

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Testes *in vitro* de resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da região do Brejo Paraibano

Monique Silva Avelino

AREIA, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Testes *in vitro* de resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da região do Brejo Paraibano

Monique Silva Avelino

Trabalho de Conclusão de Curso realizado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do prof. Dr^a. Valeska Shelda Pessoa de Melo.

AREIA, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Monique Silva Avelino

Testes *in vitro* de resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da região do Brejo Paraibano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em: ____/____/____

Nota: _____

Banca Examinadora

Suedney De Lima Silva Professor Doutor UFPB

Valeska Shelda Pessoa de Melo. Professora Doutora UFPB

Karla Campos Malta. Médica Veterinária UFPB

Prof. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Coordenação de TCC

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem a força suprema da vida hoje não estaria aqui.

À minha querida Orientadora Valeska Shelda Pessoa de Melo, que me fez gostar tanto da área e me ofereceu oportunidades únicas durante meu curso, além de toda dedicação e apoio profissional e emocional,

Ao amigo e excelente profissional Vinicius Longo Ribeiro Vilela, que ajudou a esse sonho sair do papel e que tanto dedicou-se a uma causa mostrando que todos nós somos eternos aprendizes,

Aos meus professores, que fizeram parte da minha vida acadêmica, que ajudaram muito na minha caminhada e me deram muitos exemplos, contribuindo diretamente na minha formação profissional,

Aos queridíssimos amigos de curso: Ângela Imperiano, José Ferreira, Vinicius Mendes e Roberta Ferreira, que por vezes foram meu apoio quando cansada pensava em desistir, que passaram por tantas “aventuras” juntos e fizeram meus dias melhores,

Ao Diego Nathan de Fontes Alves, meu companheiro de vida, que esteve sempre comigo, ajudando-me nas pesquisas e nos problemas maiores, sempre paciente e entendendo por vezes minhas ausências,

Ao querido Eurico Ribeiro, que por sua generosidade, tornou minha pesquisa viável,

A todos os proprietários das fazendas que permitiram a coleta e participaram das pesquisas de forma educada e alegre.

A Universidade Federal de Campina Grande, por ceder as suas dependências para as análises e desenvolvimento da nossa pesquisa,

A minha família, minha Irmã Ingrid Silva Avelino em especial, por sempre me apoiar nas minhas decisões,

Ao meu querido amigo Noberto Pereira Abdala *in memoriam*, que com certeza estaria orgulhoso dessa conquista e que tanto me ajudou no início do curso e que tanto planejou me ver alcançando meu sonho,

Ao meu sobrinho Davi Avelino que tanto amo e do qual me ausento tanto, tão pequeno, porém um dia vai entender o real motivo.

As pessoas, que de alguma forma contribuíram para essa pesquisa tornar-se real,

Aos animais, que durante meu curso sempre mesmo sem compreender ajudaram na minha formação e merecem meu respeito, meu muito obrigada.

Aos meus examinadores da banca, pelo apoio e por compor este momento importante para todos.

“Aos inesquecíveis animais utilizados nos experimentos, que olham questionando o que ocorre que sentem dor, febre e não compreendem, que não entendem a dor, a perda da liberdade, que lambem as mãos do algoz confundindo-o com um amigo.”

(Nádia R.P. Almosny)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Arlindo José Avelino e Valdecy Maria da Silva, por toda dedicação e ensinamentos que me tornaram a pessoa que sou e me incentivarem sempre a estudar, afinal a educação é a maior herança que eles poderiam deixar.

RESUMO

AVELINO, Monique Silva, Universidade Federal da Paraíba, novembro de 2015. **Testes *in vitro* de resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da região do Brejo Paraibano** Orientador: Dr.^aValeska Shelda Pessoa de Melo.

Entre os ectoparasitos importantes para pecuária nacional, o *Rhipicephalus (boophilus) microplus* assume elevada importância, em função dos prejuízos diretos, com consequente perda na produção de carne e/ou leite e indiretos pela transmissão de doenças além dos custos com medicamentos para seu controle. O presente estudo avaliou a sensibilidade de cepas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos seguintes princípios ativos: amitraz, clorpirifós, fipronil, cipermetrina, ivermectina através do teste do pacote de larvas de amostras colhidas nas cidades de Areia-PB e Bananeiras PB totalizando quatro propriedades no período de novembro a dezembro de 2014. Foram encontrados níveis de Fator de resistência muito elevado nas propriedades estudadas a: Cipermetrina (100%), Amitraz (75%), Ivermectina, (50%) e ao Clorpirifós (50%). O único fármaco que obteve valores irrelevantes em 75% das propriedades foi o fipronil, sendo este pouco utilizado á campo devido ao alto custo, podendo justificar tal dado. O controle químico, baseado nos ectoparasiticidas ainda persiste como a principal arma para seu combate efetivo, tornando-se essencial o diagnóstico mais precoce da resistência, e consequentemente, a escolha de princípios ativos mais eficazes no seu controle, de forma simples e com custos reduzidos.

PALAVRAS CHAVES: Carrapato-de-boi, Carrapaticida bovino, *Rhipicephalus microplus*, Brejo paraibano

ABSTRACT

AVELINO, Monique Silva, Federal University of Paraiba, November 2015. **In vitro tests of insecticide resistance in larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from the Brejo Paraibano region** Advisor: Dr.^aValeska Shelda Pessoa de Melo.

Among the important ectoparasites for domestic livestock, the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* assumes great importance, because of the direct losses, with consequent loss in production of meat and / or milk and indirect for disease transmission beyond the drug costs for its control. This study evaluated the sensitivity of strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to the following active ingredients: amitraz, chlorpyrifos, fipronil, cypermethrin, ivermectin through the test packet of samples of larvae in the cities of Areia-PB and Bananeiras- PB total of four properties from November to December 2014 very high resistance factor levels were found in the properties studied: Cypermethrin (100%), Amitraz (75%), Ivermectin, (50%) and Chlorpyrifos (50%). The only drug that got irrelevant values in 75% of the properties was Fipronil, which is little used will field due to the high cost, can justify such data. Chemical control, based on SAE remain as the main weapon for its effective combat, making it essential to earlier diagnosis of the resistance, and hence the choice of the most effective active ingredients in your control, simply and cost .

