equipment. Another bioassay with larvae that is often used is the Test Immersion Larvae (TIL). Molecular techniques are characterized by resistance to identify the genotype and results presented in less time (24 hours) the bioassay (in vivo or in vitro) which detect the phenotype (alive / dead). However, detection of resistance by this method is limited by poor knowledge of the gene responsible for resistance, it is necessary to perform further tests specific to each gene.

Keywords: R. microplus, cattle, acaricides, resistance, diagnosis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	CARRAPATO <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>.....	8
2.1	Origem, classificação e distribuição.....	8
2.2	Ciclo biológico.....	8
2.2.1	Fase não parasitária.....	9
2.2.2	Fase parasitária.....	10
2.3	Importância <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>.....	12
2.3.1	Danos diretos.....	12
2.3.2	Danos indiretos.....	12
3	COMBATE CONTRA <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>.....	13
4	RESISTÊNCIA A ACARICIDAS.....	14
4.1	Mecanismos de resistência aos acaricidas em <i>R.microplus</i>.....	15
4.2	Histórico de desenvolvimento de resistência aos acaricidas.....	16
4.2.1	Resistência a arsenicais.....	17
4.2.2	Resistência a organoclorados.....	17
4.2.3	Resistência a organofosforados.....	18
4.2.4	Resistência a piretróides sintéticos.....	18
4.2.5	Resistência a formamidínicos.....	19
4.2.6	Resistência a lactonas macrocíclicas.....	20
4.2.7	Resistência a fenil pirazol.....	21
5	DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA.....	22
5.1	Bioensaios <i>in vivo</i>.....	23
5.2	Bioensaios <i>in vitro</i>.....	22
5.2.1	Teste de imersão de adultos (TIA).....	23
5.2.2	Teste de pacote com larvas (TPL).....	25
5.2.3	Teste de imersão de larvas (TIL).....	26
5.3	Técnicas moleculares.....	26
6	CONCLUSÕES.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29
	ANEXO: Avaliação <i>in vitro</i> de duas novas formulações acaricidas contra populações de campo e cepas multiresistentes de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>.....	37

1 INTRODUÇÃO

O carrapato *R. microplus* é responsável por sérias perdas econômicas na pecuária bovina brasileira. Os danos econômicos causados por esse parasito podem ser classificados em dois grupos: em um enquadram-se os danos decorrentes da ação direta, caracterizados pela espoliação sanguínea e suas consequências como anemia, prurido, irritação determinando baixo rendimento produtivo (perda de peso, predisposição a instalação de miíases, e a desvalorização do couro). Em outro grupo, encontram-se os problemas acarretados pela ação indireta, onde a transmissão de agentes patogênicos, como os hemoprotozoários causadores da Tristeza Parasitária Bovina (TBP): *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e a bactéria *Anaplasma marginale*. Esses organismos causam severos danos econômicos aos produtores em consequência da alta incidência de mortalidade e morbidade que ocasionam nos animais infectados.

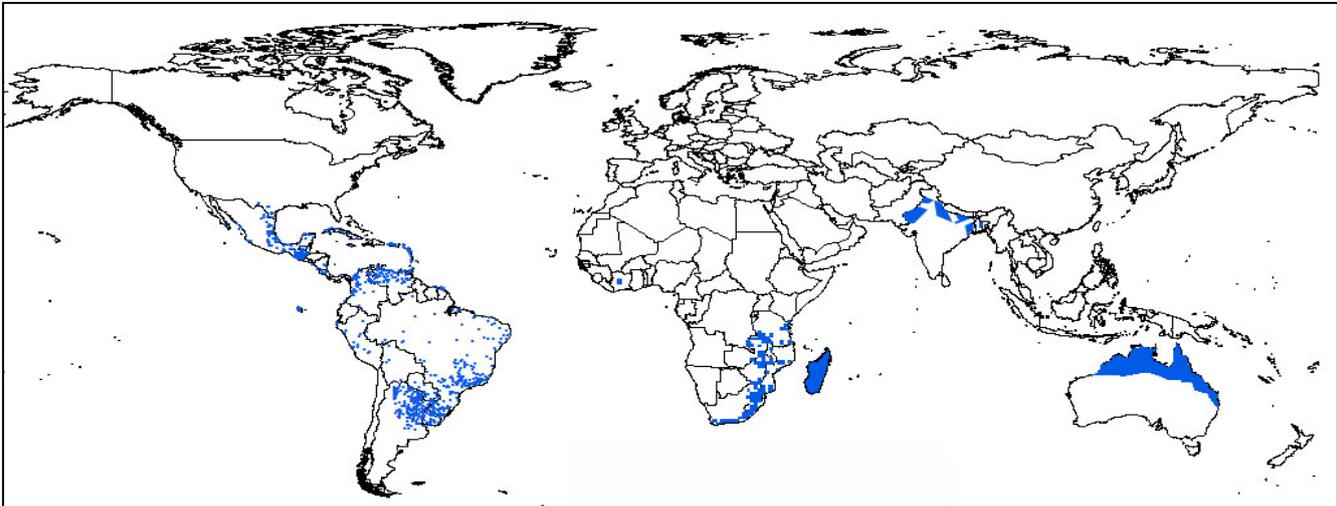
O controle do *R. microplus* é bastante complexo em virtude da interação de vários fatores como, a raça do bovino, a época do ano, as condições ambientais e o manejo, entre outros. Atualmente, o controle desse parasito é feito principalmente por meio de carrapaticidas (DE LA FUENTE *et al*, 2000; FRAGA *et al*, 2005; VARGAS *et al*, 2003) e a introdução dessas drogas, com variados princípios ativos (organofosforados, formamidinas, piretróides sintéticos e lactonas macrocíclicas), é considerada um dos fatores preponderantes no desenvolvimento da pecuária em várias regiões (CASTRO;NEWSON, 1993). A falta de embasamento técnico na adoção de medidas de controle do *R. microplus*, associada ao baixo nível de escolaridade dos produtores rurais de algumas regiões, reduzem a eficiência e a vida útil dos produtos mais amplamente utilizados no controle químico desse parasito (ROCHA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009). Não se pode prever que sempre haverá um novo acaricida disponível para resolver o problema da resistência, uma vez que os custos para o desenvolvimento de novos ingredientes ativos podem chegar a 200 milhões de dólares e dependendo da situação, pode levar cerca de doze anos para poder ser comercializado (HENNESSY, 1997). Logo, é fundamental a conscientização e o uso ponderado dos acaricidas pelos produtores rurais.

2 CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.1 Origem, classificação e distribuição

A espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* originou-se provavelmente da Ásia, adaptando-se perfeitamente ao clima das áreas tropicais, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWELL; REID, 1982). Este parasito, conhecido no Brasil como carrapato dos bovinos, é um ectoparasito hematófago que pertence ao filo Artropoda, classe Aracnida, ordem Acarina, subordem Metastigmata e superfamília Ixodidea, gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*. Os carrapatos do gênero *Boophilus* foram reclassificados recentemente, por meio de um estudo de filogenética molecular, como pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* (MURREL; BARKER, 2003). Este se encontra amplamente distribuído nos rebanhos bovinos das Américas Central e do Sul, África, Ásia e Oceania entre os paralelos 32°N e 32°S, sendo um dos principais parasitos que afetam a pecuária destas áreas (JOHNSTON *et al.*, 1982). Segundo a FAO (1984) 80% da população bovina do mundo está exposta à infestação de carrapatos.

Figura 1 – Distribuição mundial do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*



Fonte: ICCTD, 2004

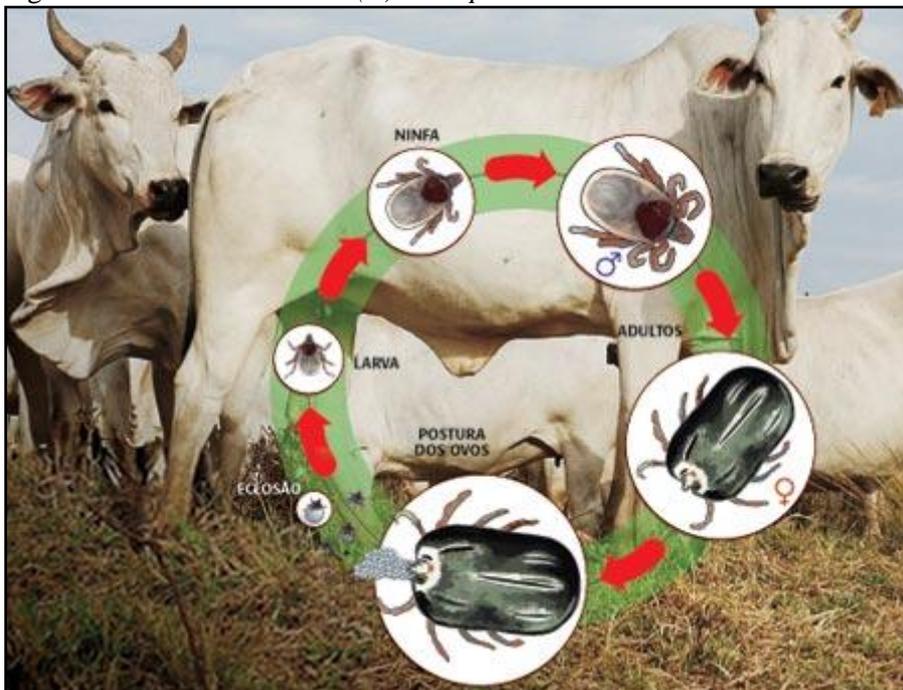
2.2 Ciclo de vida do *R. microplus*

O *R. microplus* parasita um único hospedeiro (monoxeno), isto é, depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida, preferencialmente os bovinos e secundariamente outras espécies como bubalinos, equídeos, ovinos, caprinos e cervídeos. Seu ciclo biológico divide-se em duas fases: a de vida livre e a de vida parasitária (Fig 1).

2.2.1 Fase não parasitária

Esta se inicia após a queda da teleógina com o período de pré-postura e se estende até a eclosão dos ovos e a transformação das neolarvas em larvas infestantes (GONZALES, 1974). Considera-se que 95% da população de carrapatos encontra-se no ambiente, tanto na forma de larvas infestantes e de ovos (maioria), como na forma de fêmeas em período de pré-postura e de postura. Esse dado é de suma importância, pois um único tratamento carrapaticida no hospedeiro atingirá somente aqueles carrapatos que estão na fase parasitária naquele momento, surtindo mínimo efeito na população que se encontra majoritariamente no ambiente.

