

LUANA PAULA HAUBOLD NEIS VEIGA

**SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus À CIPERMETRINA E AMITRAZ NO PLANALTO
CATARINENSE E PROPOSTA DE UM TESTE DE IMERSÃO DE
LARVAS PARA AVALIAÇÃO DE CARRAPATICIDAS**

LAGES - SC

2007

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA-UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS-CAV**

LUANA PAULA HAUBOLD NEIS VEIGA

**SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus À CIPERMETRINA E AMITRAZ NO PLANALTO
CATARINENSE E PROPOSTA DE UM TESTE DE IMERSÃO DE
LARVAS PARA AVALIAÇÃO DE CARRAPATICIDAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: PhD., Prof. Antonio Pereira de Souza

LAGES - SC

2007

LUANA PAULA HAUBOLD NEIS VEIGA

SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* À CIPERMÉTRINA E AMITRAZ NO PLANALTO CATARINENSE E PROPOSTA DE UM TESTE DE IMERSÃO DE LARVAS PARA AVALIAÇÃO DE CARRAPATICIDAS

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, no Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador:

PhD., Prof. Antonio Pereira de Souza – UDESC/CAV

Membro:

PhD., Prof. Romário Cerqueira Leite - UFMG

Membro:

PhD., Prof. Fábio B. Scott - UFRRJ

Lages, 21 de agosto de 2007

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Santa Catarina/UEDESC, por ser uma Instituição nítida em seus objetivos e comprometida em formar profissionais qualificados para atender aos anseios da sociedade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES pelo apoio fornecido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Everton e Nara Neis e ao meu marido, Ricardo, pelo incentivo para a realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Antonio Pereira de Souza que com sua clareza e objetividade me orientou neste trabalho.

Aos Professores Valdomiro Bellato e Amélia Aparecida Sartor, membros da Comissão de Orientação, pelos seus ensinamentos e apoio nas dificuldades encontradas durante a fase experimental.

Aos bolsistas de iniciação científica Ana Paula de Oliveira Nunes e Helena Cardoso, pelo auxílio durante o desenvolvimento da fase experimental.

Aos colegas de curso e de profissão que direta ou indiretamente me ajudaram nessa caminhada, seja por idéias e sugestões ou pela mão amiga e companhia.

RESUMO

A realização deste trabalho teve como objetivos avaliar a situação da resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* à cipermetrina e ao amitraz no Planalto Catarinense e desenvolver uma técnica de avaliação de carrapaticidas por imersão de larvas. No período de janeiro de 2004 a maio de 2006, foram coletadas amostras de teleóginas em bovinos de 20 propriedades, no Planalto Catarinense (amostras por conveniência) e recebidas 20 amostras de teleóginas enviadas por produtores rurais. Foram realizados testes *in vitro* de imersão de teleóginas em acaricida à base de cipermetrina (0,015%) e amitraz (0,025%). Constatou-se que a resistência do carrapato *R. (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas cipermetrina e amitraz é crescente no rebanho bovino do Planalto Catarinense. Para a realização do teste de imersão de larvas foram coletadas 30 teleóginas de bovinos de uma propriedade rural do município de Lages. As larvas utilizadas no teste de imersão foram obtidas de ovos da postura do terceiro ao décimo segundo dia, que foram acondicionados 10mg por seringa, descartável de 5ml, previamente preparadas e mantidas em câmara climatizada até a eclosão das larvas. Para o teste carrapaticida foram utilizadas larvas de sete a dez dias submetidas à imersão, por 30 segundos, em oito diluições de produtos carrapaticidas comerciais à base de amitraz e de cipermetrina, cada uma com dez repetições. O grupo controle para cada repetição e produto, foi imerso em água destilada. A leitura foi realizada 24 horas após o tratamento com a contagem de larvas vivas e mortas. O cálculo da dose letal₅₀ foi realizado a partir da linha de regressão, utilizando o programa "Sigma plot". A metodologia proposta para o teste carrapaticida por imersão com larvas apresentou resultados promissores para avaliação de carrapaticidas e pode ser utilizada para calcular a média da dose letal₅₀ para os acaricidas à base de cipermetrina e amitraz.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cipermetrina. Amitraz. Resistência.

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the degree of resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to cypermethrin and amitraz in the Santa Catarina Plateau, and to develop a technique for the evaluation of acaricides by larvae immersion. Engorged female ticks, collected between January 2004 and May 2006, were sampled from 20 ranches in the Santa Catarina Plateau (samples by convenience) and also received directly from ranchers (20 samples). Engorged females were submitted to *in vitro* immersion tests in cypermethrin (0.015%) and amitraz (0.025%) acaricides. The results indicated resistance of *R. (B.) microplus* to cypermethrin and amitraz to be rising in bovine herds in the Santa Catarina Plateau. To carry out the larvae immersion test, 30 engorged females were collected in a ranch in Lages. Larvae used in the immersion test were obtained from 10mg of eggs placed into 5ml disposable syringes, previously prepared and kept in controlled conditions of laboratory (27 ± 1 °C and $80 \pm 10\%$ UR), and collected between the third and the twelfth day of oviposition. Seven to ten days old larvae were submitted to the acaricide laboratory test, in ten replications, by their immersion in eight dilutions of commercial acaricides (amitraz or cypermethrin), for 30 seconds; for each replication and commercial product, a control group was immersed in distilled water. Results were evaluated 24 hours after each treatment by counting the number of live and dead larvae. The lethal dose (LD₅₀) was obtained from a regression curve by the "Sigma Plot" program. The proposed acaricide laboratory test procedures by larvae immersion offered promising results for the evaluation of acaricides, proving useful for the calculation of the mean LD₅₀ for cypermethrin and amitraz.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cypermethrin. Amitraz. Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Seqüência da técnica de imersão de larvas de <i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	24
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Diluições de Cipermetrina (0,015%) e Amitraz (0,025%) utilizadas no teste de imersão com larvas.....	23
Tabela 2-	Percentagens de eficácia da Cipermetrina (0,015%) e do Amitraz (0,025%) em 20 propriedades rurais no Planalto Catarinense coletadas por conveniência no período de janeiro de 2004 a maio de 2006.....	25
Tabela 3-	Percentagens de eficácia da Cipermetrina (0,015%) e do Amitraz (0,025%) em 20 propriedades rurais no Planalto Catarinense derivadas da demanda para o diagnóstico de resistência no período de janeiro de 2004 a maio de 2006.....	26
Tabela 4-	Percentagens de eficácia da Cipermetrina (0,015%) e do Amitraz (0,025%) nas propriedades rurais no Planalto Catarinense no período de agosto de 1997 a dezembro de 2001.....	28
Tabela 5-	Resultado dos percentuais de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , no teste de imersão, utilizando acaricida a base de cipermetrina e DL ₅₀	31
Tabela 6-	Média da eficácia da cipermetrina em larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e da DL ₅₀ , desvio-padrão e erro padrão, das repetições nas respectivas concentrações do acaricida.....	31
Tabela 7-	Resultado dos percentuais de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , no teste de imersão, utilizando acaricida a base de amitraz e DL ₅₀	33