KEYWORDS: cattle tick, ticks beef, *Rhipicephalus microplus*, Brejo paraibano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Locais de realização do experimento	13
2.2 Caracterização do controle de carrapatos nas propriedades	13
2.3 Procedimento Experimental	14
2.3.1 - Obtenção dos Carrapatos	14
2.3.2 - Bioensaio Larval	14
2.3.3 - Preparação dos Carrapatos	15
2.3.4 – Teste do Pacote de Larvas (TPL)	16
2.3.5 – Teste de Imersão de Larvas (TIL)	17
2.4 Análises Estatísticas.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
5. CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXO.....	29

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira conta com mais de 170 milhões de cabeças de gado (ANUALPEC, 2009), mas a produtividade do setor sofre com as perdas econômicas causadas pelo carrapato-do-boi. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pode causar dano direto e indireto à produção bovina. Entre os danos diretos provocados pela espoliação sanguínea e suas consequências podemos citar: anemia, prurido, irritação, baixo rendimento produtivo, perda de peso e desvalorização do couro. Já as perdas indiretas estão relacionadas a transmissão de doenças pelo carrapato como a Tristeza Parasitária bovina, e as babesioses, que levam a alta incidência de mortalidade e morbidade no rebanho afetado (KAUFMAN, 1989). As estimativas de prejuízos anuais são de mais de US\$ 2 bilhões (GRISI et al, 2002).

O mercado de parasiticidas em geral movimenta cerca de US\$ 960 milhões por ano, representando 34% do mercado de produtos veterinários (SINDAN, 2010). Atualmente, o uso de acaricidas comerciais ainda constituem a principal forma de controle parasitário (DE LA FUENTE et al, 2000; FRAGA et al, 2005; VARGAS et al, 2003). No entanto, o uso indiscriminado e sem orientação desses agentes favorece o surgimento da resistência do parasita aos acaricidas. Coles et al (1992) relataram que, a resistência aparece quando uma população de parasitos é capaz de tolerar doses de um produto que é eficaz em outras populações da mesma espécie, sendo este um caráter hereditário. A realidade do controle químico para carrapatos caracteriza-se por um aumento progressivo do número de cepas resistentes aos principais acaricidas utilizados e o consequente aumento na frequência das aplicações em função do seu insucesso (FURLONG et al., 2007).

A resistência aos acaricidas é um sério problema em todo mundo, avançando progressivamente sobre os mais modernos grupos químicos disponíveis e sendo extensivamente documentada para o *R. (B.) microplus* (FAO, 2003; DAVEY et al., 2006). De acordo com Reck et al. (2014), há atualmente cinco classes de acaricidas químicos comercializados para o controle de carrapatos no Brasil: (1) Organofosforados (Clorpirifós), (2) Formamidinas (Amitraz), (3) Piretróides sintéticos (Cipermetrina), (4) Lactonas macrocíclicas (Ivermectina) e (5) Fenilpirazóis (Fipronil). Para os produtos usados no controle de carrapatos serem considerados eficazes e/ou para permitir o registro de novos produtos, estes devem apresentar pelo menos 95% de eficiência, segundo critérios do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA, 1987).

A presença e o grau de resistência podem ser confirmados em laboratório por meio de testes “in vitro” para verificar o efeito dos acaricidas sobre os carrapatos. A Organização das

Nações Unidas para agricultura e alimentação (FAO) recomenda o teste de pacote de larvas (TPL), porém admite que o “teste de imersão dos adultos” (TIA) para estudos de campo sobre resistência acaricida é o mais utilizado (FAO, 2003).

Conforme Martins (2002), o monitoramento das populações de carrapatos, com relação aos carrapaticidas em uso por meio de testes em in vitro, ainda é o procedimento essencial na detecção precoce de problemas de resistência. De acordo com Campos Jr e Oliveira (2005), o conhecimento da resistência resultaria em uma diminuição do número de aplicações dos carrapaticidas, diminuindo seus efeitos tóxicos, reduzindo os custos de produção, o grau de espoliação dos animais e a população de carrapato bovino nas pastagens (fase não parasitária), além do impacto ambiental pelo uso de produtos químicos.

No Brasil, vários trabalhos sobre susceptibilidade acaricida já têm sido realizados em distintas regiões, o que vem demonstrando o desenvolvimento crescente da resistência dos carrapatos aos diferentes produtos carrapaticidas (FAO, 2003; SOUZA et al., 2008).

Dentre as regiões do país, existem áreas no Nordeste que apresentam dificuldades no controle do carrapato, em função da diversidade do uso da terra para a agricultura e pecuária, que constituem condições favoráveis à sobrevivência e ao desenvolvimento dos seus estádios não parasitários. Além disso, o tratamento dos animais é realizado pelos próprios produtores, sem nenhuma orientação técnica e, geralmente, não tem como base um tratamento estratégico que leva em consideração as condições epidemiológicas regionais. É essencial que um controle integrado seja adequado a cada situação e adaptado de acordo com as mais variadas condições, principalmente climáticas e econômicas (BRIZUELA et al., 1996).

É essencial que se detecte a resistência assim que ela emerge, buscando a implementação de estratégias para mitigá-la, como combinações de drogas, visando garantir que as poucas existentes persistam em funcionamento (VERCRUYSSSE et al., 2011). A importância na detecção da resistência destes carrapatos, frente aos acaricidas comerciais mais utilizados pelos produtores, reside principalmente na escolha de um produto comprovadamente eficaz para o controle deste ectoparasita, o que pode levar a uma diminuição do número de aplicações dos carrapaticidas, diminuindo seus efeitos tóxicos, reduzindo os custos de produção, o grau de espoliação dos animais e a população de *R. microplus* nas pastagens, além do impacto ambiental pelo uso de produtos químicos.