Figura 1 – Ciclo de vida de *R.(B).microplus*



Fonte: REVISTA Globo Rural, 2013

De forma simplificada a fase não parasitária do *R. microplus* pode ser assim descrita: após a queda da fêmea ingurgitada, são necessários em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura. No período de postura cada fêmea pode colocar dois a três mil ovos que eclodem em duas a três semanas, dependendo das condições de temperatura e umidade relativa do ar. As larvas recém eclodidas não tem poder infestante, pois elas precisam de um tempo para fortalecimento da cutícula, em geral de quatro a seis dias, sendo que após esse período, elas sobem nas hastes dos capins, principalmente no período da manhã, aguardando a passagem do hospedeiro para parasitá-lo (Figura 2). O tempo de vida livre do carrapato do bovino gira em torno de 60 dias, podendo se estender a mais de 300 dias, dependendo das condições ambientais e da época do ano.

Segundo Wilkinson (1970) o ovo é o estágio mais suscetível à dessecação nos Ixodídeos, isso por que ele é o único estágio imóvel no ciclo de vida do carrapato. Snowball (1957) verificou que temperaturas abaixo de 21,1°C ou acima de 30°C, mesmo quando associadas a altas umidades relativas, podem inibir a eclosão dos ovos. Oba *et al.*, (1976) trabalhando a 27°C e 80% de umidade relativa, obtiveram 80,32% de eclosão, enquanto Bennet (1974) e Vega (1976) obtiveram 95% de eclosão com 30°C e 100% de umidade relativa. Isso mostra o quanto a temperatura e a umidade relativa afetam o desenvolvimento embrionário do *R. microplus*.

Figura 2 – Larvas infestantes de *R. microplus*, na haste do capim à espera de um hospedeiro



Fonte: REVISTA Interural, 2013

2.2.2 Fase parasitária

A fase de vida parasitária é praticamente estável em todas as regiões segundo Gonzales (1975) e inicia-se quando a larva infestante instala-se no hospedeiro e dura em torno de 21 dias. Ao eclodir o ovo, surge uma larva hexapoda que apresenta geotropismo negativo (COTTON, 1915) e fototropismo positivo (WILKINSON, 1953) o que determina a ascensão das larvas no capim buscando um hospedeiro. As larvas na haste do capim apóiam-se no segundo e terceiro pares de patas, agitando o primeiro como num esforço para localizar o hospedeiro (COTTON, 1915; LEGG, 1930). Ao alcançarem o hospedeiro, as larvas movimentam-se por cerca de uma hora, quando então fixam-se por meio das suas peças

buciais, dando início à fase parasitária propriamente dita (RIEK, 1965). O *R. microplus* é encontrado principalmente em regiões anatômicas do hospedeiro que oferecem temperatura e espessura da pele adequadas ao seu desenvolvimento. Doube; Kemp (1979) ao estudarem *in vitro* a influência da temperatura da pele bovina na fixação e sobrevivência das larvas de *R. microplus*, concluíram que as larvas se acumulam em regiões do hospedeiro onde a temperatura varia entre 31 e 38°C.

As larvas de *R. microplus* alimentam-se preferencialmente de plasma, e apenas nos estádios finais que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas é que o sangue torna-se o principal constituinte alimentar (TATCHELL *et al.*, 1972). O acasalamento ocorre a partir do 17º dia da infestação (LONDT; ARTUR, 1975) durante o repasto sanguíneo da fêmea. Após a fertilização há um rápido ingurgitamento da fêmea podendo está aumentar em até 200 vezes o seu peso culminando com a queda da fêmea ingurgitada. Segundo Moorhouse; Tatchell (1966), a maior parte das fêmeas que atingem comprimento superior a 4,5mm, em cerca de 10 horas, completa seu ingurgitamento. Uma vez em condições a fêmea fará oviposição e depois morrerá. Os machos permanecem mais tempo no bovino podendo se acasalar com outras fêmeas.

Figura 3- Parasitismo por *R. microplus*



Fonte: EMBRAPA Gado de corte, 2011

2.3 Importância do *R. microplus*

O carrapato *R. microplus* é responsável por expressivas perdas à pecuária bovina brasileira, estimativas mostraram que o impacto econômico anual pode ser maior que US\$ 2 bilhões de dólares (GRISI *et al.*, 2002).

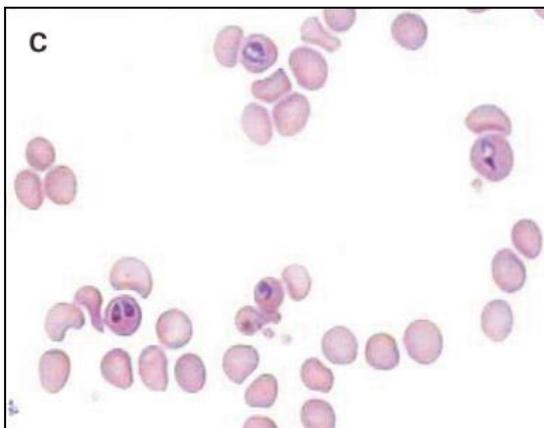
2.3.1 Danos diretos

São decorrentes da ação direta sobre o hospedeiro. Estima-se que cada carrapato ingira de 1-3 ml de sangue para completar seu ciclo de vida num animal. Logo, a espoliação sanguínea causada por vários parasitos pode causar anemia e perda de nutrientes. Além disso, a irritação causada pelos carrapatos leva a uma redução da ingestão de alimentos pelos animais. Acrescenta-se também a desvalorização do couro pelos danos à pele, e altas infestações predispoem a instalação de míases. Todos esses fatores têm um impacto negativo sobre o ganho de peso, na produção de leite e na valorização do couro.

2.3.2 Danos indiretos

Entre os danos causados pela ação indireta destacam-se à transmissão dos patógenos causadores da Tristeza Parasitária Bovina (os protozoários do gênero *Babesia* e a bactéria do gênero *Anaplasma*) (Fig 4). Os agentes da TPB causam severas perdas econômicas aos produtores em consequência de elevados casos de mortalidade e morbidade que ocasionam nos animais infectados. A mortalidade foi estimada em 1,2% das cabeças de gado no Brasil (HORN, 1983). Além disso, devem ser consideradas as perdas econômicas relacionadas à mão de obra, despesas com instalações, compra de acaricidas e equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos (CORDOVÉS, 1999).

Figura – 4 *Babesia bigemina* parasitando eritrócitos



3 COMBATE CONTRA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Não há no país um programa oficial de controle do carrapato bovino, sendo o tratamento curativo o mais adotado pelo produtor rural. Inúmeras são as causas do insucesso desse tipo de tratamento, entre elas pode-se destacar: aplicação baseada na visualização do carrapato ou no nível de infestação dos animais concentrando a aplicação do acaricida na fase parasitária da vida do carrapato. Na região Sudeste do Brasil, o número de banhos carrapaticidas varia de seis a 24 por ano (média de 12 banhos/ano) e utiliza-se de 500 a 1000 mL de calda carrapaticida por animal (ROCHA, 1996). Desconhecimento da tríade parasito-hospedeiro-ambiente, da biologia e da ecologia do *R. microplus* nas diferentes regiões do país é uma constatação que dificulta o sucesso do controle do carrapato, tornando os tratamentos curativos cada vez menos eficazes.

Um agravante desse tratamento sem prévio planejamento é o aceleramento do surgimento de populações de *R. microplus* resistentes aos carrapaticidas, uma vez que os químicos constituem-se na base do controle desse parasito. O produtor reconhece que o carrapaticida perde sua eficácia com o tempo de uso, mas desconhece os mecanismos de como isso ocorre (ROCHA, 1996). A associação da troca constante de formulações carrapaticidas e o elevado número de tratamentos por ano (alta pressão de seleção) culminaram com o surgimento de populações de carrapatos resistentes a praticamente todas as formulações comerciais para controle de carrapatos (LEITE *et al.*, 1995).

4 RESISTÊNCIA A ACARICIDAS

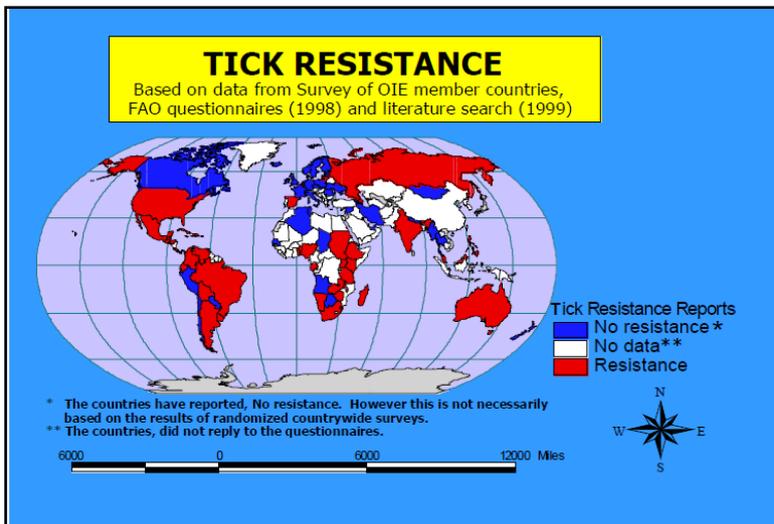
Nas últimas décadas, o controle químico do carrapato do boi tem se concretizado como a forma predominante, por ser prático, eficaz e econômico. No entanto, o uso excessivo de carrapaticidas, sem o entendimento da ecologia e epidemiologia do carrapato, aliado as falhas na detecção e na aplicação, levou ao desenvolvimento de resistência à boa parte das drogas disponíveis no mercado (SPAGNOL; PARANHOS; ALBUQUERQUE, 2010). Um indício do desenvolvimento de resistência à campo é, quando o produto que anteriormente se mostrava eficiente para o controle, já não demonstra o mesmo efeito, desde que utilizado sob condições adequadas de aplicação (quantidade suficiente de calda por animal, dosagem correta) (BENAVIDES *et al.*, 2001).

As populações de carrapatos, que ao serem expostas aos acaricidas, tiverem seu potencial de sobrevivência e reprodução preservados, podem ser consideradas resistentes. Segundo FAO (2004) a resistência pode ser definida como um aumento significativo no número de carrapatos, capazes de tolerar doses de drogas comprovadamente letais para a maioria dos indivíduos da mesma espécie. A resistência a várias classes de carrapaticidas vem aumentando rapidamente como resultado da excessiva pressão de seleção determinada pelo uso intensivo de drogas por um longo período (NARI; HANSEN, 1999). Já foi demonstrado que o *R. microplus* pode desenvolver resistência mais rapidamente que outros carrapatos, por possuir um curto período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995). Tal fato, quando somado à pressão seletiva que sofrem por excesso de aplicação de carrapaticidas, favorece o surgimento de populações geneticamente diferentes. Essa diferença pode estar relacionada à sensibilidade a uma determinada droga, promovendo gerações resistentes (RANDOLPH 2004). Em muitas regiões do mundo o problema da resistência para a maioria das drogas é gravíssimo, tem sido detectada a organofosforados, piretróides sintéticos e, mais recentemente, para amitraz e lactonas macrocíclicas (Figura 5).