Tabela 8- Média da eficácia do amitraz em larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e da DL ₅₀ , desvio-padrão e erro padrão, das repetições nas respectivas concentrações do acaricida.....	33
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1 REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1 RESISTÊNCIA	13
1.2 AVALIAÇÃO DE CARRAPATICIDAS POR MEIO DE TESTES DE IMERSÃO COM LARVAS	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 EXPERIMENTO I – SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO <i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus microplus</i>) À CIPERMETRINA E AMITRAZ, POR MEIO DO TESTE DE IMERSÃO DE TELEÓGINAS, NO PLANALTO CATARINENSE	20
2.2 EXPERIMENTO II – TESTE CARRAPATICIDA POR IMERSÃO DE LARVAS DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : AVALIAÇÃO EM CIPERMETRINA E AMITRAZ.	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 EXPERIMENTO I – SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO <i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus microplus</i>) À CIPERMETRINA E AMITRAZ, POR MEIO DO TESTE DE IMERSÃO DE TELEÓGINAS, NO PLANALTO CATARINENSE	25
3.2 EXPERIMENTO II – TESTE CARRAPATICIDA POR IMERSÃO DE LARVAS DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : AVALIAÇÃO EM CIPERMETRINA E AMITRAZ.	29
CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um dos principais ectoparasitos dos bovinos, ocasionando prejuízos, principalmente pela espoliação sanguínea, que interfere no ganho de peso, e pela transmissão de *Babesia* spp. No Brasil, este carrapato é considerado um dos maiores entraves à pecuária bovina. Estima-se que os prejuízos causados por este ácaro e pelas doenças por ele transmitidas, estão em torno de dois bilhões de dólares anuais. É um parasito temporário e obrigatório dos bovinos, distribuído geograficamente entre os paralelos 32º Norte e 32º Sul, provavelmente porque em temperaturas médias inferiores a 15°C, por um período de aproximadamente seis meses reduz a postura e torna os ovos inférteis. Em Santa Catarina está presente nos bovinos em todo o território.

O método de controle por meio do uso de carrapaticidas ainda é o mais utilizado, embora o sucesso seja limitado, pelo uso inadequado. Além disto resulta em alto custo com a aquisição dos produtos, instalações, mão-de-obra e emergência de cepas resistentes. Devido às diversas implicações do uso de acaricidas, criou-se a necessidade de desenvolver e introduzir métodos auxiliares para o controle do *R. (B.) microplus*. Entre estes se incluem o deferimento de pastagens, o controle biológico por meio de utilização de predadores naturais, o uso de espécies parasitos como bactérias ou fungos, a utilização de raças resistentes e, atualmente, o uso de vacinas.

O controle por meio de vacinas contra o *R. (B.) microplus* tem sido muito estudado, no entanto estes imunógenos não asseguram um grau de proteção eficaz ao hospedeiro, para serem utilizadas sem o uso concomitante de produtos químicos.

O *R. (B.) microplus* está adaptado ao seu hospedeiro natural, o *Bos taurus*. A criação de raças resistentes é umas das alternativas para seu controle. No entanto, no Brasil, a prática de aumentar a participação de sangue europeu (*Bos*

indicus) no rebanho associado ao uso indiscriminado e frequente dos produtos carrapaticidas tem favorecido o surgimento de diversas cepas resistentes.

O controle do carrapato *R. (B.) microplus* é considerado ainda ineficiente, devido, principalmente, a falta de um monitoramento racional e eficaz no uso dos produtos químicos. Os proprietários adotam práticas de controle individuais sem critérios técnicos. Os critérios para a escolha dos produtos carrapaticidas a serem utilizados nas propriedades são com frequência, o preço e as propagandas que enfatizam a eficácia do produto. Isto tem contribuído para o estabelecimento da resistência.

É imprescindível ressaltar que o controle da *Haematobia irritans* tem aumentado o estabelecimento de cepas de *R. (B.) microplus* resistentes a determinados princípios ativos, que agem em ambos os parasitos, devido ao aumento do número anual de aplicações, em concentrações inferiores as recomendadas para o controle do carrapato. Há, portanto, a necessidade de se adotar e aprimorar o manejo integrado visando o controle do carrapato assim como a avaliação do desenvolvimento de resistência aos produtos químicos.

O uso indiscriminado de acaricidas durante anos para o controle tem favorecido o aparecimento de cepas resistentes de carrapatos *R. (B.) microplus*. Estas cepas podem ser detectadas *in vivo*, verificando o efeito dos compostos acaricidas sobre os carrapatos no hospedeiro, ou no laboratório, por meio da imersão *in vitro* de fêmeas ingurgitadas ou de larvas não alimentadas, em diferentes princípios ativos e concentrações, verificando-se posteriormente o seu efeito sobre a viabilidade dos ovos e sobrevivência dessa cepa, respectivamente.

Como conseqüências do estabelecimento da resistência a diversos grupos químicos nas propriedades, estão sendo realizadas inúmeras pesquisas na busca de métodos alternativos para o controle do carrapato, assim como, diversas metodologias para se avaliar a eficácia dos carrapaticidas. Os testes *in vitro* são fundamentais para medir a suscetibilidade do *R. (B.) microplus* e para o diagnóstico da resistência nas propriedades às bases químicas.

O desenvolvimento da técnica de imersão de larvas (TIL) em seringas adaptadas, como método para avaliar a eficácia dos produtos a base de cipermetrina e amitraz, justifica-se pelo não fornecimento pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) do papel filtro impregnado com acaricidas diluídos em óleos em diferentes concentrações de carrapaticidas e

padronizado para teste carrapaticida *in vitro* com larvas. Atualmente são preparados de forma artesanal o que dificulta a comparação de resultados.

A realização deste trabalho teve como objetivos avaliar a situação de resistência entre amostras coletadas por conveniência e amostras derivadas da demanda para o diagnóstico de resistência de *R. (B.) microplus* a cipermetrina e ao amitraz e desenvolver uma técnica de avaliação de carrapaticidas por imersão de larvas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 RESISTÊNCIA

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. Estudos indicam bases moleculares da resistência, como diferentes grupos de enzimas presentes em diferentes rotas metabólicas que compõem os mecanismos de resistência e detoxificação celular, além de mutações que podem aumentar a tolerância a um determinado composto químico (FREITAS et al., 2005). As bases moleculares envolvidas no desenvolvimento de cepas resistentes incluem o aumento da expressão de genes ou aumento da atividade de enzimas detoxificadoras, mutações em neurorreceptores e em canais de sódio.

Três famílias de proteínas são responsáveis pelo metabolismo de inseticidas entre os quais os citocromos P450, destacando-se a P450 monooxigenase responsável pela detoxificação de piretróides e organofosforados em artrópodes, inclusive em *B. microplus*; as esterases (Est) em especial as fosfotriesterases (PTEs), acetilcolinesterase (AChE) e as carboxilesterases envolvidas na detoxificação de organofosforados; a glutatona S-transferases (GSTs) isolada de larvas e de glândula salivar de *B. microplus* e, no entanto se desconhece o papel da GSTs na resistência de piretróides. As mutações em genes de canais de sódio e em receptores de octopamina são responsáveis pela resistência aos piretróides e amitraz, respectivamente (FREITAS et al., 2005).