Neste sentido, a obtenção de um perfil regional do problema de resistência deste carrapato frente aos carrapaticidas mais empregados podem servir de subsídio ao planejamento de medidas conjuntas de controle desse parasita.

Com base na hipótese de que existem populações de *R. microplus*, na Microrregião do Brejo Paraibano - Paraíba, que podem apresentar níveis variáveis de resistência contra os principais grupos carrapaticidas do mercado, o presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade de cepas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a diferentes acaricidas, através do teste do pacote de larvas de amostras colhidas nas cidades de Areia-PB e Bananeiras PB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de realização do experimento

O experimento a campo foi realizado em quatro propriedades produtoras de bovinos no Brejo Paraibano, que apresentem animais com infestação por *R. microplus* de forma natural (FIGURA 1). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDPAD), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos – Paraíba. O experimento foi executado entre os meses de novembro de 2014 e janeiro de 2015.



Figura 1. Animais apresentando infestação natural de carrapatos em propriedade visitada na cidade de Areia PB. Fonte: Arquivo pessoal.

2.2 Caracterização do controle de carrapatos nas propriedades

Para a caracterização do manejo para o controle de *R. microplus* na área a ser estudada e estabelecer possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da resistência aos acaricidas foi aplicado em cada propriedade um questionário aos produtores ou tratadores (ANEXO1).

Os seguintes itens foram considerados para a caracterização das propriedades: população bovina, raça dos animais, sistema produtivo (intensivo, extensivo ou semi-intensivo), principal aptidão (gado leiteiro ou de corte), área de pastejo para os animais. Para o perfil do manejo para o controle dos foram considerados: acaricidas utilizados nos últimos dois anos, acaricida utilizado no último tratamento antes da coleta dos carrapatos, intervalo entre tratamentos, realização dos tratamentos de acordo com as recomendações dos fabricantes, método de aplicação (pulverização, formulações injetáveis ou *Pour-on*) e

influência para a escolha de um acaricida específico: por indicação do Médico Veterinário, vendedores de farmácias veterinárias, indicação de vizinhos/ cooperativas ou preço do produto .

2.3 Procedimento Experimental

2.3.1 - Obtenção dos Carrapatos

Foram coletadas aproximadamente 20 teleóginas ingurgitadas (com tamanho igual ou maior do que 4 mm) em cada propriedade. As teleóginas foram retiradas de bovinos que não receberam banho carrapaticida por no mínimo 45 dias, para não haver interferência nos resultados (Raynal et al., 2013).

Os carrapatos foram acondicionados em frasco de vidro com perfuração na tampa para oxigenação, sendo remetidos no mesmo dia ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDPAD) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus de Patos-PB, para realização dos testes.

Cepas Porto Alegre (POA)

Estes carrapatos foram coletados em uma fazenda ao longo da fronteira entre Brasil e Uruguai em 1992. São mantidos no município de porto Alegre, RS, nas dependências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As cepas POA têm sido amplamente utilizadas como referência de cepas de carrapatos susceptíveis desde o seu isolamento há mais de 20 anos e tem sido mantida sem exposições a acaricidas.

Todas as cepas/ colônias de carrapatos são mantidas na Unidade de Isolamento do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, sem exposição a outras populações de carrapatos (Reck Jr. et al., 2009) e foram fornecidas para a realização do presente trabalho.

2.3.2 - Bioensaio Larval

Para adeterminação da resistência a Cipermetrina, Clorpirifós e Fipronil, foi realizado o Teste do Pacote de Larvas (TPL) de acordo com os procedimentos estabelecidos pela FAO (2004). Para a toxicidade da Ivermectina foi realizado o Teste de Imersão de Larvas (TIL) de

acordo com Klafke et al. (2012). Para o Amitraz foi realizado um TPL modificado, de acordo com Miller et al. (2002). Todos os testes larvais foram realizados simultaneamente com as cepas susceptíveis POA.

Os testes foram realizados com os fármacos em graus técnicos Cipermetrina, Clorpirifós, Ivermectina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e Fipronil (BASF Chemicals, Paulínia, SP, Brasil). Os testes com Amitraz foram realizados utilizando a formulação comercial a 12,5% (Triatox[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

2.3.3 - Preparação dos Carrapatos

Fêmeas ingurgitadas provenientes das propriedades e cepas POA foram processadas no LDPAD, de acordo com os procedimentos da FAO (2004). Brevemente, após serem lavadas com água e secadas em papel toalha, os carrapatos foram incubados em placas de Petri de plástico (90 mm de diâmetro x 22 mm de altura), mantidas em câmaras ambientais tipo BOD, no escuro, a temperaturas entre 27 e 28°C e umidade relativa do ar entre 85 e 90% durante duas semanas para realizarem ovoposição (FIGURA 2). Depois, as massas de ovos foram minuciosamente misturadas e passadas para frascos de vidro (5 mL) fechados com tampa de algodão, para permitir a passagem de ar e umidade. Os ovos nos frascos foram incubados sob as mesmas condições das fêmeas ingurgitadas para possibilitar o nascimento das larvas. As larvas utilizadas nos testes tinham entre 14 e 21 dias de idade.