No Brasil, foram registradas populações de carrapatos resistentes a maioria das classes de drogas usadas para o seu controle. Farias (1999) relatou casos de resistência a organofosforados e piretróides sintéticos; Furlong (1999) ao amitraz na região sul e sudeste. Em meados da década de 90, intensificou-se o uso das lactonas macrocíclicas, servindo como uma alternativa no controle de populações resistentes aos compostos citados anteriormente, e pela facilidade de aplicação. O resultado desse uso massivo foi o surgimento de populações de campo resistentes a esse grupo químico (MARTINS; FURLONG, 2001) e posteriormente foi detectada resistência à ivermectina através de testes *in vitro* (KLAFKE *et al.*, 2006). Mais

recentemente, Castro-Janer *et al.* (2010) confirmou a ocorrência de populações de carrapatos resistentes a Fipronil no Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo.

Figura 5 – Distribuição mundial de resistência de carrapatos a acaricidas



Fonte: FAO, 2004

4.1 Mecanismos de resistência

Os indivíduos resistentes sobrevivem à pressão de seleção graças a mecanismos comportamentais e fisiológicos que permitem a sua adaptação evolutiva. Os mecanismos fisiológicos e os genes que os regulam têm sido cada vez mais estudados. Esses mecanismos são principalmente: a diminuição da penetração cuticular da droga, o aumento do poder sequestrante de moléculas tóxicas ou mesmo insensibilidade a compostos tóxicos (OAKESHOTT *et al.*, 2003) e aumento de detoxificação celular. O fundamento molecular da resistência pode ser resumido em três tipos: 1- aumento da expressão de genes ou aumento da atividade de enzimas envolvidas em metabolismo de detoxificação, 2- mutações em neurorreceptores e, 3- mutações em canais de sódio (RUFINGIER *et al.*, 1999). Basicamente três sistemas enzimáticos podem estar envolvidos no metabolismo de inseticidas em geral: as citocromos P450, as esterases e as glutatona S-transferases (RANSON *et al.*, 2002).

Os citocromos P450 são um grupo de enzimas que catalisam uma grande variedade de reações químicas e agem sobre diversos substratos, oxidando compostos endógenos e exógenos ou tornando os compostos tóxicos mais solúveis, facilitando a sua excreção. As P450 monooxigenases são enzimas capazes de detoxificar artrópodes, inclusive *R. microplus* de piretróides e organofosforados (LEE *et al.*, 2002). As esterases estão envolvidas na detoxificação de organofosforados, em especial as acetilcolinesterases (AChE) e as

carboxipeptidases. E por fim, as glutatona S-transferases, são capazes de conjugar a glutatona reduzida aos centros eletrofílicos de compostos exógenos e endógenos, para formar um composto mais solúvel e fácil de ser excretado. Elas são responsáveis pela detoxificação de organoclorados (DDT), organofosforados e piretróides sintéticos (LI *et al.*, 2007) e ivermectina (STUMPF; NAUEN, 2002).

4.2 Histórico de desenvolvimento de resistência aos acaricidas

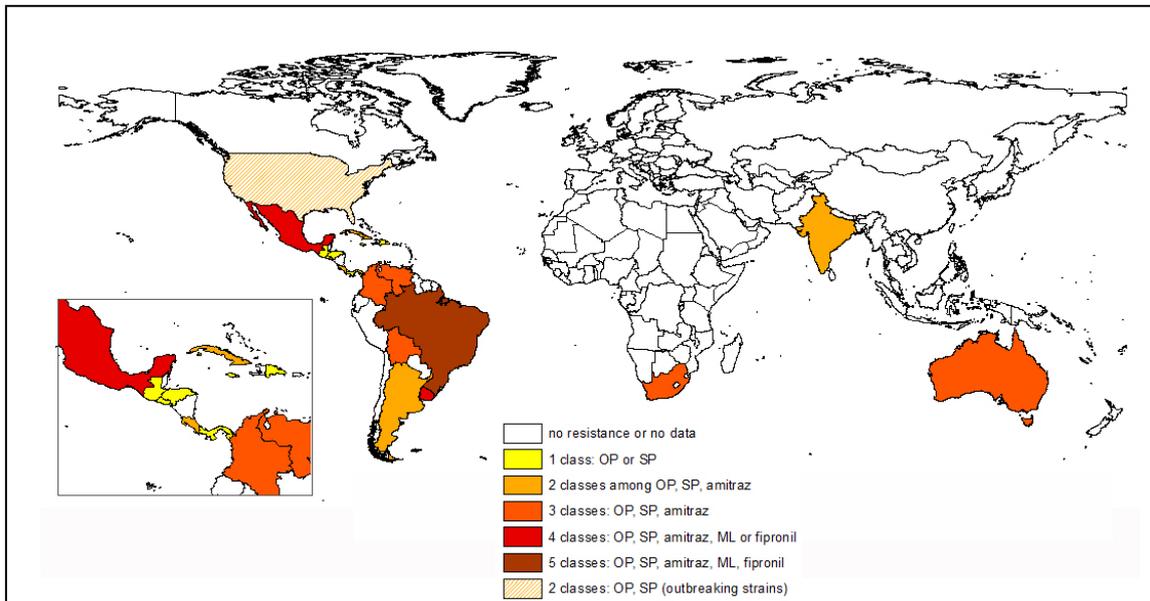
O controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é feito principalmente por meio de acaricidas. Desde o final do século XIX, pesquisadores vêm buscando produtos com a finalidade de combater o carrapato dos bovinos, sendo o arsênico o primeiro composto registrado para essa finalidade. Posteriormente, surgiram os organoclorados, os organofosforados, os piretróides sintéticos, os amidínicos, as benzoilfenilurétrias, o fenilpirazol e as lactonas macrocíclicas (avermectinas/milbemicinas).

Diante da exposição contínua aos compostos químicos, os carrapatos têm desenvolvido ao longo dos anos, um mecanismo de sobrevivência capaz de tolerar os ingredientes ativos utilizados para controlá-los, fenômeno conhecido como resistência. Os primeiros relatos de tal fenômeno foram feitos em 1936, na Austrália contra *R. microplus* e em 1938 na África do Sul, contra *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* (WHARTON, 1983) após décadas de uso do arsênico. Desde esse período travou-se uma batalha na luta contra o carrapato do bovino.

Os carrapaticidas são classificados em famílias ou grupos químicos. Com o decorrer do tempo, novos grupos químicos foram sendo lançados e outros desapareceram. Na atualidade, além dos grupos químicos pode-se agrupar os carrapaticidas conforme sua atuação em sistêmicos e em contato. Os compostos sistêmicos são aplicados por meio de injeções (subcutâneas ou intramusculares), ou *pour on*. Seu princípio ativo é metabolizado pelo organismo e distribuído a todo o corpo do animal, chegando, através da circulação, aos carrapatos, que então são intoxicados. Nessa classe, pode-se enquadrar: as Lactonas Macrocíclicas e as Benzofenilurétrias. Os compostos de contato são aplicados por meio de pulverização, imersão ou *pour on*. Para agirem é necessário o contato do produto com o carrapato o qual acaba penetrando pelos orifícios naturais ou mesmo pela cutícula, provocando a intoxicação e morte do parasito. São incluídos nessa classe: organofosforados, amidínicos, piretróides sintéticos, fenilpirazóis e naturalyte (FURLONG *et al.*, 2005). A figura 4 sintetiza a situação da resistência acumulada para as cinco classes de acaricidas a nível

mundial. São incluídos dados de publicações científicas (Inglês, Espanhol e Português), além de relatórios da FAO emitidos até junho de 2012.

Figura 6 – Relação da resistência acumulada aos acaricidas organofosforados (OP), os piretróides sintéticos (SP), amitraz, lactonas macrocíclicas (ML) e fipronil a nível mundial.



Fonte: Lovis, 2012

4.2.1 Resistência a arsenicais

Os compostos arsenicais foram os primeiros acaricidas a serem utilizados, sendo que isso ocorreu na Austrália em 1896 (ANGUS, 1996) dando início à história de controle químico dos carrapatos. No Brasil, populações resistentes ao arsênico começaram a aparecer a partir de 1950 (OLIVEIRA *et al.*, 1986). Freire (1953) relatou casos de resistência aos arsenicais surgidos em 1950 e 1952 no Rio Grande do Sul. Esses compostos exigiam cuidado na manipulação devido aos riscos de intoxicações ou perda de eficiência em função das alterações normalmente ocorridas nos banheiros carrapaticidas. Sendo substituídos por drogas mais eficazes e de manejo mais seguro, e não por resistência generalizada, como poderia ser pensado (ARTECHE *et al.*, 1977).

4.2.2 Resistência a organoclorados

Os inseticidas organoclorados, DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano), BHC (Benzenohexaclorado), Gamexano (Hexaclorociclohexano) e o Toxafeno, principais representantes dessa classe química (CORRÊA; GLOSS, 1956) foram disponibilizados no mercado, em 1949 no Rio Grande do Sul. Esses compostos substituíram os arsenicais, demonstrando bom resultado e maior segurança toxicológica no combate aos carrapatos, além de ser a alternativa no controle de carrapatos arsenioresistentes. Registra-se que os

organoclorados foram os primeiros inseticidas orgânicos sintéticos a serem comercializados (GEORGE *et al.*, 2004).

O primeiro relato de resistência foi registrado em 1952, no município de Alegrete, Rio Grande do Sul (CORRÊA; GLOSS, 1956). A partir de 1971, o uso dos compostos organoclorados na lavoura e pecuária foram proibidos no Brasil, segundo a IN 42 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Agronegócio (1999). Essa proibição se deve a grande capacidade de persistência no ambiente e a ação carcinogênica desse grupo químico.

4.2.3 Resistência a organofosforados

Os representantes deste grupo são derivados do ácido fosfórico e caracterizados por um mesmo mecanismo de ação. A atividade tóxica desse grupo está vinculada à atividade de inibir o complexo enzimático da acetilcolinesterase, a qual hidroliza a acetilcolina, ocasionando um aumento de acetilcolina em níveis tóxicos para os carrapatos e causando um aumento das contrações nos músculos até atingir a paralisia. Os principais representantes desse grupo utilizados no controle de carrapatos são: Ethion, Clorpirifós, Clorfenvinfós e Coumafós. Diferentemente dos organoclorados, os organofosforados são quimicamente instáveis e não acumulativos (GEORGE *et al.*, 2004).

A resistência do carrapato aos organofosforados está relacionada normalmente a um único gene semidominante, ou seja, os indivíduos heterozigotos também apresentam resistência, embora menor do que os homozigotos resistentes. Os mecanismos da resistência aos organofosforados ainda precisam ser melhor explicados, mas sabe-se que existe relação com a insensibilidade da acetilcolinesterase (FOIL *et al.*, 2004), com o aumento do metabolismo das esterases localizadas no intertegumento de teleóginas resistentes e com a superexpressão dessas enzimas em larvas (VILLARINO, 2001).