Conforme Sabatini et al. (2001) são três as técnicas comumente utilizadas para avaliação da resistência: a Técnica do Pacote de Larvas (TPL) desenvolvido por Stone e Haydock (1962), a Técnica de Imersão Larval descrita por Shaw (1966) e a Técnica de Imersão de Adultos (TIA). Esta técnica é a mais utilizada, porém,

algumas vezes, apresenta dificuldades para obtenção de número suficiente de teleóginas para avaliar diversos carrapaticidas.

Na sub-região da Zona da Mata, em Pernambuco, Faustino et al. (1995), por meio de testes *in vitro*, avaliaram a eficácia de acaricidas utilizando fêmeas ingurgitadas. Concluíram que o *B. microplus* apresentava resistência aos carrapaticidas à base de amitraz e aos piretróides sintéticos cipermetrina e deltametrina. Santana et al. (2001) analisaram os aspectos do controle químico do *B. microplus* em bovinos de 21 propriedades, das quais 11 pertencentes à Mesoregião da Mata e 10 a Mesoregião do Agreste, Pernambuco. Na Mesoregião da Mata os acaricidas de maior utilização são os produtos à base de cipermetrina e, no Agreste apesar dos produtos piretróides, deltametrina e cipermetrina terem sido utilizados anteriormente, houve uma substituição por aqueles cujas bases correspondem a associação de diferentes grupos químicos, geralmente, com organofosforado. O método de aplicação mais comumente utilizado pelos produtores, foi o de pulverização manual, seguido pela aplicação de “pour-on” e injetáveis em ambas as áreas estudadas. Na maioria das propriedades da Mata (63,65%) e do Agreste (80%) houve referência quanto à falha na eficácia dos produtos utilizados.

Silva et al. (2004) verificaram cepas resistentes na região norte do estado de Tocantins ao amitraz, deltametrina, flumetrina e cipermetrina.

Silva et al. (2000) avaliaram a eficácia do clorfenvinfós (500ppm) e da cialotrina (45ppm) no controle do carrapato *B. microplus* na bacia leiteira de Goiânia (GO) em 22 propriedades rurais. O clorfenvinfós apresentou eficácia de 100% em todas as amostras testadas, enquanto a cialotrina apresentou eficácia de 77, 21%, medidos pela percentagem de inibição da reprodução.

No estado de São Paulo, durante o período de 2001 a 2004, foram realizados testes de imersão de teleóginas de *B. microplus* oriundas de 17 propriedades de oito municípios da Região do Vale do Paraíba, para avaliar a eficácia de carrapaticidas comerciais. Os produtos dos grupos químicos piretróides sintéticos (28,24%) e amitraz (47,19%) apresentaram baixa eficácia sendo a melhor eficácia evidenciada por produtos da associação entre piretróides sintéticos com organofosforados (88,64%) (PEREIRA, 2006).

Leite (1988) relatou caso de resistência a piretróides no estado do Rio de Janeiro. Gonçalves et al. (2004), nas regiões Noroeste e Centro Sul do estado

avaliaram a sensibilidade das teleóginas frente aos produtos químicos, verificando uma variação da mesma, sugerindo a presença de cepas resistentes para os seguintes carrapaticidas: diclorvos/clorpirifós, amitraz, deltametrina e triclorfon/coumafós/cyfluthrim.

Souza et al. (2003) avaliaram a eficácia dos acaricidas clorfenvinfós/diclorofenil (0,05%/0,015%), cipermetrina (0,015%), amitraz (0,025%), deltametrina (0,0025%), alfametrina (0,05%), cipermetrina/clorfenvinfós (0,0625%/0,0345%) e triclorfon/coumafós/cyfluthrin (0,388%/0,005%/0,005%) em propriedades rurais da região Centro Sul do Paraná. Das 17 propriedades analisadas, 70,59% apresentaram problemas de resistência a pelo menos um dos carrapaticidas testados. Com relação aos piretróides cipermetrina, deltametrina e alfametrina foi verificado o maior número de propriedades com resistência (53,3%, 18,75% e 18,75, respectivamente). A eficácia ao amitraz variou de 97,49% a 100%, exceto em uma propriedade em que a eficácia foi de 61,17% o que sugere a ocorrência de resistência.

No Brasil o primeiro relato de resistência do *B. microplus* aos arsenicais, ocorreu no Rio Grande do Sul (FREIRE, 1953). Nesse mesmo Estado, estirpes de carrapatos resistentes aos organofosforados foram relatadas por Laranja et al. (1974) e aos piretróides por Alves Branco et al. (1992) e Martins et al. (1995). Alves Branco e Pinheiro (1989) observaram um alto potencial de resistência do *B. microplus* às bases químicas piretróides e organofosforados. Vieira e Tuerlinck (1997) ratificaram a resistência ao amitraz e aos piretróides sintéticos cipermetrina e deltametrina.

No Planalto Catarinense, Souza et al. (1984) observaram inibição de postura inferior a 74% para todos os carrapaticidas fosforados testados, sugerindo a existência de resistência do *B. microplus* em duas das três propriedades estudadas. Souza et al. (1999), verificaram que o amitraz apresentou eficácia superior a 90% em todas as propriedades. Eficácia inferior a 90% foi verificado em 60%, 46,67%, 13,34% e 20% das propriedades, para os carrapaticidas coumafós, deltametrina, cipermetrina/clorfenvinfós e alfametrina, respectivamente, o que indica o desenvolvimento de resistência do *B. microplus* a estes produtos.

Os produtores constatarem o problema de falhas do carrapaticidas ou resistência do *B. microplus* pela presença de ínstares sobre os animais após o tratamento.

O comportamento das diferentes estirpes frente aos diferentes produtos, pode ser aferido usando-se testes *in vivo* através do banho do animal parasitado ou *in vitro* utilizando principalmente telóginas em condições de laboratório.

A avaliação *in vivo* da ação de acaricidas em *B. microplus* foi descrita baseando-se na contagem de teleóginas de 4,5 a 8 mm de comprimento, em bovinos tratados e não tratados. O método foi usado para comparar a eficiência dos diferentes meios de aplicação (WHARTON et al., 1970).

Conforme Amaral (1993) fêmeas ingurgitadas e larvas não alimentadas são dois ínstares de *B. microplus* utilizados em provas *in vitro*, na avaliação de carrapaticidas para bovinos. O teste mais comum é o de imersão de teleóginas numa formulação líquida do produto, sendo que larvas também podem ser submetidas às provas de imersão, ou em envelopes impregnados com o ixodicida.

O tempo mínimo de imersão de cinco minutos de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* em testes de avaliação de resistência *in vitro* com o acaricida amitraz, na concentração eficaz de 50% (CE₅₀), foi estabelecido utilizando a cepa Mozo, considerada cepa padrão devido sua suscetibilidade aos acaricidas em uso (OLIVEIRA et al., 2000). As provas de laboratório são indicativas da eficácia de um produto, práticas e seguras para o diagnóstico de resistência.