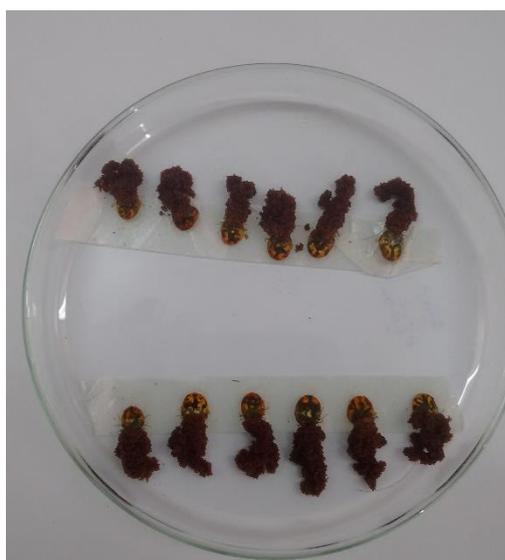


Figura 2. Ovoposição das fêmeas após duas semanas. Observar a grande quantidade de ovos e boa viabilidade dos mesmos. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.3.4 – Teste do Pacote de Larvas (TPL)

Soluções estoque de Cipermetrina, Clorpirifós, Fipronil e Amitraz foram preparadas em uma mistura contendo duas partes do tricloroetileno (Synth, Diadema, Brasil) e uma parte de azeite de oliva comercial (TCE-AO). Estas soluções estoque foram utilizadas para preparar as seguintes soluções de impregnação em TCE-AO (em % de Ingrediente Ativo - IA): (i) Cipermetrina 0,01; 0,015; 0,02; 0,03; 0,04; 0,08; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 3 e 4; (ii) Clorpirifós 0,003; 0,006; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,06; 0,3; 0,6; 0,8; 1, 2, 3 e 4; (iii) Fipronil 0,00008; 0,00016; 0,00032; 0,0006; 0,0012; 0,0025; 0,005 e 0,01; (iv) Amitraz 0,000061; 0,000122; 0,000244; 0,000488; 0,000976; 0,00195; 0,0039; 0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125, 0,25 e 0,5.

Para cada concentração, seis papéis filtro (85mm x 75mm – Whatman No. 1, Whatman Inc., Maldstone, England), ou seis tecidos de nylon no caso do Amitraz (85mm x 75mm – tipo 2320, Cerex Advanced Fabrics, Pensacola, Fl), foram preparados (três para cada cepa). Papéis filtro foram impregnados com 0,67 ml para cada solução utilizando micropipeta (FIGURA 3).

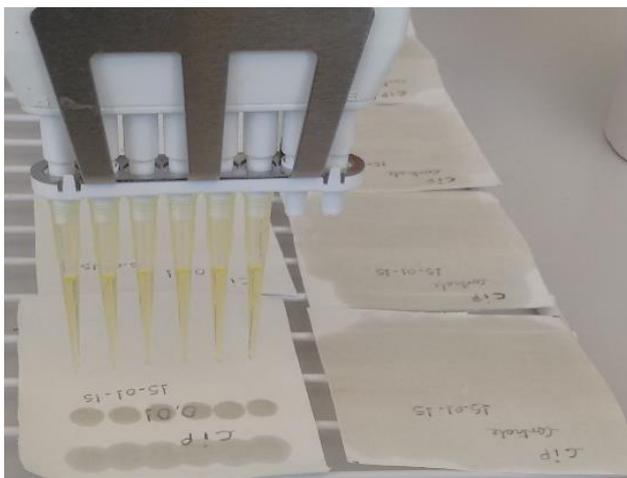


Figura 3: Papéis filtros impregnados com solução. No detalhe a micropipeta. Fonte: Arquivo Pessoal.

O material foi colocado para secar por duas horas em exaustor para permitir a evaporação do tricloroetileno. Após a secagem, os papéis filtro foram dobrados ao meio e selados em suas laterais com cliques metálicos para formar os pacotes. Aproximadamente 100 larvas foram transferidas para cada pacote utilizando pincéis Nº 2. Os pacotes foram selados com um terceiro clipe e incubados a 27-28 °C e umidade relativa do ar de 80-90%. O grupo controle foi exposto a papel filtro com TCE-AO sem acaricida. Após 24 horas, a mortalidade das larvas foi determinada pela contagem do total de indivíduos mortos e vivos. Larvas que

estavam paralisadas ou apenas movendo suas patas sem a capacidade de andar foram consideradas mortas (FIGURA 4).



Figura 4: Larvas paralisadas e mortas pela ação do princípio ativo testado. Arquivo pessoal.

2.3.5 – Teste de Imersão de Larvas (TIL)

Inicialmente, uma solução de 2% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St Luis, MO, EUA) foi preparado em Etanol Absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) (ET-TX2%). Ivermectina técnica foi diluída a 1% em 10 ml da solução de ET-TX2% para preparar a solução estoque. No momento da realização dos testes, 100 µl da solução estoque foi adicionada a 9,9 mL de água destilada para obter as seguintes concentrações finais na mistura: 0,01% de Ivermectina, 1% de Etanol e 0,02% de Triton X-100. Esta mistura foi serialmente diluída 10 vezes em uma taxa de 30% em um diluente composto de Etanol 1% e Triton X-100 0,02%, para obtenção das soluções de imersão final com as seguintes concentrações (em % de IA): 0,01; 0,007; 0,0049; 0,00343; 0,0024; 0,00168; 0,00117; 0,00082; 0,00057; 0,0004 e 0,00028. Diluente sem acaricida foi utilizado como grupo controle.

O volume de 500 µl de cada solução de imersão foi adicionado em três microtubos de 1,5 ml (Axygen, Union City, CA, EUA). Utilizando pincel Nº 2, aproximadamente 100 larvas foram transferidas para cada tubo, que posteriormente foi fechado e agitado vigorosamente para garantir o afundamento das larvas. Após 10 min de imersão, as larvas foram removidas dos tubos com pinceis limpos e colocadas para secar em um pedaço de papel toalha, antes de serem transferidas para papéis dobrados ao meio e selados com cliques metálicos nas laterais.