A primeira notificação de resistência a esse grupo na América do Sul ocorreu em 1963, segundo Oliveira *et al.*, (1986). No Brasil, as primeiras constatações de carrapatos resistentes foram registradas ao final da década de 60, no Rio Grande do Sul (ARTECHE *et al.*, 1975).

4.2.4 Resistência a piretróides

Os piretróides sintéticos foram introduzidos no mercado carrapaticida na década de 80. Existem no mercado produtos originários de pelo menos três subgrupos dessa família (Deltametrina, Cipermetrina e Alfametrina). Esse grupo atua causando hiperexcitabilidade nos artrópodes ao provocarem alterações nos íons Na^+ e Cl^- ao nível da junção neuromuscular. O mecanismo de ação determina uma rápida excitação inicial, seguida de paralisia e morte

(rápido efeito *knockdown*) (ROMA *et al.*, 2009). Os piretróides apresentam uma potente atividade inseticida e acaricida, baixa toxicidade aos mamíferos, prolongado efeito residual e maior biodegradabilidade no solo, justificando a rápida difusão desses ingredientes ativos na década de sua introdução.

Na tentativa de atrasar o surgimento da resistência e aumentar a eficiência dos piretróides, surgiram as associações com os organofosforados. Esses produtos tendem a ser mais baratos, pela menor concentração de piretróides, que possuem maior custo. Além disso, são eficientes no controle de populações organofosforados resistentes. Outra aplicabilidade é a possibilidade de controle concomitante entre o carrapato e a mosca-do-chifre (GEORGE *et al.*, 2004).

A primeira constatação de carrapatos resistentes aos piretróides sintéticos foi realizada nos anos 80, na Austrália (NOLAN, 1981), sendo que no Brasil, indícios iniciais de resistência à este grupo químico foram sugeridos por Leite (1988) e no Rio Grande do Sul Laranja *et al.*, (1989), notificaram pela primeira vez esta ocorrência. Foram identificados dois padrões de resistência para este grupo em *R. microplus*. Um deles é do tipo alteração de sítio de ação, acarretando modificações no gene do canal de sódio controlado por voltagem, presente no sistema nervoso central dos carrapatos, influenciando a ligação dos piretróides (HE *et al.*, 1999). O segundo mecanismo, menos entendido, envolve detoxificação metabólica mediada pela ação de esterases e de citocromo P450 (MILLER *et al.*, 1999). Uma característica do *R. microplus* é variação genética entre diferentes populações resistentes a piretróides, para esses mecanismos (GUERRERO *et al.*, 2001).

4.2.5 Resistência a formamidínicos

Atualmente, o amitraz é o principal ingrediente ativo desse grupo em atividade no mercado carrapaticida a mais de 30 anos. Este produto possui uma toxicidade mínima para bovinos e para os seres humanos, não apresentando período de retenção na carne. Assim, sua aplicação torna-se viável por apresentar um curto período de carência e por ser rapidamente degradado no ambiente (JONSSON; HOPE, 2007). Embora o mecanismo de ação do amitraz não seja completamente evidente, alguns autores, estudando o mecanismo de ação das formamidinas, postulam que existe interação desses acaricidas com o receptor de octopamina presente no sistema nervoso da praga alvo, além da inibição das monoamino oxidases (LI *et al.*, 2004).

Jonsson; Hope (2007) reportam que o modo de herança da resistência a amitraz é pouco conhecido e parece ser de característica poligênica. Apesar dos mecanismos de resistência ao amitraz ainda não serem bem esclarecidos, aponta-se que algumas cepas de *R. microplus* resistentes demonstram aumento de atividade enzimática de esterases e glutational-S-transferase (LI, 2004).

A resistência de *R. (B.) microplus* ao amitraz já foi relatada previamente em alguns países como: Venezuela (BRAVO *et al.*, 2008); Austrália (JONSSON; HOPE, 2007; JONSSON *et al.*, 2010), Colômbia (BENAVIDES, 1995) e México (LI *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2006). No Brasil, já há relatos de alguns casos de resistência ao amitraz (FURLONG, 1999; MILLER *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008; CAMPOS-JÚNIOR *et al.*, 2010).

4.2.6 Resistência as lactonas macrocíclicas

O grupo das lactonas macrocíclicas (LM) é dividido em avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) e em milbemicinas (moxidectina). A ivermectina foi introduzida comercialmente em 1981, possibilitou novas opções de manejo antiparasitário, em função da sua potencialidade, amplo espectro de ação (endo e ectoparasitos) e persistência no organismo (STRONG; BROWN, 1987). Essa singular atividade contra ecto e endoparasitos originou o termo “endectocidas”, aplicado a todos os componentes das lactonas macrocíclicas. Entre 2002 e 2006 a venda de endectocidas no Brasil cresceu 48,88% atingindo a marca de 500 milhões de doses vendidas (SINDAN, 2006), mostrando a ampla utilização desta classe química.

A ação das avermectinas se dá através da ligação da droga a canais de cloro mediados pelo GABA (Ácido Gama Amino-Butírico) ou devido a alta afinidade do fármaco aos canais de cloro controlados pelo glutamato, resultando em paralisia e morte dos artrópodes e nematóides (SHOOP *et al.*, 1995). Nesse caso, as concentrações são muito menores às necessárias para estimular os canais dependentes de GABA (CULLY *et al.*, 1994). Dessa forma, sugere-se que a ação parasiticida das avermectinas também seja mediada pela interação com canais de cloro regulados por glutamato (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996).

O primeiro relato no Brasil de resistência a essa classe de medicamentos, foi feita através de testes de campo (MARTINS; FURLONG, 2001) demonstrando resistência do *R. microplus* à doramectina, manifestando resistência cruzada com ivermectina. Após teste *in vitro* Klafke *et al.* (2006) comprovou outra população de carrapatos resistente a ivermectina no estado de São Paulo. Sendo esses, os dois primeiros relatos de resistência de carrapatos à

lactonas macrocíclicas feitos no Brasil. Em 2011, novos relatos de populações resistentes a ivermectina foram registrados por Klafke, 2011. O uso difundido de lactonas macrocíclicas para o controle de parasitos e a limitação na escolha de carrapaticidas alternativos, contribuem para que a resistência a este grupo de compostos se torne um grande problema (GEORGE *et al.*; 2004).

4.2.7 Resistência a fenilpirazol

O fipronil, inseticida pertencente ao grupo químico fenilpirazol, é uma molécula com alta seletividade pelos insetos em relação aos mamíferos (NARAHASHI *et al.*, 2007). Foi usado inicialmente para o controle de pragas agrícolas e de importância em saúde pública (COLLIOT *et al.*, 1992) e posteriormente em veterinária para o controle de parasitos externos (HAINZL; CASIDA, 1996). Seu uso no controle de carrapatos ocorreu no início da década de 90.

O fipronil age bloqueando os canais de íons cloreto que são controlados por ácido gama-aminobutírico (GABA) presente nos neurônios do sistema nervoso central dos insetos (BLOOMQUIST, 2003). O fipronil também é bloqueador dos canais de íons cloreto mediados pelo glutamato (NARAHASHI *et al.*, 2007) e esta característica explica em parte, a maior toxicidade seletiva para os insetos já que os mamíferos não tem esse tipo de canal.

Relatos de resistência a fipronil foi demonstrado inicialmente nas pragas agrícolas e de importância para a saúde pública (MINGZHANG *et al.*, 2004). O registro de populações de *R. microplus* resistentes a fipronil surgiram no Uruguai (CUORE *et al.*, 2007; CASTRO JANER *et al.*, 2009) e recentemente em vários estados do Brasil (CASTRO JANER *et al.*, 2010).

5 DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA

Um teste de diagnóstico ideal deve reunir muitos requisitos (FAO, 2004), entre eles: ser sensível o suficiente para identificar a resistência inicial na sua emergência, abranger toda a gama de grupos químicos que estão em uso, ser simples e barato, requerer um baixo número de fêmeas ingurgitadas. Além disso, ele deve fornecer resultados rápidos e confiáveis, e ser adequado para padronização entre laboratórios, em muitos países. No entanto, nenhum dos testes disponíveis satisfaz todos estes requisitos. Atualmente, a detecção da resistência é realizada por bioensaios *in vivo* ou *in vitro* e técnicas moleculares. Sendo que os bioensaios têm sido usados a mais de 40 anos e ainda demonstram ótimos resultados no diagnóstico da resistência aos acaricidas (FAO, 2004).

5.1 Bioensaios *in vivo*

Os bioensaios *in vivo* são realizados por meio de infestações naturais ou artificiais de carrapatos em bovinos. Um dos grupos é submetido ao tratamento com a droga a ser testada e o outro permanece como controle não tratado. Registram-se os dados como número de carrapatos e massa, eclosão e postura viável, os quais são utilizados para se determinar a eficácia da droga. No entanto, a demora na conclusão e a complexidade de realização desses testes, restringe sua aplicação a provas de confirmação de resistência em centros de referência.

5.2 Bioensaios *in vitro*

As técnicas *in vitro* usadas para detecção de resistência a carrapaticidas se baseiam nas formas de vida livre do carrapato, podendo ser usadas fêmeas ingurgitadas ou larvas. Serão descritos o Teste de Imersão de Adultas (TIA) e o Teste de Pacote com Larvas (TPL), bem como o teste de Imersão de Larvas (TIL) que também desempenha um papel importante no diagnóstico de resistência acaricida, apesar de não ser recomendado pela FAO.

5.2.1 Teste de Imersão de Adultas (TIA)

Este teste tem como princípio a utilização de fêmeas adultas ingurgitadas imersas em acaricidas técnicos ou comerciais. A FAO, 2004 instrui a adoção de uma dose discriminatória (DD) para cada princípio ativo disponível no mercado a fim de diferenciar carrapatos resistentes dos suscetíveis. O TIA baseia-se em avaliar o efeito do tratamento sobre a fecundidade e fertilidade, comparando teleóginas tratadas e não tratadas.

Pela praticidade, o protocolo mais utilizado é o de Drummond *et al*, 1973. Neste protocolo, são pesados grupos de dez fêmeas ingurgitadas, imersas nas diferentes soluções

acaricidas por 30 segundos, retiradas, colocados sobre um papel absorvente para secar e, posteriormente, são incubadas a 27-28 °C e 80-95% de umidade relativa. Após duas semanas, os ovos produzidos pelas teleóginas em cada grupo de tratamento são pesados e colocados num recipiente fechado e mantida numa incubadora até ter condições de conseguir estimar visualmente a porcentagem de eclosão viável de larvas.