1.2 AVALIAÇÃO DE CARRAPATICIDAS POR MEIO DE TESTES DE IMERSÃO COM LARVAS

Sabatini et al. (2001) citaram o Teste de Imersão de Larvas (TIL) (SHAW, 1966) e o Teste do Pacote de Larvas (TPL) (STONE E HAYDOCK, 1962) adotado pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) (1984) como métodos utilizados para detecção da resistência.

Stone e Haydock (1962) desenvolveram um método para testar a suscetibilidade das larvas de *B. microplus* aos acaricidas, no qual são colocadas larvas em envelopes de papel filtro previamente impregnados com acaricidas diluídos em óleos em diferentes concentrações. O envelope com formato retangular, apresenta três bordos livres os quais são fechados por meio de “clips”, sendo a

leitura realizada após 24 horas. Para realização deste método, tem-se como vantagem a facilidade de obtenção dos ínstares, todavia, o não fornecimento de papéis impregnados com os carrapaticidas pela FAO, ou por outras instituições, dificulta a padronização para comparação dos resultados entre diferentes autores.

Miller et al. (2002) descreveram uma modificação da técnica do teste dos envelopes preparados com papéis impregnados com acaricidas (TPL) para quantificar a suscetibilidade do *B. microplus* ao amitraz. O método desenvolvido por Stone e Haydock (1962) não quantifica a suscetibilidade dos carrapatos ao amitraz, porque nenhuma relação entre dose e mortalidade das larvas é produzida.

Ducornez et al. (2005) relataram a resistência em duas populações de carrapato *B. microplus* ao amitraz utilizando o Teste do Pacote de Larvas modificado (TPL), na Escócia. A aplicação de acaricidas é um método de controle comumente utilizado para o controle do carrapato bovino na Escócia. Os produtos a base de deltametrina eram utilizados em 46% e o amitraz em 54% das propriedades que apresentaram problemas de resistência a deltametrina. Um total de 29 propriedades foram analisadas, no entanto para 11 populações de carrapato os testes não foram conduzidos devido a insuficiência do número de larvas, alta mortalidade do controle ou nenhuma relação entre a dose utilizada e a mortalidade das larvas foi observado. Os valores das concentrações letais 50 e 90% foram estimados para 18 populações, das quais seis foram consideradas suscetíveis e duas resistentes ao amitraz (cepas *Gadji* e *Néty*).

Testes com larvas foram realizados utilizando o Teste do Pacote de Larvas (TPL) fornecido pela FAO para caracterizar duas cepas suscetíveis, Mozo e Salta, como padrões de referência para testes de diagnóstico de resistência. Os acaricidas testados foram cipermetrina, deltametrina, cialotrina, flumetrin, coumafós e diazinon. Ambas as cepas foram consideradas adequadas para o uso como padrões de referência. Os valores da concentração letal 50% da cepa de campo para todos os carrapaticidas testados foram superiores aos das duas cepas susceptíveis e os dados encontrados para o fator de resistência sugerem a ocorrência de cepas resistentes (VIEIRA-BRESSAN et al., 1999).

Souza (1979) estudou a suscetibilidade dos ínstares de *B. microplus* ao ethion, amitraz e arsenito de sódio, e concluiu que a técnica de imersão permite quantificar a suscetibilidade dos ínstares parasitários de *B. microplus* aos carrapaticidas, com exceção das larvas parasitas e das ninfas.

Sabatini et al. (2001) realizaram testes laboratoriais com larvas e teleóginas de *B. microplus* utilizando a Técnica do Pacote de Larvas (TPL), Teste de Imersão de Larvas (TIL) modificado e o Teste de Imersão de Teleóginas (TIA) com princípio ativo puro e formulações comerciais de lactonas macrocíclicas. Foram determinadas as concentrações letais 50 e 99%, assim como a dose discriminante (DD) que poderá ser utilizada no diagnóstico de resistência a lactonas macrocíclicas de cepas Australianas de *B. microplus*. Uma alta sensibilidade do Teste de Imersão de Larvas modificado (TIL) foi percebida, mas outros testes deveriam ser realizados com outras populações de carrapatos.

Conforme o autor, a toxicidade das lactonas macrocíclicas é superior no Teste de Imersão de Larvas (TIL) quando comparado ao Teste do Pacote de Larvas (TPL). Não foram realizadas todas as comparações entre os três testes e combinações de diferentes lactonas macrocíclicas, devido a dificuldade de adquirir o princípio ativo puro e particularmente a pouca solubilidade de alguns acaricidas comerciais.

Klafke et al. (2006) relataram o primeiro caso de resistência a ivermectina detectado por testes *in vitro*. Testes de Imersão de Larvas (TIL) foram realizados utilizando uma formulação comercial de ivermectina a 1% com larvas de duas populações de campo de *B. microplus* (Barra Alegre e São Francisco) e uma cepa referência suscetível (Porto Alegre). A população de carrapatos Barra Alegre foi escolhida devido ao histórico de utilização de produtos à base de ivermectina durante cinco anos e as dificuldades no controle. A cepa São Francisco não possuía histórico de aplicação de lactonas macrocíclicas. As concentrações letais 50 e 99%, o fator de resistência em relação a cepa suscetível (POA) e a dose discriminante foram calculadas. A concentração letal 50% da cepa de carrapato Barra Alegre foi superior ao valor encontrado para a cepa suscetível e o fator de resistência (CI 95%) de 3,78 (3,47- 4,12), o que sugere que esta população seja resistente a ivermectina. A cepa São Francisco não apresentou nenhuma diferença na resposta a ivermectina em relação a cepa Porto Alegre, o que sugere que esta população seja suscetível a ivermectina.

De acordo com Sabatini et al. (2001) e Klafke et al. (2006) o Teste de Imersão de Larvas (TIL) não é recomendado pela FAO como teste de diagnóstico de resistência, no entanto Klafke et al. (2006) afirmam que o Teste de Imersão de Larvas (TIL) é capaz de fazer a diferenciação de cepas resistentes e suscetíveis. Os dados encontrados pelos autores mostram que o teste é sensível e pode ser

utilizado para o diagnóstico de resistência de populações de *B. microplus* à ivermectina.

Conforme Vargas et al. (2003) o monitoramento das populações de carrapatos, com relação aos carrapaticidas em uso por meio de testes em *in vitro*, é um procedimento essencial na detecção precoce de problemas de resistência tendo em vista que o uso de acaricidas ainda se constitui no principal instrumento de controle do carrapato bovino *B. microplus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXPERIMENTO I – SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* À CIPERMETRINA E AMITRAZ, POR MEIO DO TESTE DE IMERSÃO DE TELEÓGINAS, NO PLANALTO CATARINENSE

No período de janeiro de 2004 a maio de 2006, foram coletadas, manualmente, teleóginas, diretamente de bovinos de diversas raças e graus de sangue, naturalmente infestados, em 20 propriedades rurais do Planalto Catarinense, sendo que destas, algumas foram de bovinos destinados ao abate no frigorífico (amostras por conveniência) e também foram avaliadas teleóginas de 20 propriedades da demanda para o diagnóstico de resistência.