Após adicionar as larvas, um terceiro clipe metálico foi colocado nos papéis e incubados em câmara ambiental tipo BOD a 27-28°C e umidade relativa do ar 85-90%, no

escuro. Após 24 horas, as mortalidades das larvas foram determinadas pela contagem de indivíduos mortos e vivos. Larvas que estavam paralisadas ou movendo apenas as patas sem a capacidade de andar foram consideradas mortas. (FIGURA 5)

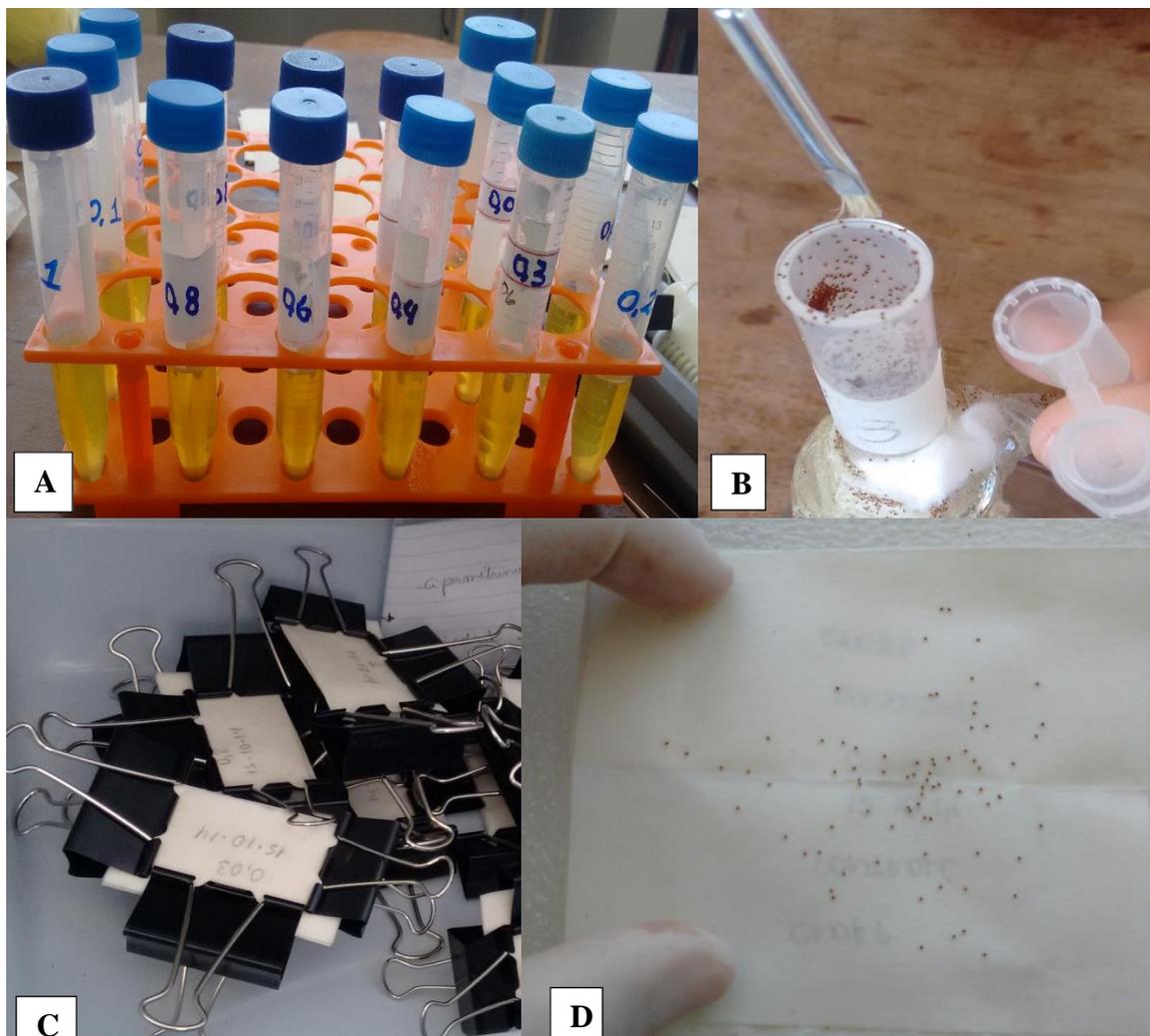


Figura 5: Sequência de preparação dos pacotes de larvas. A) -Soluções estoques preparadas; B) - Transferências de larvas de carrapatos para os tubos com o pincel número dois (2).C) - larvas em papel filtro seladas com cliques metálicos; D) - contagem de larvas após 24 horas. Nota-se as mesmas mortas.

2.4 Análises Estatísticas

Para os testes larvais foram realizadas uma análise probit nos resultados de mortalidade utilizando o software Polo-Plus (LeOra Software, 2003). O seguinte parâmetro foi determinado: índices de resistência (IR) utilizando a fórmula descrita por Robertson et al. (2007). A significância de cada comparação foi determinada quando não houver sobreposição dos intervalos de confiança calculados.

Para estabelecer possíveis fatores de risco ao desenvolvimento da resistência aos acarícidas foram realizadas análises univariadas e multivariadas. As análises univariadas foram realizadas utilizando o teste de chi-quadrado ou teste exato de Fisher e aquelas variáveis que apresentarem $P \leq 0.20$ foram usadas na regressão logística multivariável. Esta, por sua vez, foi realizada utilizando o método de stepwise forward (Hosmer e Lemeshow, 2000). Os níveis de significância nas análises multivariadas serão 5% e software utilizado será o SPSS 20.0 for Windows.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 1, considerando os seguintes dados: <5 irrelevante; 5 – 10 susceptível; 10-15 resistente;>15 muito resistente, pode-se verificar que das quatro propriedades analisadas, todas apresentaram algum grau de fator de resistência (FR) aos acaricidas, exceto o fármaco Fipronil. Este ficou em três (3) das quatro (4) propriedades com valores irrelevantes, e apenas na propriedade um (1) ele apresentou-se susceptível com o FR de 6,7.