A análise da eclosão e sua viabilidade após seis semanas, propicia a avaliação do índice de eficácia de cada produto comercial através das seguintes fórmulas (DRUMOND *et al.*, 1973):

- Eficiência Reprodutiva (ER):

$$ER = \frac{\text{Peso da massa de ovos} \times \% \text{ eclosão} \times 20000}{\text{Peso das teleóginas}}$$

- Eficiência do Produto (EP):

$$\% \text{ de controle} = \frac{ER (\text{não tratado}) - ER (\text{tratado}) \times 100}{ER (\text{não tratado})}$$

O TIA é de fácil execução e os produtos comerciais podem ser usados, evitando dificuldades na obtenção do produto técnico. Porém, os lotes dos produtos podem sofrer variações e pequenas mudanças na formulação podem causar alterações significativas nos resultados em dose resposta (NOLAN, 1984). O fator limitante no uso do TIA, é o número insuficiente de fêmeas ingurgitadas necessárias para obtenção de resultados confiáveis (JONSSON, 2007).

Figura 5 – Sequência do teste de imersão de adultas



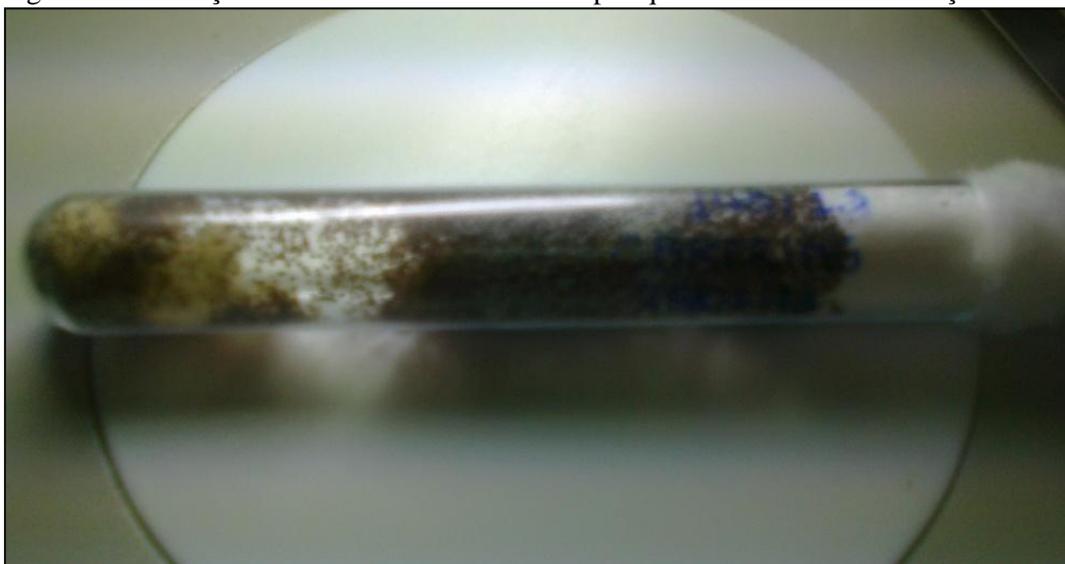
Figura 6 – Diluição das formulações acaricidas, imersão das teleóginas e secagem



Figura 7- Avaliação de mortalidade de teleóginas, após sete dias de incubação



Figura 8 – Avaliação da eclodibilidade de larvas após quatro semanas de incubação



5.2.2 Teste de Pacote com Larvas (TPL)

O TPL foi desenvolvido por Stone; Haydock (1962) e é baseado na exposição de larvas de carrapato a papéis filtro impregnados quimicamente, sendo quantificada a mortalidade subsequente após 24 horas. Os acaricidas técnicos são dissolvidos em tricloroetileno (TCE) e azeite e, em seguida, diluídos seriadamente para obtenção de concentrações decrescentes da droga. Um volume de aproximadamente 0,7 mL de cada diluição é aplicado a um papel filtro (cerca de 7,5-10 cm). Após a secagem dos papéis tratados as larvas são inseridas em cada pacote por meio de um pincel fino e depois selado,

formando um pacote. Esses serão incubados a temperatura de 27-28°C e umidade relativa do ar de 80-95%. O critério para avaliação 24 horas após a incubação é a mortalidade ou incapacidade das larvas de andar. Este teste é o recomendado pela FAO para diagnóstico de resistência, além de ser simples, eficiente, de baixo custo e requerer poucos equipamentos.

5.2.3 Teste de Imersão de Larvas (TIL)

O teste de imersão de larvas (TIL) foi desenvolvido pela primeira vez por Shaw (1966) e mais tarde modificado por Sabatini *et al.* (2001). Neste teste, as larvas de carrapato são imersas em diluições do acaricida comercial ou técnico durante dez minutos, em seguida, são retiradas do tubo, transferidas para um papel filtro. Os pacotes são incubados a 27-28°C e 85-95% de umidade relativa do ar, durante 24 horas antes de serem abertos para avaliação da mortalidade das larvas, como no LPT.

O TIL é utilizado principalmente para a detecção de resistência à ivermectina e fipronil e se mostrou mais eficiente do que o TPL para a detecção de resistência a estes dois compostos (CASTRO-JANER *et al.*, 2009; KLAFKE *et al.*, 2012).

5.3 Técnicas moleculares

Os métodos de detecção por técnicas moleculares se caracterizam por identificar o genótipo da resistência e apresentarem resultados em menos tempo (24 horas) que os bioensaios (*in vivo* ou *in vitro*) os quais detectam o fenótipo (viva/morta). Porém, a detecção de resistência por esse método é limitada em função do pouco conhecimento de genes responsáveis pela resistência, sendo necessário realizar ensaios específicos com cada gene. Assim, para o uso de ferramentas moleculares é necessário conhecer a molécula alvo do composto e as mutações que conferem resistência ao mesmo, devem ser conhecidas.

Em carrapatos, já é possível identificar a presença de mutações de canal de sódio (resistência a piretróides) e de acetilcolinesterase (resistência a organofosforados) e determinar a frequência de indivíduos resistentes em uma população (GUERRERO *et al.*, 2002). O papel da carboxilesterases e acetilcolinesterases na resistência do *R. microplus* tem sido investigado demonstrando que o fenômeno pode estar relacionado com o número de cópias do gene e mutações pontuais em genes que codificam esterases (VILLARINO *et al.*, 2003; OAKESHOTT *et al.*, 2005). Dois genes codificando acetilcolinesterase foram identificados e sequenciados (AChE1 e AChE2) em cepas resistentes (BAXTER; BARKER, 2002). Hernandez *et al.* (2002) encontraram uma alta frequência do genótipo homozigoto mutante em uma cepa resistente a permetrina (96% das larvas resistentes e 33% de fêmeas adultas resistentes) e identificaram que a transcrição contendo o ponto de mutação foi mais

abundante na cepa resistente. Segundo Jonsson *et al.* 2008, as técnicas moleculares não deveriam ser consideradas um substituto aos tradicionais bioensaios.

6 CONCLUSÕES

A disponibilidade de ferramentas para determinar a resistência acaricida em carrapatos é um pré-requisito para dar recomendações aos agricultores e reduzir o risco de desenvolvimento de resistência à longo prazo. Como mostrado pela história da introdução de novas classes de acaricidas, cada um deles foi seguido pelo subsequente desenvolvimento de resistência. Portanto, quando uma nova classe de compostos é introduzida no mercado, a questão não é se a resistência vai aparecer, mas sim, quando isso acontecerá.

O aparecimento de resistência a um acaricida novo ou já existente e sua propagação, pode ser retardado pelo manejo adequado do tratamento, através da aplicação e dose correta. Além disso, deve-se procurar reduzir a frequência dos tratamentos, apesar dos produtores normalmente realizarem esse procedimento apenas quando há detecção visual dos carrapatos no bovino. A rotação de acaricidas com diferentes modos de ação (THULLNER *et al.*, 2007) deve ser feito com muito cuidado para evitar a seleção de estirpes multiresistentes. O monitoramento através de bioensaios ou ensaios moleculares é essencial para uma detecção precoce de resistência a acaricidas e adaptar estratégias de tratamento em conformidade.

No entanto, qualquer que seja a estratégia escolhida, a consciência dos produtores é fundamental para que eles percebam a importância e os benefícios dos métodos que devem ser implementados. Estudos têm demonstrado que o uso incorreto de produtos químicos é comum (AMARAL *et al.*, 2011), acelerando o desenvolvimento de resistência. Além disso, estudos feitos recentemente no Brasil entre os produtores de leite, mostraram que esses tinham pouco conhecimento sobre o ciclo de vida do carrapato e o modo de ação de produtos, e não tinham conhecimento sobre os mecanismos que levam ao desenvolvimento de resistência (DA ROCHA *et al.*, 2011^a; DA ROCHA *et al.*, 2011^b). Portanto, para garantir uma utilização sustentável dos compostos acaricidas, atualmente disponíveis no mercado e ainda eficazes, e estender sua vida útil, a informação aos produtores sobre a epidemiologia e estratégias de controle dos carrapatos é essencial.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. A.; *et al.*; Strategic control of cattle ticks: milk producers' perceptions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p.148-154.
- ANDREOTTI, R.; **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte. n. 21, v 1. p. 10-16, 2010.
- ANGUS, B.M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**. v. 26, n. 12, p.1341-1355, 1996.
- ARTECHE, C.C.P.; LARANJA, R.J.; ARREGUI, L.A.; **O uso atual dos carrapaticidas arsenicais no Rio Grande do Sul (Brasil)**. Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, v.4, n. 6, p.13-19, 1977.
- BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, n. 7, p. 815–820, 2002
- BENAVIDES, O. E. *et al.*; Evaluación preliminar de extractos Del Neen (*Azadirachta indica*) como alternativa para el control de La garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae). **Revista Colombiana Entomologia**, v. 27, n. 1-2, p. 1- 8, 2001.
- BENAVIDES, O.E.; *Boophilus microplus* tick resistance to acaricides in Colômbia: a summary of the present situation. In: RODRIGUEZ, C.; SERGIO, D.; FRAGOSO, H. (Eds.). 3rd **INTERNATIONAL SEMINARY ON ANIMAL PARASITOLOGY**, 1995, Acapulco. Guerrero. Mexico. p. 11-13, out., 1995.
- BENNET, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidea). II. Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v. 16, n. 2, p. 250-257, 1974.
- BLOOMQUIST, J.R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 54, n. 4, p. 145-156. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal**. IN 42, 1999. Brasília: Ministério da Agricultura, 1980. 61 p.
- BRAVO, M. J.; CORONADO, A.; HENRÍQUEZ, H. Eficacia *in vitro* del amitraz sobre poblaciones de *Boophilus microplus* provenientes de explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v.26, n.1, 2008.
- CAMPOS-JÚNIOR, D.A.; PINTO, J.M.S.; OLIVEIRA, P.R.; Avaliação da eficiência *in vitro* de acaricidas comerciais de contato sobre populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* advindos de rebanhos bovinos da região de Ilhéus, Bahia, Brasil, 2007-2009. In: XVI

CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, AR86, 2010. Campo Grande, MS. **Anais...**Campo Grande: Centro de Convenções Arquiteto Rubens Gil de Camillo, 2010.

