

Avaliação *in vitro* de carrapaticidas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), no norte do estado do Rio de Janeiro, Brazil*

In Vitro Analyses of Acaricides in Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), in the northern region of Rio de Janeiro State, Brazil

Gilmar Ferreira Vita¹, Erica Dumas², Maria Angélica Vieira da Costa Pereira² & Ildemar Ferreira¹

ABSTRACT

Background: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) traditionally known as cattle tick, is the species that most affects cattle productivity levels in Brazil. The parasite causes annual losses up to US\$ 2 billion. Despite several researches carried out all over the globe, it still presents great challenge, especially due to evidence of resistance to chemical products used in plague control. The goal of this project was to verify *in vitro* efficiency of pesticides in controlling *R. (B.) microplus*, at Campos dos Goytacazes municipality, Rio de Janeiro, Brazil, in 2007.

Materials, Methods & Results: The *in vitro* test used was the one recommended by FAO's (Food and Agriculture Organization) World Acaricides Resistance Reference Center (WARRC). Engorged females were manually collected off the ground from stalls and separated in two treatments, amitraz 12.5% (commercial dilution 1:500 = 2 mL/1000 mL) and cypermethrin 15% (commercial dilution 1:1000 = 1 mL/1000 mL), each one with six groups of ten parasites. A different solution - 1:10, 1:100, 1:1000, 1:100000 and 1:1000000 - for both acaricides tested was used on each group, and for control was used potable water. The test was started from the highest dilution. Each dilution was repeated three times simultaneously. Recommended dilutions in the research were in the protocol. Each group of engorged females was weighted in analytical precision scale with equivalence in measurement of weights and, further, transferred to a Becker, containing 50 mL of the solution to be tested, previously prepared. The Becker was kept in constant agitation for five min. Afterwards, the engorged females were put upon towel paper (15 cm) in order to remove excess of the product, being then transferred to Petri plates (100 mm x 20 mm height), identified and taken to a BOD incubator at 28 C (\pm 1) and 80% humidity. After oviposition, the number of eggs laid by each group were weighted and inserted in previously adapted plastic syringes, identified and taken again to the same incubator. We conducted the reading of the eggs hatching percentage after 30 days, with a stereoscopic microscope, using as reference the hatching observed in the control group that was kept on a different incubator. The reproduction efficiency (RE) was calculated using the equation; $RE = \text{eggs' weight}/\text{female's weight} \times \% \text{ hatching} \times 20.000$. The control percentage was calculated following the equation, considering the arithmetic mean of three repetitions: $\% \text{ control} = RE \text{ (non-treated)} - RE \text{ (treated)}/RE \text{ non-treated} \times 100$. We obtained as results after a 30 days analysis, a mean percentage of total efficiency of 96.60% for amitraz 12.5% and of 98.00% for cypermethrin 15% in the control of eggs hatching.

Discussion: The amitraz 12.5% and the cypermethrin 15% presented excellent results in controlling wild strains of *R. (B.) microplus* that attacks cattle at Campos dos Goytacazes municipality, Rio de Janeiro, agreeing with FAO's WARRC and the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), which established a legally accepted efficacy for acaricides being equal or superior to 80.00% and 95.00%, respectively, over tick strains. Hence the importance of this pioneer project in the region and its contribution to the subject extension.

Keywords: bioassay, acaricides, amitraz, cypermethrin, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Descritores: biocarrapaticidograma, carrapaticidas, amitraz, cipermetrina, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), conhecido popularmente como carrapato-do-boi, é a espécie que mais compromete a produtividade pecuária bovina no Brasil, sendo considerada extremamente nociva para estes animais. Dados responsabilizam o parasito por prejuízos anuais no país superiores a US\$ 2 bilhões [13].

Apesar das inúmeras pesquisas realizadas em todo mundo, com o objetivo de alcançar uma maior eficácia no controle deste carrapato, este se apresenta como um grande desafio, ampliado principalmente pelo surgimento da resistência oferecida por ele aos produtos químicos empregados [10].

Segundo alguns autores, esta resistência é adquirida pela frequente exposição dos carrapatos aos carrapaticidas, uso indiscriminado e erros de manejo, que leva suas populações a acostumarem com o veneno e não morrerem com os grupos de bases químicas disponíveis no mercado [3,12].

No Brasil, o primeiro relato de resistência do *R. (B.) microplus* a carrapaticidas ocorreu no Rio Grande do Sul, na época em que se utilizavam os arsenicais [5,8,9].

Posteriormente, com o advento dos novos produtos, relatos constantes da ineficácia e testes contínuos realizados por profissionais/pesquisadores, vários trabalhos surgiram, confirmando a ocorrência de resistência sobrevivida das novas adaptações dos carrapatos [7,15,16,18,26].