Tabela 1. Resultados dos testes de resistência carrapaticidas expressos em Fator de Resistência (FR) de cepas de carrapatos do Brejo Paraibano, 2014.

Propriedade	Acaricidas utilizados				
	Amitraz	Cipermetrina	Clopirifós	Ivermectina	Fipronil
1	56.7	80.9	4.5	5.6	6.7
2	15.8	102	96.8	33.6	2.3
3	8.9	71.9	8.1	3.0	3.6
4	76.5	66.5	18.1	24.2	4.3

Na propriedade 1, que fica localizada em Areia PB, pode-se verificar que a Ivermectina juntamente com o Clopirifós e o Fipronil tiveram resultados no fator de resistência de irrelevantes a susceptível. Este fato pode estar relacionado ao não uso desses fármacos nos últimos dois anos na propriedade. A mesma propriedade ainda obteve grau do FR classificado como muito resistente ao Amitraz (56.7) e a Cipermetrina (80.9), demonstrando resistência a esses dois princípios ativos.

Na propriedade 2, que fica localizada em Bananeiras PB, foram obtidos resultados de muito resistente a Cipermetrina com valor de fator de resistência de (102); ao Clopirifós (96,8); a Ivermectina (33.6), e ao Amitraz. Pelo não uso do fármaco Fipronil na propriedade, supõe-se que o valor do fator de resistência encontrado de (2.3) classificando como irrelevante seja explicado.

A propriedade 3, localizada também na cidade de Bananeiras PB, os valores obtidos foram de FR susceptível ao Amitraz (8.9) e ao Clopirifós (8.1); irrelevante a Ivermectina (3.0), e ao Fipronil (3.6) e muito resistente a Cipermetrina (71.9). Com esses dados encontramos resistência em apenas um fármaco, podendo supor que tal achado se deu pelo fato da utilização exclusiva desse produto como forma de controle na propriedade nos últimos dois anos.

Já a propriedade 4, localizada em Areia PB, obteve-se resultados semelhantes a propriedade 2 localizada em Bananeiras PB. O fator de resistência para os fármacos: amitraz, cipermetrina, clopirifós, e ivermectina, enquadraram-se em muito resistente, com valores

respectivos de (76.5), (66,5), (18.1), e (24,2). Já o fipronil mostrou-se mais uma vez com valores de irrelevantes abaixo de cinco (4.3).

Na Tabela 2, podemos observar que em 100% das propriedades foi encontrada muita resistência a cipermetrina. A baixa eficácia da Cipermetrina também já foi reportada no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro (CAMILO et, al, 2008), e em Pernambuco (SANTANA,2000). O intenso uso deste grupo químico nos últimos anos pode ter favorecido o aparecimento da resistência nestas populações. Esses dados, no entanto, discordam com os valores de resistência encontrado em relação ao fator de resistência (1,31) que considera a cipermetrina eficaz em rebanhos provenientes do sul do Rio Grande do Sul. (MENDES, 2001).

Tabela 2. Susceptibilidade de quatro amostras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, coletadas nos municípios de Areia-PB e Bananeiras, frente a diferentes acaricidas testados em 2014.

Acaricidas	Número de propriedades com cepas de R. (B) microplus irrelevante	Número de propriedades com cepas de R. (B) microplus susceptível	Número de propriedades com cepas de R. (B) microplus muito resistente	Número de propriedades com cepas de R. (B) microplus resistente
Amitraz	-	1/ 4- 25%	3/4 – 75%	1 /4-25%
Cipermetrina	-	-	4//4 – 100%	-
Clopirifós	1/4 - 25%	1/ 4-25%	2/4 – 50%	-
Fipronil	3/4 – 75%	1 /4- 25%	-	-
Ivermectina	1/ 4-25%	1 /4- 25%	2/4 – 50%	-

Em relação ao amitraz ,75% das propriedades também se enquadraram com muita resistência a esse princípio ativo. Na Bahia, Campos Júnior e Oliveira (2005), constataram ineficácia do princípio ativo amitraz (30,95%), concordando com os valores encontrados nesse estudo. No Rio Grande do Sul, Santos e Vogel (2012) com valores de eficácia de 54 e 70% para amitraz e cipermetrina respectivamente, os considerou obsoletos como ectoparasiticidas. Na região noroeste do Estado de São Paulo, Oliveira et al., (2013), encontraram que o amitraz (66%) e a cipermetrina (70%) não foram eficazes no controle do carrapato *R.(B.) microplus*. Essa grande variação pode ser devida a elevada ação residual e presença no mercado por mais de 20 anos em várias partes do mundo (MARTINS,2006).

O fipronil obteve eficácia em todas as propriedades ficando abaixo do fator de resistência 5, sendo compatível com os valores encontrados por Spanogol, Paranhos e Albuquerque (2010). Na Bahia é consideravelmente maior que a média obtida por Martins et al. (2011), no Rio Grande do Sul. Spagnol e Albuquerque (2010) justificaram que a alta eficácia do fipronil pode ser devida ao preço elevado ou o uso proibido em animais lactantes. O fipronil é o produto mais recente no mercado e, além disso, é utilizado na forma pour-on,

reduzindo a possibilidade de erros de aplicação por diluição incorreta, quantidade insuficiente de produto por animal ou por não atingir todo o corpo do bovino. Essas características podem sugerir uma reduzida instalação da resistência a esse produto.

No presente estudo encontrou-se o valor de fator de resistência muito alto à Ivermectina em 50% das propriedades analisadas. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por LOPES et al. (2013), que obtiveram um fator de resistência de 77,88, considerando como alta resistência. Divergindo desses valores, um estudo em São José do Rio pardo/SP apresentou uma cepa sensível a ivermectina FR (3,15), e o mesmo ocorreu em Patrocínio Paulista/SP FR (3.0). Esse princípio ativo é largamente utilizado nas propriedades pela forma prática de utilização injetável e dosagem errada, podendo supor que esse seja a principal da alta resistência.