CASTRO-JANER, E. *et al.*; Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology**. v.173, p.300–306, 2010.

CASTRO-JANER, E. *et al.*; In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their tandardization. **Veterinary Parasitology**. v. 162, p. 120–128. 2009.

COLLIOT, F. *et al.*; (1992) Fipronil. A new soil and foliar broad spectrum insecticide, Proc Group Crop Protection Conference - **Pests and Diseases**, p. 29, Brighton, UK.

CORDOVÉS, C.O; **Carrapatos: controle e erradicação**. Alegrete: Galha, 1999, p.130.

CORRÊA, O.; GLOSS, R.M.; **Estudos sobre a resistência ao toxafeno de carrapatos *Boophilus microplus* no Rio Grande do Sul**. Bol. Dir. Prod. Anim., v.12, n. 4, p.12-21, 1956.

COTTON, E. C.; The North American fever tick. **University of Tennessee Agricultural Experiment Station**, v. 113, p. 33-67, 1915.

CULLY, D.F. *et al.*; Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.20, n.371, p.707-711, 1994.

CUORE, U.; *et al.*; Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. **Veterinaria** (Montevideo). v. 42, p. 35–41. 2007

DA ROCHA, C. M. *et al.*; Perceptions about the biology of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* among milk producers in Divinópolis, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p.289-294.

DA ROCHA, C. M. *et al.*; Perceptions of milk producers from Divinópolis, Minas Gerais, regarding *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 95-302.

DOUBE, M. B.; KEMP, D. H.; The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. **International Journal for Parasitology**. v. 9, p. 449-454, 1979.

DRUMOND, R. O. *et al.*; *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**, v.66, n. 1, p. 130-133, 1973

FAO, 2004. Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. pp. 25-77.

FAO, 1984. Ticks and tick borne disease control. A practical field manual. Volume I. Tick control. Rome, 299 p.

FARIAS, N. A. *et al.*; Situação de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* en la región sur de Rio Grande do Sur, Brasil. In: **4 Seminario Internacional de Parasitología**, 1999; Puerto Vallarta. Mexico: Conasag; 1999. p. 25-31.

FREIRE, J.J.; **Arseno e cloro-resistência e emprego do Tiofosfato de Dietilparanitrofenila (parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888)**. Bol. Dir. Prod. Anim., v. 9, n. 1, p.3-31, 1953.

FOIL, L. D. *et al.*; Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n.1-2, p. 163-181, Oct. 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M. C.A.; **Carrapatos: problemas e soluções**. EMBRAPA: Gado de leite. v. 1, n. 1, 2005, p. 21-39.

FURLONG, J.; Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* to acaricides in Minas Gerais state, Brazil. In: **IV SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL**, Puerto Vallarta, Jalisco, México, p. 41-46, 1999.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v.129, n.1, p.353-366, 2004.

GONZALES, J.C.; **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101 p.

GONZALES, J.C.; **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104 p.

GRISI, L. *et al.*; Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A **Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 8-10, jan. 2002.

GUERRERO, F. D.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J.; Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.38, n.1, p. 44-50, Jan. 2001.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E.; Fipronil insecticide: Novel Photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, pp. 12764–12767, Nov. 1996. Agricultural Sciences.

HE, H. *et al.*; Sequence analysis of the knockdown resistance-homologous regions of the para-type sodium channel gene from pyrethroid-resistance *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.36, n.5, p.539-543, Sept. 1999.

HERNANDEZ, R. *et al.*; Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase- encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 9, p. 1009-1016, Sept. 2002.

HORN, S.C.; **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos**. 2 ed. Brasília, Boletim de defesa Sanitária Animal. Ministério da Agricultura, 1983. 79 p.

JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D.H.; PEARSON, R.D.; Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**. v. 16, n. 1, p. 27-34, 1986.

JONSSON, N. N. *et al.*; Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. **Veterinary Parasitology**. v. 169, p. 157-164, 2010.

JONSSON, N.N. *et al.*; Nuevos diagnósticos moleculares para detectar Resistencia a piretroides sintéticos y amitraz em *Rhipicephalus microplus* en Australia. In: **6 Seminario Internacional de Parasitología Veterinária**, 2008. Boca Del Río Veracruz. INIFAP; 2008 1-CD – ROM.

JONSSON, N.N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.193-198, 2007.

KLAFKE, G.M. . *et al.*; Applicability of *in vitro* bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). v. 18, p. 212-220. 2012.

KLAFKE, G.M.; **Diagnóstico e mecanismos de resistência à ivermectina em *Rhipicephalus(Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae)** 2011. 176 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências BioMédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

KLAFKE, G. M. *et al.*; Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 142, p. 386-390, 2006.

KOCAN, K. M.; Targeting ticks for controls of select haemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 57, p. 21-151, 1995.

LARANJA, R.J.; MARTINS, J.R.; CERESÉR, V.H.; Identificação de uma estirpe de *Boophilus microplus* resistente a carrapaticidas piretróides no Estado do Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 6., 1989. Bagé. **Anais...** Bagé: CBPV,1989. p. 83.

LEE, A. J. *et al.*; Expression and characterization of a *Psoroptes ovis* glutathione s-transferase. **Veterinary Parasitology**. v. 105, n.1, p. 49 – 63, 2002

LEGG, J.; Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*). **Proceedings of the Royal Society of Queensland**, v. 41, n. 8, p. 121-132, fev 1930.

LEITE, R. C. *et al.*; *In vitro* susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to commercial acaricides. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 4, n.2, p. 283-294, 1995.

LEITE, R.C.; ***Boophilus microplus*(Canestrini, 1887): susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da baixada do**

Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. 1988. 151f. Tese (Doutorado em Parasitologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

Li, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUN, M. R.; Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**. v. 52; p. 231-53; 2007.

LI, A.Y., DAVEY, R.B., MILLER, R.J., GEORGE, J.E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.41, n.2, p.193-200, 2004.

LI, A.Y.; Status of resistance to acaricides in Mexican strains of the Southern cattle Tick, , *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Pesticide Resistance Management**. Newslett, v.13, p. 12-17, 2004.

LONDT, J.G.H.; ARTHUR, D.R.; The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **Journal of Entomological Society of South Africa**, v. 38, p. 321-40, 1975.

MARTINS, J. R.; FURLONG, J.; Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**. 2001; v. 149, n. 2, p. 64.

McKELLAR, Q.A.; BENCHAOUI, H.A. Avermectins and milbemycins. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.19, n.5, p.331-51, 1996.

MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz susceptibility against Ixodidae. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 645-651, 2002.

MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.36, n.5, p. 533-538, Sept. 1999.

MINGZHANG, C. *et al.*; Monitoring of insecticide resistance and inheritance analysis of triazophos resistance in the striped stem borer (Lepidoptera:Pyralidae). **Chinese Journal of Rice Science**. v. 18, n. 1, p.73-79, 2004.

MOORHOUSE, D. E.; TATCHELL, R. J.; The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): a study in host-parasite relation. **Parasitology**, v. 56, p. 623-632, 1966.

MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Syst Parasitology**, Queensland, v.56, n. 3, p. 169-172, nov. 2003.

NARAHASHI, T.; *et al.*; Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Human & Experimental Toxicology**. v. 26, n. 4, p. 361-366, 2007

NARI, A.; HANSEN, H. J.; Resistance of ecto-endoparasites: current and future solutions . In 67th General Session. International Committee. OIE; 1999; Paris. OIE; 1999. 12. p.

NOLAN, J.; Report of the workshop on Acaricide resistance in the cattle-tick *Boophilus microplus*. Porto Alegre: **FAO/IPVDF**, 1984. 23 p.

NOLAN, J.; Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickcides in Australia. In: Whitehead,G. B.; Gibson, J. D.; **Tick biology and control**, Tick Research Unit. Rhodes: University Grahamstown , 1981. p. 109-114.

OAKESHOTT, J. G. *et al.*; The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**. v. 4, p. 200, 2003.

OBA, M. S. P.; CAMPOS PEREIRA, M. C.; ALMEIDA, M. A. C.; Ensaio *in vitro* pelos critérios de Oba (1972) e Drummond (1973) de chlorpirifos sobre linhagem supostamente resistente de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) proveniente de Taubaté, São Paulo. **Revista Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia**. Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 13, p. 409-420, 1976.

OLIVEIRA, T.C.G.; PATARROYO SALCEDO, J.H.; MASSARD, C.L.; Suscetibilidade de amostra de *Boophilus microplus* (Canestrini: 1887), do Rio de Janeiro, Brasil a carrapaticidas organofosforados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte. v. 38, n. 2, p. 205-14, 1986.

POWELL, R.; REID, T.; Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**. v. 108, n.6, p. 279-300.1982.

RANDOLPH, S. E.; Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. **Parasitology**, Nova York, n. 129, p. S37-S65, 2004.

RANSON, H.; Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**. v. 4, n. 298, p.179-81, Oct, 2002.

RIEK, R. F.; The cattle tick and tick fever. **Australian Veterinary Journal**. v. 41, p. 211-215, 1965.

ROCHA, C. M. B. M. **Caracterização da percepção dos produtores do município de Divinópolis/MG sobre a importância do carrapato *Boophilus microplus* e fatores determinantes das formas de combate utilizadas**. 1996. 205 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. *et al.*; Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, p. 280-286, 2006.

ROMA, G. C. *et al.* Determination of LC₅₀ of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, Amsterdam, n. 123, p. 269-272, 2009.

RUFINGIER, C. *et al.*; mechanisms of insecticide resistance in the aphid *nasonovia ribisnigri* (mosley) (homoptera: aphididae) from france. **Insect biochemistry molecular biology**. v.29, n. 4, p.385-91. Apr, 1999.

SABATINI, G.A. *et al.*; Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 95, p. 53-62. 2001.

SANTOS, T.R.B. *et al.*; Uso de acaricidas em *Rhipicephalus (B.) microplus* de duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n. 1, p. 25-30, 2008.

SHAW, R.D.; Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**. v. 56, p. 389-405. 1966.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 2, p.139-156, 1995.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal [homepage]. São Paulo – SINDAN, 2007. Disponível em <http://www.sindan.org.br> [2007 Ago 5].

SNOWBALL, G. J. Ecological observations on the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.8, p. 394-413, 1957.

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; ALBUQUERQUE, G. R.; Avaliação *in vitro* da ação sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Canestrini, 1887 (Acari: ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 11, n. 3, p. 731 – 736, 2010.

STONE, B.F.; HAYDOCK, P.; A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Bulletin of Entomological Research**. v. 53, p. 563–578. 1962.

STRONG, L.; BROWN, T.A. Avermectins in insect control and biology: a review. **Bull. Ent. Res.**, v.77, n. 33, p. 357-389, 1987.

STUMPF, N.; NAUEN, R.; Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 72, p.111-121, 2002.