Quando o número de teleóginas coletado nas propriedades rurais ou no frigorífico era insuficiente para realização do teste, a cepa foi reproduzida por infestações em bovinos estábulados, para posterior realização dos testes de imersão de teleóginas.

Analisou-se também os resultados dos testes de imersão de teleóginas realizados no Laboratório, no período de agosto de 1997 a dezembro de 2001, nos quais foram utilizados cipermetrina e amitraz em amostras coletadas por conveniência e naquelas solicitadas por produtores rurais.

As teleóginas de *R. (B.) microplus* coletadas foram acondicionadas em frascos com tampa, identificados e que permitiam a aeração para o transporte ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, do Centro de Ciências Agroveterinárias-CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, onde num período inferior a 24 horas, foram realizados testes *in vitro* de imersão de teleóginas em acaricidas a base de cipermetrina (0,015%) e amitraz (0,025%).

As teleóginas foram examinadas, selecionadas as de melhor vitalidade e pesadas para formar três grupos com 10, espécimes com aproximadamente o mesmo peso. Cada um dos grupos foi imerso, respectivamente, durante cinco minutos em cipermetrina, amitraz, nas diluições citadas e em água destilada

(controle). Após a imersão foram secados em papel absorvente, colocadas em placas de Petri, devidamente identificadas e mantidas em câmara climatizada do tipo BOD, regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80 \pm 10\%$ e escotofase, por 18 dias.

Ao final deste período foi mensurada a massa de ovos de cada grupo em balança de precisão de 0,001g. e acondicionada em tubos de ensaio, levada a estufa nas condições anteriormente descritas, para avaliar os índices de eclodibilidade.

Foi calculado o índice de Reprodução (IR) pela equação:

$$\text{IR} = \frac{\text{Peso de ovos} \times \% \text{ de eclosão} \times 20.000^*}{\text{Peso das teleóginas}}$$

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

A percentagem de eficácia pela seguinte equação:

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

O critério utilizado para considerar o carrapaticida eficaz foi o valor mínimo de 95%, conforme legislação vigente para obtenção do registro de acaricidas junto ao Ministério da Agricultura no Brasil (BRASIL, 1990).

2.2 EXPERIMENTO II – TESTE CARRAPATICIDA POR IMERSÃO DE LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: AVALIAÇÃO EM CIPERMETRINA E AMITRAZ.

Foram utilizadas 30 teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* coletadas de bovinos de uma propriedade rural do município de Lages, as quais foram colocadas em placas de Petri em câmara climatizada a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ de umidade relativa para realizarem postura. Para obtenção das larvas foram utilizadas as posturas do terceiro ao décimo segundo dia e acondicionados 10mg por seringa, descartável de 5ml, previamente preparadas,

cortando a extremidade próxima do canhão e feito um orifício de aproximadamente 0,1mm de diâmetro, na metade desta. O êmbolo foi posicionado de forma a fechar o orifício e a extremidade cortada foi fechada com tecido de trama fina, fixado com elástico ortodôntico de diâmetro de 7,94mm e mantida em câmara climatizada até a eclosão das larvas.

Larvas com idade entre sete e dez dias foram submetidas à imersão em oito diluições de produtos carrapaticidas comerciais à base de amitraz e cipermetrina como expresso na Tabela 1. Foram realizados dez testes, sendo mantido um grupo controle para cada repetição e produto, o qual foi imerso em água destilada. Cada grupo de larvas foi imerso nas respectivas diluições, durante 30 segundos e um grupo em água destilada, posicionando o êmbolo posterior ao orifício para permitir a entrada de ar e conseqüentemente o preenchimento total da seringa com produto a testar. Para cada teste foram realizadas duas repetições.

A leitura foi realizada 24 horas após o tratamento por meio da contagem de larvas vivas e mortas.

O cálculo da dose letal $_{50}$ foi realizado a partir da linha de regressão, utilizando o programa "Sigma plot".

O método estatístico utilizado para avaliação dos resultados foi análise descritiva dos dados.

A seqüência da técnica de imersão de larvas está expressa na Figura 1.

Tabela 1 – Diluições de Cipermetrina (0,015%) e Amitraz (0,025%) utilizadas no teste de imersão com larvas.

Cipermetrina			Amitraz		
ppm	μl	ml H ₂ O	ppm	μl	ml H ₂ O
150	100	100	250	200	100
75	50	100	125	100	100
37,5	25	100	62,5	50	100
18,75	12,5	100	31,25	25	100
9,37	6,2	100	15,62	12,5	100
4,68	3,1	100	7,81	6,2	100
2,34	1,5	100	3,90	3,1	100
1,17	1,5	200	1,95	1,5	100
0	0	100	0	0	100



Figura 1 – Seqüência da técnica de imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

- 1 – Postura de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
- 2 – Seringas descartáveis preparadas para o teste de imersão de larvas
- 3 – Teste de imersão com larvas
- 4 – Imersão das seringas em diluições de produtos carrapaticidas
- 5 – Retirada do excesso de produto em papel absorvente
- 6 – Seringas após a imersão em diluições de produtos carrapaticidas
- 7 – Leitura do teste de imersão de larvas

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXPERIMENTO I – SITUAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* À CIPERMETRINA E AMITRAZ, POR MEIO DO TESTE DE IMERSÃO DE TELEÓGINAS, NO PLANALTO CATARINENSE

Na Tabela 2 estão expressas as percentagens de eficácia dos acaricidas à base de cipermetrina (0,015%) e de amitraz (0,025%) das amostras de teleóginas, coletadas em 20 propriedades rurais (amostras por conveniência) e na Tabela 3 a percentagem de eficácia das amostras derivadas da demanda para o diagnóstico de resistência em 20 propriedades do Planalto Catarinense.

Tabela 2 – Percentagens de eficácia da Cipermetrina (0,015%) e do Amitraz (0,025%) em 20 propriedades rurais no Planalto Catarinense coletadas por conveniência no período de janeiro de 2004 a maio de 2006.

Eficácia (%)	Cipermetrina		Amitraz	
	Nº de propriedades	(%)	Nº de propriedades	(%)
95-100	2	10	19	95
85-94	5	25	1	5
75-84	0	0	0	0
65-74	1	5	0	0
55-64	3	15	0	0
<55	9	45	0	0
Total	20	100	20	100

Tabela 3 – Percentagens de eficácia da Cipermetrina (0,015%) e do Amitraz (0,025%) em 20 propriedades rurais no Planalto Catarinense derivadas da demanda para o diagnóstico de resistência no período de janeiro de 2004 a maio de 2006.