No quadro 1, podemos observar que todas as propriedades realizam a criação semi intensiva dos animais fator esse que leva a um menor cuidado em relação a tratamentos dos animais e menor percepção das infestações de carrapatos pelo fato de animais confinados terem maior atenção do que os criados a pasto. Em relação ao tipo de exploração duas propriedades criam o gado exclusivamente para leite, uma de corte e leite e a outra apenas com a finalidade de corte. Duas propriedades têm animais da raça Girolando, ambas de produção de leite. Apesar desta raça ser um cruzamento com Gir e Holândes (muito utilizada para produção leiteira), sabe-se que raças de bovinos com sangue europeu tem uma maior susceptibilidade a infestação por carrapatos do que as raças de sangue zebuína. Dentro de cada raça, ou animais com mesmo grau de sangue apresenta-se diferenças na susceptibilidade (Martins,2004). As demais propriedades apresentam animais Sem Raça Definida (SRD).

Quadro1: Levantamento das raças bovinas, tipo de exploração e sistema de produção das propriedades estudadas na cidade de Areia e Bananeiras -PB (2015).

Propriedades	Raças	Tipo de Exploração	Sistema de produção
Propriedade 1	Girolando	Leite	Semi intensivo
Propriedade 2	SRD	Corte	Semi intensivo
Propriedade 3	SRD	Misto	Semi intensivo
Propriedade 4	Girolando	Leite	Semi intensivo

O intenso uso dos acaricidas submetendo as populações de carrapatos a uma forte pressão de seleção de indivíduos resistentes (GONZALES, 2003). A seleção de populações de

carrapatos resistentes aos diferentes princípios químicos utilizados gera um ciclo vicioso por estar selecionando populações resistentes. Este fenômeno encontra-se em curva crescente em todas as regiões onde o *R. (B.) microplus* encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento, notadamente nas áreas tropicais.

Rocha et al. (2006) relataram que os pecuaristas percebem os prejuízos causados pelo parasitismo, porém, falta o conhecimento sobre a biologia do carrapato e as desvantagens do banho carrapaticida mal manejado. O manejo das propriedades prioriza a produção e há desinteresse dos proprietários em modifica-lo para favorecer o controle da parasitose, que é considerada de forma curativa (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004; SANTOS JÚNIOR; FURLONG; DAEMON, 2000). Além disso, podemos supor que um agravante a situação atual de resistência dos carrapatos é representado pela frequente constatação de falhas de manejo como: aplicações em períodos inadequados vinculado à ocorrência de formas adultas. De maneira geral constata-se que a falta de informações técnicas que embasem o correto uso destes produtos antiparasitários, levam ao aumento significativo no atual problema de resistência (GOMES et al., 2011).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Obteve-se eficácia no fipronil e resistência nos demais princípios ativos. 50% das propriedades analisadas foram resistentes a Ivermectina, 100% a Cipermetrina Amitraz (75%), e ao Clorpirifós (50%). O único fármaco que obteve valores irrelevantes em 75% das propriedades foi o fipronil, sendo este pouco utilizado á campo devido ao alto custo, podendo justificar tal dado. A resistência antiparasitária é uma realidade nacional e mundial, cujas perspectivas atuais são desfavoráveis, tornando prementes os avanços nas pesquisas em buscas de novas metodologias que possibilitam o diagnóstico mais precoce da resistência, e conseqüentemente, permitam a escolha de princípios ativos mais eficazes no seu controle, de forma simples e com custos reduzidos.

Apesar dos dados desse estudo mostrarem resultados positivos para as suspeitas de resistência dos carrapatos em graus variados, o Brejo Paraibano requer maiores estudos sobre a situação atual para que futuramente possa obter dados sobre a região e maior controle de manejo dos produtos químicos. O controle estratégico é localizado e deve ser adaptado de acordo com as características climáticas da região na época mais quentes ou na seca.

É importante o uso racional dos carrapaticidas e o monitoramento frequente da eficácia do produto utilizado no controle, o que pode ser indicado pelo teste de eficiência dos acaricidas. Além disso deve-se evitar o uso de superdosagens eo excesso de aplicações dos acaricidas. Essa pratica leva apenas a aumentar o grau de resistência e gera um alto custo para o produtor. A orientação profissional de um veterinário sobre a correta utilização dos acaricidas seria uma alternativa para os produtores e talvez uma forma de se evitar futuramente resistência pelo mau uso dos agentes químicos

5. CONCLUSÃO

A resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas Ivermectina, cipermetrina, amitraz e clorpirofós é crescente no rebanho bovino do Brejo Paraibano.

A confirmação de resistência em populações na região é preocupante, pois significa que os métodos de manejo e controle de carrapatos são precários e não respondem de forma eficaz. Contudo, o diagnóstico correto de cepas resistentes permite o aperfeiçoamento de técnicas de diagnósticos e de ações preventivas e de controle de uma maneira mais sustentável.

REFERÊNCIAS

ANUALPEC. São Paulo: AgraFNP. 360p. 2009.

BRIZUELA, C. M.; ORTELLADO, C. A.; SANCHEZ, T. I.; OSORIO, O.; WALKER, A. R. Formulation of integrated control of *Boophilus microplus* in Paraguay: analysis of natural infestations. **Veterinary Parasitology**, v. 63, p. 95-108, 1996.

CAMILLO, G.; VOGELI, F. F.; SANGIONI, L. A.; CADORE, G. C. FERRARI, R. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural (Online)**, 2008.

CAMPOS JÚNIOR D.A; OLIVEIRA P.R. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**. v. 35, n. 6, p. 1386-1392, 2005.