O objetivo desta pesquisa foi verificar a eficácia *in vitro* de carrapaticidas no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, em 2007, região sem relatos de caso, mas que a muito vem apresentando crescentes reclamações de produtores e profissionais do campo, a despeito de diversos problemas relacionados ao controle do carrapato *R. (B.) microplus*, onde a suspeita de resistência parece provável.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Parasitologia, Hospital Veterinário, Laboratório de Sanidade Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), sendo o material coletado proveniente de fazendas institucionais

e privadas, todas localizadas no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro.

As fêmeas ingurgitadas (teleógenas) utilizadas foram de *R. (B.) microplus*, originárias de cepas selvagens que parasitam bovinos mestiços e de raças apuradas, criados na região estudada, previamente identificados, everminados e vacinados contra doenças infecto-contagiosas. Assegurou-se que os animais em que as amostras foram coletadas não haviam sido submetidos a tratamento com acaricidas em um intervalo inferior a 30 dias.

Para início da pesquisa aplicou-se um questionário a 25 produtores/criadores do município, onde foram reconhecidas as bases químicas mais administradas para o controle do carrapato *R. (B.) microplus*.

O teste *in vitro* foi originalmente retirado dos trabalhos de Drummond *et al.* [6], citados pelo Centro Mundial de Referência para a Resistência a Acaricidas (WARRC) [27], da Organização Mundial para Alimentos e Agricultura (FAO).

As fêmeas ingurgitadas foram coletadas manualmente no chão das baias e separadas em dois tratamentos, amitraz a 12,5% (diluição comercial 1:500 = 2 mL/1000 mL) e cipermetrina a 15% (diluição comercial 1:1000 = 1 mL/1000 mL), cada um com seis grupos de dez. Para cada grupo foi utilizado uma diluição diferente, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000, das duas bases químicas testadas, e o controle que foi banhado com água potável. A sequência de uso foi realizada a partir da maior diluição. Cada diferente diluição foi repetida três vezes de forma simultânea. Nesta pesquisa as diluições recomendadas foram as do protocolo.

Cada grupo de fêmeas ingurgitadas foi pesado em balança analítica com equivalência na mensuração dos pesos e, posteriormente, transferido para um becker, contendo 50 mL da solução a ser testada, previamente preparada. O becker foi mantido em constante agitação durante cinco min. Após este tempo, as fêmeas ingurgitadas foram colocadas sobre papel filtro (15 cm²) para retirar o excesso de produto, sendo então transferidas para placas de Petri (100 mm x 20 mm de altura), identificadas e levadas à incubadora BOD à 28°C (±1) e umidade relativa de 80%. Após ocorrer a ovoposição, as posturas de cada grupo foram pesadas e colocadas em seringas plásticas, previamente adaptadas, identificadas e levadas novamente à mesma incubadora.

Realizou-se a análise do percentual de eclosão dos ovos após 30 dias, com auxílio de um microscópio estereoscópico, tomando como referência a eclodibilidade observada no grupo controle, que foi mantido em outra incubadora BOD. O cálculo da eficiência reprodutiva (ER) foi estabelecido utilizando a seguinte equação:

$$ER = \frac{\text{Peso dos ovos}}{\text{Peso das fêmeas}} \times \% \text{ de eclosão} \times 20.000$$

A constante 20.000 significa o número estimado de ovos em 1 grama de ovos de *R. (B.) microplus*.

A percentagem de controle foi calculada de acordo com a seguinte equação, considerando a média aritmética das três repetições:

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

Para estabelecer a hipótese alternativa de que uma base química era em média mais eficaz que a outra, comparou-se o percentual médio de controle

interdiluições dos dois tratamentos através do Teste *t* de Student ao nível de 5% de significância, disponibilizado no Software Statística, versão 7.1 [25].

RESULTADOS

Na análise qualitativa levantada em questionário, reconheceu o amitraz a 12,5% e a cipermetrina a 15% como as bases químicas mais utilizadas na região estudada.

Ao realizar a leitura do percentual de controle da eclosão dos ovos de teleógenas de *R. (B.) microplus*, após 30 dias de análise, observamos que o fármaco amitraz a 12,5%, obteve um percentual médio, nas três repetições, de 96,60% (Tabela 1).

Com relação ao efeito do produto cipermetrina a 15% sobre o percentual de controle da eclosão dos ovos de teleógenas de *R. (B.) microplus*, contabilizamos ao realizar a leitura após 30 dias, um percentual médio, nas três repetições, de 98,00% (Tabela 2).

A análise estatística realizada não confirma a hipótese do trabalho, de que um tratamento é em média

Tabela 1. Percentual médio de controle da eclosão dos ovos de teleógenas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por diluição da base química amitraz a 12,5%, considerando as três repetições realizadas, após 30 dias do banho carrapaticida *in vitro*, e eficácia média total do produto.