Eficácia (%)	Cipermetrina		Amitraz	
	Nº de propriedades	(%)	Nº de propriedades	(%)
95-100	1	5	18	90
85-94	2	10	0	0
75-84	0	0	0	0
65-74	2	10	0	0
55-64	1	5	0	0
<55	14	70	2	10
Total	20	100	20	100

Na Tabela 2, observa-se que das 20 propriedades, duas (10%) apresentaram eficácia entre 95-100% para cipermetrina, cinco (25%) entre 85-94% e 13 (65%) inferior a 75%. Estes resultados são sugestivos da ocorrência de resistência em 90% das propriedades. Foram realizados testes *in vitro* de imersão de teleóginas de bovinos em sete propriedades no ano de 2001, sendo que quatro (57,14%) apresentaram eficácia entre 95-100%, duas (28,57%) entre 85-94% e apenas uma (14,28%) propriedade apresentou eficácia entre 55-64% (Tabela 4). Observou-se um aumento no número de propriedades com carrapatos resistentes a cipermetrina. Este fato pode estar relacionado ao uso anterior do produto e ao manejo inadequado na propriedade.

A baixa eficácia encontrada para a cipermetrina em 90% das propriedades está de acordo com os resultados obtidos por Mendes et al. (2001). A eficácia de produtos à base de piretróides estimada por estes autores foi inferior a 50% em todas as regiões avaliadas do estado de São Paulo.

Com relação ao amitraz 19 (95%) das propriedades apresentaram eficácia entre 95-100% e uma propriedade entre 85-94%. Na Tabela 4 estão expressos os

resultados dos testes *in vitro* de imersão de teleóginas em 16 propriedades rurais realizados no período de agosto de 1997 a dezembro de 2001, sendo que 100% das propriedades apresentaram eficácia entre 95-100% sugerindo que não houve o aparecimento carrapatos resistentes ao amitraz.

Os resultados encontrados apresentam similaridade aos obtidos por Heimerdinger et al. (2006), segundo o qual a eficácia média para o amitraz no controle do *B. microplus* foi de 97,93% em bovinos de raça holandeses naturalmente infestados. No entanto, diferem dos resultados encontrados por Campos Júnior e Oliveira (2005), no qual das 30 amostras testadas de carrapatos *B. microplus* oriundos de fazendas da região do município de Ilhéus (BA), apenas 6,7% das propriedades alcançaram a eficiência legalmente aceitável para o amitraz. Estes resultados se devem ao uso anterior do acaricida, ao manejo e ao índice de favorabilidade para desenvolvimento do *R. (B.) microplus* nestas propriedades.

Os resultados da análise da eficácia das amostras derivadas da demanda para o diagnóstico de resistência estão expressos na Tabela 3. Das 20 propriedades apenas uma (5%) apresentou eficácia entre 95-100% para cipermetrina, duas (10%) entre 85-94% e 17 (85%) inferior a 75%. Estes resultados sugerem a ocorrência de resistência ao acaricida cipermetrina em 95% das propriedades. Com relação ao amitraz 18 (90%) propriedades apresentaram eficácia entre 95-100% e duas (10%) inferior a 55%. Quando se comparam as tabelas 2 com a 3, verifica-se que os produtores solicitaram testes carrapaticidas tardiamente, ou seja, quando a resistência já estava completamente instalada. Das amostras analisadas no período de agosto de 1997 a dezembro de 2001 (Tabela 4), num total de sete propriedades, seis (85,71%) apresentaram eficácia entre 95-100% e uma (14,28%) entre 75-84% para o amitraz. Estes resultados obtidos sugerem que não houve um aumento no aparecimento de cepas resistentes aos produtos à base de amitraz.

Tabela 4 – Percentagens de eficácia da Cipermetrina (0,015%) e do Amitraz (0,025%) nas propriedades rurais no Planalto Catarinense no período de agosto de 1997 a dezembro de 2001.

Eficácia (%)	Amostras por conveniência				Amostras da demanda	
	Amitraz		Cipermetrina		Amitraz	
	Nº de prop.	(%)	Nº de prop.	(%)	Nº de prop.	(%)
95-100	16	100	4	57,14	6	85,71
85-94	0	0	2	28,57	0	0
75-84	0	0	0	0	1	14,28
65-74	0	0	0	0	0	0
55-64	0	0	1	14,28	0	0
<55	0	0	0	0	0	0
Total	16	100	7	100	7	100

Prop. = propriedades

Quando se comparam os resultados expressos nas Tabelas 2 e 3 das amostras coletadas por conveniência com as derivadas da demanda para o diagnóstico de resistência, pode-se verificar que das 20 propriedades coletadas por conveniência testadas para cipermetrina, nove (45%) apresentaram eficácia inferior a 55%. Com relação às amostras originadas da demanda, 14 (70%) apresentaram eficácia inferior a 55%. Das amostras coletadas por conveniência testadas para o amitraz, apenas uma (5%) apresentou eficácia entre 85-94%, no entanto nas amostras originadas da demanda duas propriedades (10%) apresentaram eficácia inferior a 55% o que sugere a ocorrência de resistência nessas propriedades.

Com base nos resultados encontrados pode-se verificar que 90% das amostras coletadas por conveniência e 95% daquelas originadas da demanda para o diagnóstico testadas para cipermetrina apresentaram eficácia inferior a 95%; e para o amitraz, 5% e 10% das amostras coletadas por conveniência e originadas da demanda para o diagnóstico, respectivamente, apresentaram eficácia inferior a 95%. Estes resultados ratificam a necessidade de um diagnóstico precoce da resistência, uma vez que um monitoramento da mesma facilitará o controle do *R. (B.) microplus*.

3.2 EXPERIMENTO II – TESTE CARRAPATICIDA POR IMERSÃO DE LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: AVALIAÇÃO EM CIPERMETRINA E AMITRAZ.

Novas metodologias para avaliação da eficácia de acaricidas têm sido publicadas. Exemplos destas novas metodologias são a modificação da Técnica do Pacote de Larvas (LPT), publicada por Miller et al. (2002), para medir a suscetibilidade do *B. microplus* ao amitraz e a técnica descrita por Barci e Nogueira (2006), o qual consiste de uma adaptação dos testes de Shaw (1966) e de Fouk e Mathisse (1964). Nesta metodologia descrita por Barci e Nogueira (2006) podem ser feitas avaliações diárias da mortalidade total ou acumulada de larvas de um mesmo tratamento com produtos químicos e extratos vegetais.

Na técnica desenvolvida por Barci e Nogueira (2006) as larvas devem ter idade entre 15 e 18 dias; podendo ser realizadas as avaliações durante, pelo menos, 20 dias sem que ocorra alteração significativa nos percentuais de mortalidade do grupo controle.

O tempo de imersão utilizado de 30 segundos para os testes de imersão com larvas foi superior aquele utilizado por Souza (1979) para estudar a suscetibilidade dos ínstares de *B. microplus* ao ethion, amitraz e arsenito de sódio. As larvas são mais suscetíveis frente aos acaricidas quando comparadas com as teleóginas. Os resultados dos testes de imersão com larvas de carrapatos são influenciados pelo tempo de imersão com larvas e o de leitura na determinação da mortalidade (SHAW, 1966).

A leitura do teste foi realizada 24 horas após o tratamento com a contagem de larvas vivas ou mortas, considerando vivas somente as larvas com capacidade locomotora estando de acordo com Klafke (2006). No entanto, Barci e Nogueira (2006) estabeleceram um padrão de diferenciação para as larvas vivas ou mortas. Visualmente, as larvas mortas apresentavam-se encarquilhadas, opacas e aderidas à parede do vidro; as vivas independentes de estarem ou não em locomoção, mostram-se brilhantes e não retorcidas.