TATCHELL, R. J.; CARNELL, R.; KEMP, D. H.; Electrical studies on the feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Z. Parasitenk.**, v. 38, p. 32-44, 1972.

THULLNER, F. P.; *et al.*; Acaricide rotation strategy for managing resistance in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarina: Ixodidae): laboratory experiment with a field strain from Costa Rica. **Journal of Medical Entomology**. v. 44, p. 817-821. 2007

VEGA, R.; **Contribución al estudio de la biología de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) en Cuba.** La Habana : Academia de Ciências de Cuba Série Biológica. v. 64, p. 1-8, 1976.

VILLARINO, M.A.; WAGHELA, S.D.; WAGNER, G.G.; Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 40, n. 1, p. 52-57. 2003;

VILLARINO, M. A., WAGHELA, S. D., WAGNER, G. G. Histochemical localizations on esterases in integument of the female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Tick. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 780-782, Nov. 2001.

WHARTON, R.H.; Acaricide resistance and alternative methods of tick control. In: **Ticks and tick-borne diseases**. Rome: FAO, 1983. p.34-41.

WILKINSON, P. R.; Factors affecting the distribution and abundance of the cattle tick in Australia: observations and hypothesis. **Acarologia**, v. 10, p. 492-508, 1970.

WILKINSON, P. R.; Observations on the sensory physiology and behavior of larvae of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Ixodidea). **Australian Journal of Zoology**. v. 1, n.3, p. 345-356, 1953.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DUAS NOVAS FORMULAÇÕES ACARICIDAS CONTRA POPULAÇÕES DE CAMPO E CEPAS MULTIRESISTENTES DE *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*.

Renata Ferretto; Guilherme Marcondes Klafke, João Ricardo de Souza Martins

RESUMO

Atualmente, o controle de *R. microplus* ectoparasito é feito através de acaricidas. A consequência do uso indiscriminado destes produtos é o desenvolvimento de resistência a grande maioria das classes químicas usadas para combater o carrapato dos bovinos. Devido a baixa sensibilidade de algumas populações de *R. microplus* às várias classes de acaricidas, objetivou a realização deste estudo, que buscou avaliar a eficácia de duas novas formulações acaricidas disponíveis no mercado. Comparou-se a eficácia dessas, com os acaricidas mais usados no Rio Grande do Sul em 24 populações de campo e em dois isolados de laboratório através de bioensaios *in vitro* com adultos. As duas novas formulações acaricidas são uma combinação de piretróides sintéticos e sinergista (Deltametrina 2,5%, Tetrametrina 2% e Butóxido de Piperonila 10%) e uma associação entre piretróide sintético, organofosforado e sinergista (Cipermetrina 5%, DDVP-2,2 diclorovinil dimetilfosfato 50%, Triclorfon 3% e Butóxido de Piperonila 20%). Entre as populações analisadas 17% se mostraram como resistentes ao composto a base de piretróides sintéticos e 83% foram resistentes à associação entre (piretróide e organofosforado). Comparando com os demais acaricidas, os resultados também foram menores, exceto a Cipermetrina 5% que apresentou o pior resultado entre todos os princípios ativos testados.

Palavras-chave: carrapato bovino, acaricidas, controle químico, resistência.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O carrapato *R. microplus* é responsável por sérias perdas econômicas na pecuária bovina brasileira. Os danos econômicos causados por esse parasito podem ser classificados em dois grupos: em um enquadram-se os danos decorrentes da ação direta, caracterizados pela espoliação sanguínea e suas consequências como anemia, prurido e irritação determinando baixo rendimento produtivo (perda de peso, predisposição a instalação de miíases, e a desvalorização do couro). Em outro grupo, encontram-se os problemas acarretados pela ação indireta, pela transmissão de agentes patogênicos, como os hemoprotozoários causadores da Tristeza Parasitária Bovina (TBP): *Babesia bovis*, *Babesia*

bigemina e a bactéria *Anaplasma marginale*. Esses organismos causam danos econômicos severos aos produtores em consequência da alta incidência de mortalidade e morbidade que ocasionam nos animais infectados.

O controle do *R. microplus* é bastante complexo em virtude da interação de vários fatores como, a raça do bovino, a época do ano, as condições ambientais e o manejo, entre outros. Atualmente, o controle desse parasito é feito principalmente por meio de carrapaticidas (DE LA FUENTE *et al.*, 2000; FRAGA *et al.*, 2005; VARGAS *et al.*, 2003) e a utilização dessas drogas, com variados princípios ativos (organofosforados, formamidinas, piretróides sintéticos e lactonas macrocíclicas), é considerada um dos fatores preponderantes no desenvolvimento da pecuária em várias regiões (CASTRO; NEWSON, 1993). A falta de embasamento técnico na adoção de medidas de controle do *R. microplus*, associada ao baixo nível de escolaridade dos produtores rurais de algumas regiões, reduzem a eficiência e a vida útil dos produtos mais amplamente utilizados no controle químico desse parasito (ROCHA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009).

Os custos para o desenvolvimento de novos ingredientes ativos podem chegar a 200 milhões de dólares e levar cerca de doze anos para poder ser comercializado (HENNESSY, 1997). Isso demonstra que é necessário usar os acaricidas com prudência e racionalidade, em função do alto custo e a demora para produção de novos produtos. Além disso, a resistência a maioria das classes de acaricidas é frequente e um sério problema enfrentado pelos produtores rurais. Com o intuito de oferecer uma nova alternativa no controle do carrapato bovino, projetou-se o presente estudo. Tendo como objetivo geral avaliar a eficácia *in vitro* de duas novas formulações acaricidas, uma combinação entre piretróides sintéticos (PS) com um sinergista (Deltametrina 2,5%, Tetrametrina 2% e Butóxido de Piperonila 10%) e uma associação entre PS, organofosforado (OF) e sinergista (Cipermetrina 5%, DDVP-2,2 diclorovinil dimetilfosfato 50%, Triclorfon 3% e Butóxido de Piperonila 20%) em *Rhipicephalus microplus*. Foram comparadas as eficácias *in vitro* das novas formulações com os acaricidas mais utilizados no RS para o controle do carrapato bovino. Ainda, avaliou-se a eficácia das mesmas em cepas de *R. microplus* resistentes a OF e PS mantidas em laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 . Local do estudo

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), na cidade de Eldorado do Sul, RS.

2. Carrapatos

2.1. Origem

Populações de campo: Amostras enviadas ao Laboratório de Parasitologia – IPVDF/FEPAGRO, Eldorado do Sul, RS, para realização de testes de sensibilidade a acaricidas. Foram testados um total 23 populações de campo de *R. microplus*, advindas de sete municípios do Rio Grande do Sul conforme Tabela 1.

Cepa Jaguar: Isolado resistente à organofosforados, piretróides, amitraz, fipronil e ivermectina, originária do município de Eldorado do Sul-RS. É mantida em animais estabulados na Unidade de Isolamento do IPVDF-FEPAGRO, Eldorado do Sul.

Cepa Juarez: Isolado resistente a piretróides, amitraz, fipronil e ivermectina, originária do município de Jacaré-SP. Mantida em animais estabulados na Unidade de Isolamento do IPVDF-FEPAGRO, Eldorado do Sul.

3. Bioensaios

Para determinação da eficácia *in vitro*, foi utilizado o teste de imersão de adultos (TIA) proposto por Drummond *et al.*, (1973) com modificações. As fêmeas ingurgitadas (teleóginas) passaram por uma lavagem (água), secagem (papel toalha) e uma prévia seleção com relação à motilidade, para posterior realização do TIA. As teleóginas foram separadas em grupos de dez com peso padronizado, variando mais ou menos 0,01 g entre os grupos. Os carrapaticidas comerciais foram diluídos conforme indicação do fabricante, sendo que os carrapatos permaneceram submersos por 5 minutos, em 20 ml da solução (água+acaricida) e posteriormente, foram removidos e colocados em papel absorvente para secagem, colocados em Placas de Petri previamente identificadas e levados à estufa (B.O.D) a 27°C e 80% de URA. O grupo controle foi tratado apenas com água destilada. Após sete dias, foi avaliada visualmente a oviposição e em mais sete dias foi feita a pesagem da massa de ovos aparentemente férteis (coloração marrom claro, brilhantes). Esses foram acondicionados em tubos de vidro e retornaram a estufa para análise de eclosão após seis semanas.

A formulação a base de piretróides, acrescida de um sinergista (Certrine Plus® - Deltametrina 2,5%, Tetrametrina 2% e Butóxido de Piperonila 10%) foi diluída na proporção de 1:1000 e o produto que associa piretróide, organofosforados e um sinergista, (Ectogard CE Plus®- Cipermetrina 5%, DDVP-2,2 diclorovinil dimetilfosfato 50%, Triclorfon 3% e Butóxido de Piperonila 20%) foi diluído em 1:400. Os demais produtos comerciais utilizados foram diluídos conforme recomendação do fabricante: cipermetrina 15% (Cyberpour® 15 –

Ceva-Vetbrands) 1:1000; associação de cipermetrina 15% + clorpirifós 25% + citronela 1% (Colosso® - Ourofino) 1:1000; associação de cipermetrina 15%, clorpirifós 25% e butóxido de piperonila 15% (Cyperclor Plus® - Eurofarma) 1:1000.

A análise da eclosão e sua viabilidade após as seis semanas propiciou o avaliação do índice de eficácia de cada produto comercial através das seguintes equações (DRUMMOND et al., 1978).

Eficiência Reprodutiva (ER):

$$ER = \frac{\text{Peso da massa de ovos} \times \% \text{ eclosão} \times 20000}{\text{Peso das teleóginas}}$$

Inibição de Postura Viável (IPV):

$$IPV = \frac{ER \text{ (controle)} - ER \text{ (tratado)} \times 100}{ER \text{ (controle)}}$$

Populações com IPV abaixo de 95% foram consideradas resistentes. A eficácia mínima para um carrapaticida ser registrado no Brasil, determinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1997) é de 95%.

RESULTADOS

Na tabela 2 encontram-se os dados de inibição de postura viável (IPV), determinados pelo tratamento de teleóginas com cinco diferentes acaricidas em populações de campo e isolados de laboratório.

Com relação às populações campo, o produto à base de cipermetrina 15% apresentou índices de IPV entre 3,00 e 100%, com valor médio de 42,49%. Somente uma população apresentou índice de IPV de 100% (pop. 0284/13), sendo esta considerada suscetível à cipermetrina. Todas as demais apresentaram resposta inferior à 87,22%, sendo consideradas resistentes. A resistência à cipermetrina foi confirmada nos dois isolados resistentes de laboratório, cepas Juarez e Jaguar, com índices de IPV de 68,2% e 29,1%, respectivamente. As associações de cipermetrina com clorpirifós, com ou sem adição de PBO, apresentaram as maiores médias dos índices de IPV (99,83% e 99,57%, respectivamente). Nenhuma população de campo se mostrou resistente à formulação de cipermetrina + clorpirifós + citronela (IPV

entre 96% e 100%). Somente uma população se mostrou resistente à combinação entre PS e OF com sinergista (pop. 0379/13). As cepas de laboratório se mostraram sensíveis a estas associações.