Carrapato	Base química	Diluição	Controle
<i>Boophilus microplus</i>	Amitraz a 12,5%	1:10	100,00%
		1:100	98,50%
		1:1000	98,50%
		1:10000	95,50%
		1:100000	90,50%
Eficácia média total	96,60%		

Tabela 2. Percentual médio de controle da eclosão dos ovos de teleógenas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por diluição da base química cipermetrina a 15%, considerando as três repetições realizadas, após 30 dias do banho carrapaticida *in vitro*, e eficácia média total do produto.

Carrapato	Base química	Diluição	Controle
<i>Boophilus microplus</i>	Cipermetrina a 15%	1:10	99,00%
		1:100	99,00%
		1:1000	98,00%
		1:10000	99,00%
		1:100000	95,00%
Eficácia média total	98,00%		

mais eficaz que o outro, mas ao contrário, admite não haver diferença significativa entre eles ($t = 1,2727$; $GL = 4$; $P \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

A preferência dos produtores/criadores pelos produtos amitraz a 12,5% e cipermetrina a 15% também foi verificada por diversos autores em suas investigações [3,11,21].

O percentual médio de eficácia do produto amitraz a 12,50% (96,60%), demonstra que o mesmo está dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Centro Mundial de Referência para a Resistência a Acaricidas (WARRC), da Organização Mundial para Alimentos e Agricultura (FAO) [27], que preconiza como 80,00% de eficácia um excelente resultado, e também do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [2], que considera uma eficiência legalmente aceitável para uma base química carrapaticida no Brasil igual ou superior a 95,00%.

Diversos trabalhos na literatura acordam com o nosso diagnóstico, por exemplo, Soares *et al.* [24] que avaliando por meio de teste de imersão “*in vitro*” a susceptibilidade do *R. (B.) microplus* ao amitraz em 17 propriedades de bovinos leiteiros da região nordeste do estado de São Paulo, informou uma ausência total de eclosão de larvas, com eficácia de 100,00%; Silva Filho [23] que analisando o amitraz frente a princípios naturais em teleógenas de *R. (B.) microplus* provenientes de fazendas do município de Teresina, estado do Piauí, observou uma eficiência de 100,00%; e, Olivo *et al.* [19] que observando a ação do amitraz sobre *R. (B.) microplus* provenientes de bovinos leiteiros da raça Holandesa, em Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul, verificou que o controle do carrapato foi superior a 95,00%.

O efeito do produto cipermetrina a 15% (98,00%), ainda superior ao do amitraz a 12,5%, determinou também sua eficácia, acordando com o instituído pelo Centro Mundial de Referência para a Resistência a Acaricidas (WARRC), da Organização Mundial para Alimentos e Agricultura (FAO) [27] e o

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [2].

Poucos são os trabalhos no país que demonstram a susceptibilidade do *R. (B.) microplus* ao produto cipermetrina, entre eles encontramos, Melo *et al.* [17], que em pesquisas realizadas no município de Brejo da Madre de Deus, estado de Pernambuco, observou uma eficácia de 97,60% do produto, e Andreotti *et al.* [1], que em 21 municípios do estado do Mato Grosso do Sul, contabilizou eficácia em apenas quatro, com valores entre 96,00% a 100,00%.

Devemos ressaltar, considerando-se 95,00% o valor mínimo indicativo de eficácia para produtos testados pelos órgãos de orientação citados, que os resultados encontrados nesta pesquisa em relação às duas bases químicas entram em contradição com dezenas de trabalhos no país (região norte [22], região nordeste [4], região sudeste [20], região sul [3] e região centro-oeste [14]) que certificam a baixa susceptibilidade dessas bases em todo o território.

CONCLUSÃO

Esta pesquisa permite concluir que o amitraz a 12,5% e a cipermetrina a 15% mostram-se excelentes no controle da cepa regional de *R. (B.) microplus* oriunda de Campos dos Goytacazes. É importante enfatizar que um biocarrapaticidograma deve sempre ser recomendado, visto constituir uma ferramenta eficaz para determinar a sensibilidade de *R. (B.) microplus* frente aos acaricidas comerciais de contato, além de indicar o produto potencialmente mais efetivo para cada população de carrapatos. Além disso, auxilia na descrição do perfil regional dos níveis de sensibilidade e resistência dos carrapatos às bases químicas disponíveis no mercado.

Ethical approval. This experiment was performed according to the Experimental Animal Management Law and was approved by the Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Brazil (process number 23083.005374/2011-13).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 Andreotti R., Guerrero F.D., Soares M.A., Barros J.C., Miller R.J. & Léon A.P. 2011. Resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20(2): 127-133.