Nas Tabelas 5 e 7 estão expressos os resultados dos percentuais de mortalidade das larvas no teste de imersão nos acaricidas cipermetrina e amitraz,

respectivamente, e a dose letal $_{50}$ calculada a partir da linha de regressão. A análise descritiva dos dados está expressa nas Tabelas 6 e 8.

Na Tabela 5, pode-se verificar que na concentração de 37,5ppm, repetição um o percentual de mortalidade das larvas no teste de imersão foi de 63,7% e na nove foi de 100% o que também se pode verificar na concentração 4,68, onde na repetição um o percentual de mortalidade foi de 38,9% e na sete foi de 94,3%. Na concentração 1,17ppm verifica-se que na repetição três o percentual de mortalidade foi de 45,2% e na repetição sete a mortalidade foi de 3,7%. Observou-se uma variabilidade entre os dados nessas concentrações. Na análise descritiva dos dados, observa-se que o valor do desvio padrão da média aumentou nessas concentrações como está expresso na Tabela 6.

As variações destes resultados podem estar relacionadas à idade das larvas em cada repetição, a utilização de formulações comerciais para ambos os princípios ativos na execução da técnica e ao erro experimental. Há, portanto a necessidade da realização de outros testes com princípio ativo puro para a comparação dos resultados.

Nas Tabelas 5 e 7, pode-se observar que à medida que a concentração dos carrapaticidas testados diminui, ocorre uma queda da mortalidade das larvas. Souza (1979) realizou teste de imersão de larvas em ethion (0,12%), amitraz (0,025%) e arsenito de sódio (0,125%) e verificou que os carrapaticidas foram eficazes em larvas com exceção do arsenito de sódio. No entanto o autor não avaliou concentrações inferiores para determinar a DL_{50} .

A média da dose letal $_{50}$ para cipermetrina expressa na Tabela 6 foi de 2,99ppm e o erro padrão de 0,36, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5 – Resultado dos percentuais de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, no teste de imersão, utilizando acaricida a base de cipermetrina e DL₅₀.

Repetições	Concentrações (ppm)									
	Controle	150	75	37,5	18,75	9,37	4,68	2,34	1,17	DL ₅₀
1	0	96	93,7	63,7	83,5	76	38,9	44,4	34,2	3,1
2	0	95,1	87,1	89,6	68,5	70,5	47,4	21,1	22,9	5,3
3	0	89,7	95,3	87,3	94,9	92,6	79,4	45,2	45,2	1,2
4	0	99,4	98,8	96,5	93,7	87,3	79,0	24,1	43,1	2,6
5	0	96,3	95,8	92,0	86,2	76,4	61,8	37,8	36,7	2,6
6	0	97,3	93,5	89,7	86,8	74,3	51,8	46,5	37,3	2,6
7	0	96,6	93,7	86,1	80,3	94,2	94,3	27,1	3,7	3,4
8	0	95,6	90,6	84,8	96,4	91,7	38,3	46,2	4,9	4,4
9	0	98,9	99,5	100	95,8	98,9	55,9	35,2	23,7	2,4
10	0	97,9	100	97,1	97,4	98,2	67,1	27,5	24,5	2,4

Tabela 6 - Média da eficácia da cipermetrina em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e da DL₅₀, desvio-padrão e erro padrão, das repetições nas respectivas concentrações do acaricida.

Concentrações	Média	Desvio-padrão	Erro padrão
150	96,27	2,70	0,85
75	94,81	4,04	1,27
37,5	88,67	10,12	3,20
18,75	88,35	9,23	2,91
9,37	86,01	10,68	3,37
4,68	61,40	18,55	5,86
2,34	35,54	9,90	3,13
1,17	27,64	14,53	4,59
DL ₅₀	2,99	1,16	0,36

A variabilidade dos resultados obtidos nas repetições no teste de imersão com cipermetrina também ocorreu com o amitraz como apresentado na Tabela 7. Na concentração 62,5ppm, repetição três, o percentual de mortalidade foi de 93,9% e na nove foi de 16,2%, o que também se verificou na concentração 7,81ppm onde, na repetição dois, o percentual de mortalidade foi de 88,1% e na dez não houve mortalidade das larvas. Na análise descritiva dos dados, observou-se que o valor do desvio padrão da média aumentou nessas concentrações como expressa a Tabela

8. A média da dose letal₅₀ para o amitraz expressa na Tabela 8 foi de 17,22ppm e o erro padrão de 4,28, com intervalo de confiança de 95%.

A média da concentração letal 50% estimada de 0,001722 para o amitraz, por meio da Técnica de Imersão de Larvas desenvolvida é superior aos valores estimados por Vargas et al. (2003); que avaliaram uma cepa de campo de *B. microplus* resistente ao amitraz (“Santa Luiza”), proveniente do município de Alegrete, RS. Foram realizados bioensaios *in vitro*, mediante a Técnica de Imersão de Larvas (TIL), para determinação da concentração letal 50% da cepa “Santa Luiza”. A concentração letal 50% estimada para a geração F₁ da cepa foi de 0,00004% e para a geração F₇ foi de 0,00023%. A cepa suscetível, utilizada como cepa de referência foi obtida no estado Guerrero, México. O valor da concentração letal 50% encontrado para esta cepa foi de 0,00001%.

Durconez et al. (2005) estimaram os valores de concentrações letais 50 e 90% para 18 populações de *B. microplus* por meio da Técnica do Pacote de Larvas (TPL) modificada para o amitraz, sendo que seis foram consideradas suscetíveis e duas resistentes. A concentração letal 90% estimada variou de 0,0054 a 0,024% com um valor médio de 0,013% para as populações suscetíveis, com intervalo de confiança de 95% . Nas populações resistentes ao amitraz, cepas *Gadji* e *Néty*, as concentrações letais 50% estimadas foram de 0,057 e 0,017%, respectivamente. Estes valores são superiores àqueles encontrados para as cepas consideradas suscetíveis e superiores a média da concentração letal 50% estimada para o amitraz de 0,001722 encontrados neste trabalho por meio da Técnica de Imersão de Larvas. As diferenças encontradas entre os autores provavelmente estão relacionadas as metodologias utilizadas e a variabilidade entre as cepas.

Tabela 7 – Resultado dos percentuais de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, no teste de imersão, utilizando acaricida a base de amitraz e DL₅₀.