A formulação combinada entre PS e sinergista apresentou índices de IPV variando entre 0 e 100%). Em média o índice de IPV desta formulação em populações de campo foi de 54,22%. Entre as 24 populações de campo analisadas, 18 se mostraram resistentes a esta formulação. Das seis consideradas sensíveis, três delas se mostraram resistentes à cipermetrina. Ambos isolados de laboratório se mostraram resistentes a esta associação (índices de IPV de 66,8% e 39,35%)

A associação entre PS, dois OF e PBO apresentou eficácia *in vitro* média de 97,94%, com valores de IPV entre 80% e 100%. No entanto, três populações se comportaram como resistentes (pops 0221/13; 0223/13 e 0379/13). Todas haviam se comportado como resistentes à cipermetrina. As cepas Juarez e Jaguar se mostraram resistentes à associação entre cipermetrina, DDVP, triclorfon e PBO (IPV de 84,9% e 85,79%).

DISCUSSÃO

Testes de laboratório são ferramentas úteis para testar a sensibilidade de *R. microplus* frente aos acaricidas comerciais. São testes simples, de baixo custo, que proporcionam orientação quanto à droga mais eficaz para a população testada e descreve um perfil regional dos níveis de sensibilidade e resistência dos carrapatos às bases químicas disponíveis no mercado.

Relatos de resistência a PS no Brasil, foram feitos inicialmente por Laranja *et al.*, 1989. No presente trabalho, a cipermetrina 15% apresentou o menor índice de IPV médio entre os cinco acaricidas testados (42,49%). A associação de dois PS (deltametrina 2,5%, tetrametrina 2% e BPO 10%), demonstrou resultado pouco superior aos citados anteriormente, com eficácia média de 54,22%. Esses números expressam a baixa eficácia *in vitro* desta classe química, conforme os relatos de Alves-Branco *et al.*, (1999) e Farias *et al.*, (1999) no Estado do Rio Grande do Sul. O melhor resultado apresentado pela associação entre os PS com PBO em relação a cipermetrina isolada se deve possivelmente ao sinergismo do PBO aos piretróides (Miller *et al.*, 1999). A resistência a PS é evidente tanto nas populações de campo, quanto nos isolados de laboratório.

Os acaricidas a base de associações de piretróides sintéticos e organofosforados, apresentaram os melhores resultados. A eficácia média dos três compostos (cipermetrina 15%

+ clorpirifós 25% + citronela 1% - 99,83%; cipermetrina 15%, clorpirifós 25% e PBO 15% - 99,57%; Cipermetrina 5%, DDVP-2,2 diclorovinil dimetilfosfato 50%, Triclorfon 3% e BP 20% - 97,94%) evidenciou a semelhança da eficácia das associações sobre as diferentes populações de carrapatos. O acaricida composto de cipermetrina 5%, clorpirifós 25% e citronela 1% apresentou 99,83% de eficácia média. Segundo Souza *et al.*, 1997, as associações de PS e OF testadas em carrapatos de bovinos do Rio Grande do Sul, alcançaram índice de eficácia superior a 95%, supostamente pela atuação sinérgica das drogas.

A discrepância entre os resultados obtidos dos PS e as associações de PS+OF é clara. Apenas 4% das populações testadas com cipermetrina se mostraram suscetíveis (IPV > 95%). Resultado bem diferente quando comparado à associação de cipermetrina 15% + clorpirifós 25% + citronela 1% onde o índice de IPV maior que 95%, ocorreu em todas populações de carrapatos (campo e isolados de laboratório) testadas. Situação semelhante à associação (cipermetrina 15%, clorpirifós 25% e butóxido de piperonila 15%) em que apenas uma população não apresentou eficiência acima de 95%.

As duas novas formulações acaricidas: uma combinação de piretróides e sinergista (Deltametrina 2,5%, Tetrametrina 2% e Butóxido de Piperonila 10%) e uma associação de piretóide, organofosforado e sinergista (Cipermetrina 5%, DDVP-2,2 diclorovinil dimetilfosfato 50%, Triclorfon 3% e Butóxido de Piperonila 20%) atingiram respectivamente eficácia *in vitro* média de 17% e 83%. Evidenciando assim, a baixa sensibilidade do *R. microplus* aos piretróides sintéticos e a suscetibilidade deste as associações, porém em alguns casos ambas não atingiram os 95% de eficácia.

Das cepas testadas, apenas uma teve 100% de inibição de postura viável perante os cinco acaricidas. Além disso, diversas cepas foram resistentes a mais de um produto de diferentes classes. Mas, se analisarmos separadamente cada cepa de carrapatos concluímos que todas elas foram suscetíveis a pelo menos um dos acaricidas usados no trabalho.

A eficácia de produtos contendo associações foi, em geral, maior que a de produtos contendo um único princípio ativo, aumentando a probabilidade de um controle satisfatório do carrapato na maioria das populações de campo e de laboratório testadas neste estudo. O índice de inibição de postura viável das duas novas formulações acaricidas foi inferior a 95% na maioria das populações testadas. Assim, em alguns casos esses compostos deixam de ser uma opção aos produtores na batalha pelo controle do *R. microplus*.

Tabela 1 – Classificação das 23 populações de campo por região e município de origem, oriundas do estado do Rio Grande do Sul, no período de Janeiro a Junho de 2013.

REGIÃO	CEPA	MUNICÍPIO
FRONTEIRA OESTE	0142/13	Alegrete
	211/13	Alegrete
	212/13	Alegrete
	0369/13	Alegrete
	0229/13	Rosário do Sul
	0284/13	Santana do Livramento
	0287/13	Santana do Livramento
	0286/13	São Gabriel
	0311/13	São Gabriel
	0340/13	São Gabriel
CAMPANHA SUDOESTE	0403/13	São Gabriel
	0309/13	Uruguaiana
	0379/13	Bagé
	0384/13	Dom Pedrito
CENTRO OESTE	0394/13	Dom Pedrito
	0402/13	Dom Pedrito
	0214/13	Santa Maria
METROPOLITANA	0215/13	Santiago
	LP1498	Eldorado do Sul
NORDESTE	0223/13	Vacaria
CENTRO LESTE	0358/13	Rio Pardo
SUDESTE	0313/13	Caçapava do Sul
NOROESTE	0221/13	Glorinha

Tabela 2 - Percentuais de eficiência dos produtos acaricidas testados populações de campo e mantidas isoladas em laboratório, oriundas de nove regiões do Rio Grande do Sul.

População	Cipermetrina	Cipermetrina Clorpirifós Citronela	Cipermetrina Clorpirifós BPO	Deltametrina, Tetrametrina e BPO	Cipermetrina, DDVP, Triclorfon e BPO
0142/13	81,80	100,00	100,00	90,90	100,00
212/13	34,17	100,00	100,00	60,49	100,00
LP1498	26,47	100,00	100,00	66,34	100,00
214/13	39,20	100,00	100,00	100,00	100,00
215/13	87,23	100,00	100,00	64,77	99,52
0221/13	30,20	100,00	100,00	58,20	87,10
0223/13	10,00	100,00	100,00	10,00	90,00
0229/13	19,00	100,00	100,00	95,80	100,00
0284/13	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
0287/13	60,00	100,00	100,00	54,00	100,00
0286/13	7,00	100,00	100,00	81,00	100,00
0313/13	26,00	100,00	100,00	19,00	96,00
0311/13	24,00	100,00	100,00	0,00	100,00
0309/13	38,00	100,00	100,00	33,00	100,00
0340/13	43,00	100,00	100,00	34,00	100,00
0358/13	84,00	100,00	100,00	96,00	100,00
0369/13	31,00	100,00	100,00	30,00	100,00
0379/13	37,00	96,00	90,00	5,00	80,00
0384/13	24,80	100,00	100,00	24,30	100,00
0394/13	22,70	100,00	100,00	69,50	100,00
0402/13	68,50	100,00	100,00	78,60	100,00
0403/13	3,00	100,00	100,00	27,50	100,00
JUAREZ	68,20	100,00	100,00	66,80	84,90
JAGUAR	29,10	97,07	100	39,35	85,79

REFERÊNCIAS

- ALVES-BRANCO, F.P.J.; PINHEIRO, A.C.; SAPPER, M.F.M. et al. Eficácia comparativa de quatro endectocidas sobre infestações naturais por *Boophilus microplus* em bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 111, n. 19, p. 41-44, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Portaria No 48/97. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Maio, 1997.
- CASTRO, J. J. DE.; NEWSON, R. M.; Host resistance in cattle tick control. **Parasitology**. v. 9, p. 13-17, 1993.
- DE LA FEUENTE, *et al.*; Molecular analysis of **Boophilus microplus** (*Acari: Ixodidae*) tick strains. **Veterinary Parasitology**. v. 92, p. 209-222, 2000.
- DRUMOND, R. O. *et al.*; *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- FARIAS, N. A. *et al.*; Situación de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* en la región sur de Rio Grande do Sur, Brasil. In: **4 Seminario Internacional de Parasitología**, 1999; Puerto Vallarta. Mexico: Conasag; 1999. p. 25-31.
- FRAGA, *et al.*; 2005; Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 32, n. 6, p. 1578-1586, 2005. (Supl.1).
- HENNESSY, D. R. Physiology, pharmacology and parasitology. **International Journal for Parasitology**. v 27, p 145-52, 1997.
- LARANJA, R.J.; MARTINS, J.R.; CERESÉR, V.H.; Identificação de uma estirpe de *Boophilus microplus* resistente a carrapaticidas piretróides no Estado do Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 6., 1989. Bagé. **Anais...** Bagé: CBPV, 1989. p. 83.
- MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (*Acari: Ixodidae*). **Journal of Medical Entomology**. v. 36, p. 533-538, 1999.
- ROCHA, C. M. *et al.*; Percepção dos produtores do município de Passos, MG, sobre o carrapato **Boophilus microplus** (*Acari: Ixodidae*). **Ciência Rural**. v. 36, n. 4, p. 1235-1242, 2006.
- SANTOS, T.R.B. *et al.*; Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29. n. 1, p. 65-70, 2009.
- SOUZA, A. P. et al.. Características do controle químico do *Boophilus microplus* na Região Sul do Rio Grande do Sul e a relação com a resistência a carrapaticidas. In: SEMINÁRIO

BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 10, 1997, Itapema - SC. **Anais ... Itapema: CBPV, 1997. p. 129.**

VARGAS, *et al.*; Avaliação *in vitro* de uma cepa de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à Amitraz. **Ciência Rural**. v. 33, n. 4, p. 737-742, 2003.