- 2 **Brasil. 1990.** Ministério da agricultura. Portaria n. 90 de 04 de dezembro de 1989. *Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários*. Diário oficial, sec. 1, col. 2. Edição de 22/01/1990.
- 3 **Camillo G., Vogel F.F., Sangioni L.A., Cadore G.C. & Ferrari R. 2009.** Eficiência *in vitro* de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. 39(2): 490-495.
- 4 **Campos Júnior D.A. & Oliveira P.R. 2005.** Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Ciência Rural*. 35(6): 35-48.
- 5 **Corrêa O. 1953.** A resistência aos inseticidas carrapaticidas e antibióticos. *Boletim da Diretoria de Produção Animal*. 9(17): 75-80.
- 6 **Drummond R.O., Ernest S.E., Trevino J.L., Gladney W.J. & Graham O.H. 1973.** *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 66: 130-133.
- 7 **Franque M.P., Santos H.A., Linarez F.F.M. & Massard C.L. 2009.** Infestação experimental de equinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciência Rural*. 39(7): 2117-2122.
- 8 **Freire J.J. 1953.** Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Boletim da Diretoria de Produção Animal*. 9(17): 3-31.
- 9 **Freire J.J. 1956.** Carrapato resistente as banhações carrapaticidas no Rio Grande do Sul. *Boletim da Diretoria de Produção Animal*. 13: 62-83.
- 10 **Freitas D.R.J., Pohl P.C. & Vaz Jr. I.S. 2005.** Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(2): 109-117.
- 11 **Furlong J. & Martins J.R.S. 2000.** *Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas*. Juiz de Fora: CNPGL-EMBRAPA, 25p.
- 12 **Furlong J., Martins J.R. & Prata M.C.A. 2007.** O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Veterinária*. 159: 26-32.
- 13 **Grisi L., Massard C.L., Moya-Borja G.E. & Pereira J.B. 2002.** Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*. 21(125): 8-10.
- 14 **Koller W.W., Gomes A. & Barros A.T.M. 2009.** *Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 47p.
- 15 **Leite R.C. 1988.** *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. 122f. Itaguaí, RJ. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- 16 **Martins J.R., Ceresér V.H., Correia B.L., Artech C.C.P. & Queirolo M.T. 1995.** Resistência a carrapaticidas piritróides: Diagnóstico da situação no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 4(2): 47.
- 17 **Melo K.D., Nascimento R.M.S., Santiago G.B., Macedo A.T.M., Ramos R.A.N., Alves L.C. & Faustino M.A.G. 2010.** Teste *in vitro* da eficácia de amitraz e cipermetrina sobre carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: *Resumos da X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão* (Recife, Brazil). pp.1-2.
- 18 **Merlini L.S. & Yamamura M.H. 1998.** Estudo *in vitro* da resistência de *Boophilus microplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do Norte do estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. 19(1): 38-44.
- 19 **Olivo C.J., Heimerdinger A., Ziech M.F., Agnolin C.A., Meinerz G.R., Both F. & Charão P.S. 2009.** Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. *Ciência Rural*. 39(4): 1131-1135.
- 20 **Pereira J.R. 2006.** Eficácia *in vitro* de formulações comerciais de carrapaticidas em teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba, estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 15(2): 45-48.
- 21 **Rocha C.M.B.M., Oliveira P.R., Leite R.C., Cardoso D.L., Calic S.B. & Furlong J. 2006.** Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. *Ciência Rural*. 36(4): 1235-1242.
- 22 **Silva J.U.R., Silva B.B., Sousa D.K., Rodrigues M.A., Santos H.D. & Sato M.O. 2004.** Aspectos no controle do *Boophilus microplus*, indícios da resistência aos acaricidas na região norte do Tocantins. In: *Resumos do 13º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária* (Ouro Preto, Brazil). p.305.
- 23 **Silva Filho M.L. 2007.** Avaliação *in vitro* da ação antiparasitária do extrato aquoso e etanólico do Angico preto (*Anadenanthera macrocarpa*) (Benth.) Brenan sobre o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). 59f. Teresina, PI. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.

- 24 **Soares V.E., Silveira D.M., Nunes T.L.S., Oliveira G.P., Barbosa O.F. & Costa A.J. 2001.** Análise *in vitro* da ação de carrapaticidas em cepas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) colhidas de bovinos leiteiros da região nordeste do Estado de São Paulo. *Semina: Ciências Agrárias*. 22(1): 85-90.
- 25 **Statsoft Inc. 2005.** *Statistica (data analysis software system), version 7.1*. Oklahoma: USA.
- 26 **Vargas M.S., Céspedes N.S., Sánches H.F., Martins J.R. & Céspedes C.O.C. 2003.** Avaliação *in vitro* de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à Amitraz. *Ciência Rural*. 33(4): 737-743.
- 27 **Warrc 1997.** *Manual de instruções, diagnóstico de resistência a carrapaticidas*. New York: Centro Mundial de Referência para a Resistência a Acaricidas, Organização Mundial para Alimentos e Agricultura (FAO), 650p.