Repetições	Concentrações (ppm)									
	Controle	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	DL50
1	0	90,1	82,8	76,3	93,5	43,8	46,5	45,2	8,1	10,1
2	0	83,7	92,9	76,9	64,3	64,4	88,1	41,4	28,7	3,5
3	0	89,6	93,4	93,9	63,5	58,3	48,9	41,6	34,5	6,2
4	0	91,4	77,1	81,7	76,9	90,9	44,0	47,9	40,2	3,2
5	0	88,3	81,9	58,9	48,9	39,2	35,3	40,7	24,8	16,5
6	0	93,7	81,6	61,8	48,7	42,6	39,1	32,8	16,1	16,5
7	0	73,8	52,9	65,8	63,6	62,4	28,8	25,0	15,6	24,3
8	0	76,2	68,1	68,4	67,0	56,4	17,3	27,9	19,0	22,0
9	0	72,0	57,7	16,2	61,4	38,3	48,4	47,8	19,0	47,9
10	0	72,7	82,8	70,3	95,5	6,5	0,0	14,2	18,3	22,0

Tabela 8 - Média da eficácia do amitraz em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e da DL₅₀, desvio-padrão e erro padrão, das repetições nas respectivas concentrações do acaricida.

Concentrações	Média	Desvio-padrão	Erro padrão
250	83,16	8,60	2,72
125	77,12	13,62	4,30
62,5	67,02	20,57	6,50
31,25	68,35	16,03	5,07
15,62	50,28	22,06	6,97
7,81	39,64	23,07	7,29
3,9	36,45	11,14	3,52
1,95	22,43	9,66	03,05
DL ₅₀	17,22	13,30	4,20

CONCLUSÕES

- ◆ A resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas Cipermetrina e Amitraz é crescente no rebanho bovino do Planalto Catarinense.
- ◆ Os pecuaristas percebem tardiamente que o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tornou-se resistente ao carrapaticida utilizado.
- ◆ A metodologia proposta para o teste carrapaticida por imersão com larvas utilizando produtos à base de Cipermetrina e Amitraz apresentou resultados promissores para avaliação destes compostos.
- ◆ A metodologia descrita pode ser utilizada para calcular a média da dose letal₅₀ para os acaricidas à base de cipermetrina e amitraz.

REFERÊNCIAS

ALVES-BRANCO, F.P.J.; PINHEIRO, A.C. **Controle do *Boophilus microplus* com esquema de banhos estratégicos em bovinos Hereford**. Bagé, EMBRAPA, CNPq. Circular Técnica. 04. 1989.

ALVES-BRANCO, F.P.J.; SAPPER, M.F.M.; PINHEIRO, A.C.. Diagnóstico de resistência de *Boophilus microplus* a piretróides. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11. 1992 Gramado. **Anais...**, Gramado: SOVERGS, 1992. p. 44.

AMARAL, N. K. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 144-151, 1993.

BARCI, L.G.A.; NOGUEIRA, A.H.C. Método para avaliação de mortalidade de larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) submetidas a tratamentos com produtos carrapaticidas. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.105-109, jan./mar. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 90 de 04 de dezembro de 1989. Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários. **Diário Oficial**, 22 de jan. 1990, séc.1, col 2,1990.

CAMPOS JUNIOR, 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.

DUCORNEZ, S. et al. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Colodonia with the modified Larval Packet Test. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 385-292, 2005.

FAUSTINO, M. A.G.; PENA, E. J. M.; GURGEL, A. E. B. Eficácia "in vitro" de produtos carrapaticidas em fêmeas ingurgitadas de cepas de *Boophilus microplus* da sub-região da Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 2, p.58, set. 1995. Suplemento 1.

FREITAS DE, D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ JR, I.S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 109-117, 2005.

FREIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini,1887). **Boletim da Diretoria de Produção Animal**, v. 9, n. 17, p . 3-31, 1953.

GONÇALVES, P.C. et al. Estudo da sensibilidade de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887) a diferentes carrapaticidas, no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 303, 2004. Suplemento 1.

HEIMERDINGER, A. et al. Extrato alcoólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilu microplus* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 37-39, 2006.

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

LARANJA, R. J.; ARTECHE, C. C. P.; ARREGUI, L. A. Concentração que inibe a postura viável em 50% de três carrapaticidas organofosforados "in vitro" frente a teleóginas de uma estirpe sensível. **Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, v. 2, p. 9-14, 1974.

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.** Itaguaí. 1988. 122p (Tese de Doutorado em parasitologia veterinária – UFRRJ).

MARTINS, J.R. et al. Resistência a carrapaticidas piretróides: Diagnóstico da situação no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 47, 1995.

MENDES, M. C. et al. Bioassays for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in São Paulo State, Brazil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n.2, p. 23-27, jul./dez. 2001.

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.

OLIVEIRA, R. O. et al. Determination of the minimum immersion time of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females for in vitro resistance tests with amitraz at 50% effective concentration (EC₅₀). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 41-43, 2000.

PEREIRA, J.R. 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**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 45-48, 2006.

SABATINI, G.A. et al. Tests to determine LC₅₀ and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.1, p.53-62, feb. 2001.

SANTANA, V.L.A. et al. Diagnóstico de situação do controle químico do carrapato dos bovinos (*Boophilus microplus*) em propriedades das mesorregiões da Mata e Agreste do Estado de Pernambuco- Brasil. **Ciências Veterinárias Tropicais**, Recife-PE, V.4, n. 2 E 3, p. 281-290, maio/dez. 2001.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus – resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. **Bulletin Entomological Research**, Wallingford, v.56, n.3, p. 389-405, mar. 1966.

SILVA, M do C. L.; SOBRINHO, R. N.; LINHARES, G. F. C. Avaliação in vitro da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus*, colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião da Goiânia-Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 143-148, jul/dez. 2000.

SILVA, J. U. R. et al. Aspectos no controle do *Boophilus microplus*, indícios da resistência aos acaricidas na região norte do Tocantins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, 2004. Suplemento 1.

SOUZA, A. P. de. **Suscetibilidade dos ínstares parasitários do *Boophilus microplus* (Can., 1987) ao ethion, amitraz e arsenito de sódio**. 1979. 34f..Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1979.

SOUZA, A. P. et. al. Susceptibilidade do carrapato a carrapaticidas em diferentes propriedades no Planalto Catarinense. **Comunicado Técnico**: boletim técnico da EMPASC, Florianópolis, n. 72, 1984.

SOUZA, A.P.; BELLATO, V.; RAMOS, C.I. **Controle das principais parasitoses dos ruminantes, eqüinos e suínos, em Santa Catarina**. 1.ed. Lages: Ameríndia Artes Gráficas, 1999. 114p.

SOUZA, A. P de et al. Eficácia de carrapaticidas em rebanhos de bovinos leiteiros de municípios da região Centro Sul do Paraná. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 2. n.2, p. 131-135, jul/dez. 2003.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 3, p. 563-578, 1962.

VARGAS, M.S. et al. Avaliação *in vitro* de um cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à Amitraz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 737-742, jul/ago.2003.

VIEIRA- BRESSAN, M.C.R.; OLIVEIRA, R.O.; DOS SANTOS, A.P. Determination of LD 50 and LD99 in two susceptible strains of *Boophilus microplus* for larval resistance tests. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. V.8, n.2, p.119-126, 1999.

VIEIRA, M.I.; TUERLINCK,S. Avaliação da resistência do carrapato *Boophilus microplus* a carrapaticidas em rebanhos de corte e leite do município de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, sup.1, p.132, 1997.

WHARTON, R. H. et al. Assessment of the efficiency of acaricides and their mode of application against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.21, p985-1006, may.1970.