COLES, G. C. et al. World Association for the Advanced of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; MILLER, R. J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, p. 211-220, 2006.

FAO- Food and Agriculture Organization.. Resistência a los antiparasitários: estado actual com énfasis en América Latina. Roma. **Estudio FAO producción y sanidad animal**, v.157, 51p, 2003.

FAO - Food and Agriculture Organization. Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. Module 1 - Ticks: **Acaricide resistance: Diagnosis management and prevention**, Roma, 77p. 2004.

FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B. dos. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1700-1704, 2008.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v.159, p.26-32, 2007.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

GOMES A., KOLLER W.W., BARROS A.T.M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41 n. 8, p. 1447-1452, 2011.

GONZALES J.C. 2003. O Controle do Carrapato do Boi. 3ª ed. **Universidade de Passo Fundo**, Passo fundo, 128p.

HOSMER D.W.; LEMESHOW S. Applied logistic regression. 2 ed. New York: John Wiley & Sons. 2000.

KAUFMAN, W.R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Oxford, v.5, n.2, p.47-56, 1989.

KLAFKE, G.M.; CASTRO-JANER, E.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A.; SCHUMAKER, T.T. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 212-220, 2012.

LOPES, W. D. Z.; TEIXEIRA, W. F. P.; MATOS, L. V. S.; FELIPPELLI, G.; CRUZ, B. C.; MACIEL, W. G.; BUZZULINI, C.; FÁVERO, F. C.; SOARES, V. E.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Effects of macrocyclic lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* females detached from experimentally infested cattle. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 72-78, 2013.

MARTINS, J. R. et al. Partial strategic tick control within a herd of European breed cattle in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 27, n. 3, p. 241-251, 2002.

MARTINS, J.R.S. **Carrapato *Boophilus microplus* (Can.1887) (Acari:Ixodidae) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina**. Rio Grande do Sul, 2006.74p.Tese (Doutorado em Ciência Animal) -Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais,2006.

MARTINS, J.R. Manejo da resistência aos carrapaticidas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, sumpl. 1, p. 114-115, 2004.

MARTINS, J.R et al. Acaricide resistance in Brazil and the use of mixtures as chemical alternative for tick control. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL,6.,2011. Boca del Río Veracruz.
Disponível em:http://www.cbpv.com.br/artigos/CBPV_artigo_026.pdf. Acesso em: 27 fev.2015.

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.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Normas para registros de parasiticidas de uso pecuário no Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, 19p.1987.

OLIVEIRA F.P., SPADA J.C.P., SILVA T.S.D., FERREIRA L.C., LUQUETTI B.C., SOUTELLO R.V.G. Resistência do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* aos diferentes grupos de acaricidas utilizados na região noroeste do estado de São Paulo. **Ciências Agrárias da Saúde**. 9, p.54-60,2013.

ROCHA,C,M,B,M.Percepção e atitude de produtores de leite do município de Passos MG,sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria,n.36,p.1235-1242,2006.

- RAYNAL, J.T.; SILVA, A.A.B.; SOUSA, T.J.; BAHIENSE, T.C.; MEYER, R. PORTELA, R.W. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 22, p. 71-77, 2013.
- RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B, SCHEFFER, R.; SOUZA, Rhipicephalus *microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 128-136, 2014.
- RECK JR., J.; BERGER, M.; TERRA, R.M.; MARKS, F.S.; DA SILVA VAZ JR., I.; GUIMARÃES, J.A.; TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Veterinary Science**, v. 86, p. 56-62, 2009.
- ROBERTSON, J.L.; RUSSELL, R.M.; PREISLER, H.K.; SAVIN, N.E. (eds.) Bioassays with Arthropods, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2007.
- SANTANA, V.L.A. **Situação do controle químico do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) das sub-regiões na Zona da Mata e Agreste do Estado de Pernambuco, com base em testes in vitro de eficácia de carrapaticidas em fêmeas ingurgitadas.** 2000. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2000.
- SANTOS F.C.C., VOGEL F.S.F. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente ao amitraz e cipermetrina em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul de 2005 a 2011. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**,v. 111, p. 121-124, 2012.
- SANTOS JÚNIOR, J.C.B; FURLONG,J.; DAEMON,E. Controle do carrapato *Boophilus microplus*(Acari:Ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica Fluminense do Grande Rio- Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria,v.30,n.2, p.305-311,2000.
- SPAGNOL,F.H;PARANHOS,E.B.;ALBURQUERQUE,GR. Avaliação in vitro da ação dos carrapaticidas sobre *Rhipicephalus (Bophilus) microplus* Canestrini,1887(Acari:Ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, p.731-736,2010.
- SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal, 2010. Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal, 2009. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em: 20 maio. 2015.
- VARGAS, M.S. et al. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à Amitraz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 737-742, 2003.
- VERCRUYSSSE, J.; ALBONICO, M.; BEHNKE, J. M.; KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K.; MCCARTHY, J. S.; MONTRESOR, A.; LEVECKE, B. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 1, p.14-27, 2011.

ANEXO

Caracterização das propriedades

Propriedade:

Produtor:

Município:

Data da Coleta: _____

1. População bovina:

3. Sistema produtivo: Extensivo
 Semi-intensivo
 Intensivo

2. Raça:

4. Tipo de exploração: Leite
 Corte
 Misto

5. Área de pastejo:

Caracterização do manejo para o controle dos carrapatos

6. Acaricida(s) utilizado(s) nos últimos dois anos (nomes comerciais):

- a)
b)
c)

d)
e)

7. Acaricida(s) utilizado (s) no último tratamento:

- a)
b)
c)

8. Intervalo entre tratamentos:

- a)
b)
c)

9. Método de aplicação:

- a) pulverização
b) *Pour on*
c) injetável

10. Influência para a escolha do produto

- a) Médico Veterinário

b) amigo/ vizinho
c) preço do produto
d) outro: