

**Método para
detecção de
substâncias com
atividade repelente
sobre larvas do
carrapato
Rhipicephalus
(Boophilus)
microplus: revisão e
recomendações**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 106

Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: revisão e recomendações

Ana Carolina de Souza Chagas
Márcio Dias Rabelo

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2012

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234
13560 970, São Carlos, SP
Caixa Postal 339
Fone: (16) 3411- 5600
Fax: (16): 3361-5754
Home page: www.cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ana Rita de Araujo Nogueira
Secretária-Executiva: Simone Cristina Méo Niciura
Membros: Ane Lisy F.G. Silvestre, Maria Cristina Campanelli Brito,
Milena Ambrosio Telles, Sônia Borges de Alencar

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar
Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito
Foto da capa: Ana Carolina de Souza Chagas

1ª edição

1ª edição on-line (2012)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Chagas, Ana Carolina de Souza

Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: revisão e recomendações. [Recurso eletrônico] / Ana Carolina Souza Chagas, Márcio Dias Rabelo. — Dados eletrônicos. — São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: Word Wide Web: <<http://www.cppse.embrapa.br/sites/default/files/principal/publicacao/Documentos106.pdf>>

Título da página na Web (acesso em 30 novembro de 2012).

27p. (Documentos / Embrapa Pecuária Sudeste, 106; ISSN: 1980-6841).

1. Repelente – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – Larvas do Carrapato. I. Chagas, Ana Carolina de Souza. II. Rabelo, Márcio Dias. III. Título. IV. Série.

CDD: 636.089696

© Embrapa 2012

Autores

Ana Carolina de Souza Chagas

Bióloga, Ph.D em Medicina Veterinária Preventiva
Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São
Carlos, SP.

carolina.chagas@embrapa.br

Márcio Dias Rabelo

Mestre em Química Analítica e Ambiental, Analista
da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

marcio.rabelo@embrapa.br

Sumário

1 Introdução	7
2 Revisão de metodologias <i>in vitro</i> disponíveis e uso de solventes	9
3 Objetivo do documento técnico	13
4 Material e Métodos	13
4.1 Isolados comerciais de plantas	13
4.2 Solubilização de substâncias lipofílicas	15
4.3 Teste de repelência	16
4.4 Análise estatística	19
5 Resultados	19
6 Discussão	21
7 Conclusões	22
8 Recomendações	22
9 Agradecimentos	23
10 Referências	24

Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: revisão e recomendações

Ana Carolina de Souza Chagas

Márcio Dias Rabelo

1. Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) é um grande problema sanitário e causa grandes prejuízos à pecuária leiteira nacional. A dependência de poucas bases químicas carrapaticidas disponíveis no mercado, aliada à sua má utilização, levou à dispersão generalizada da resistência nas populações de carrapato, chegando-se ao ponto em que a maioria dos produtos comerciais não apresenta a eficácia esperada ou necessária ao controle parasitário. Dessa forma, é notório o crescimento de pesquisas que buscam detectar novas substâncias ativas sobre esse parasita, sejam elas oriundas de plantas, fungos ou outros organismos (CHAGAS et al., 2012).

A existência de metodologias adequadas na pesquisa de novos bioativos é essencial para que os diferentes modos de ação possam efetivamente ser avaliados. Como exemplos podemos citar: mortalidade da fêmea ingurgitada, redução da fertilidade da fêmea, inibição do desenvolvimento de um estágio para o outro, inibição da eclosão das larvas e, o objeto do presente estudo, atividade repelente frente às larvas do carrapato.

Para que metodologias para a detecção de substâncias com ação repelente sejam desenvolvidas, é necessário o entendimento dos fatores que influenciam o comportamento do parasita, bem como a relação parasita-hospedeiro. Além da temperatura, umidade, radiação solar, evaporação e precipitação pluvial, o sucesso do parasitismo (ou seja, o encontro do parasita com seu hospedeiro) dependerá também da quantidade e qualidade da pastagem, da presença e densidade do hospedeiro, do seu comportamento de pastejo (HARLAN; FOSTER, 1990; SONENSHINE, 1991), além da presença de predadores (CHAGAS et al., 2002). Para que a probabilidade de encontro com o hospedeiro aumente, os carrapatos sobem pela vegetação e agrupam-se para beneficiar a sobrevivência, concentrando a população em locais onde o estresse da dessecação e do ambiente adverso ficam reduzidos (SONENSHINE, 1991; HAZARI; MISRA, 1993). De acordo com Furlong et al. (2002b), as larvas que ficam na extremidade da folha estão mais expostas às condições climáticas adversas. Elas tendem, então, a migrar verticalmente logo abaixo da extremidade, ficando protegidas pela lâmina da folha que é mais larga nesse ponto. Esse comportamento evita o gasto de energia e a dessecação. Elas voltam à extremidade quando são estimuladas pela presença do hospedeiro por meio do dióxido de carbono liberado na respiração, odores (caimônios), além da sombra do hospedeiro. Elas assumem então uma postura de busca levantando o primeiro par de patas onde está presente o órgão de Haller, extremamente sensível a esses estímulos.

O geotropismo negativo das larvas é um bom indicativo para a avaliação da atividade repelente das substâncias, já que as variáveis climáticas são mais estáveis em laboratório, minimizando esse pequeno deslocamento vertical que ocorre a campo ao longo do dia. De acordo com Jaenson et al. (2005), uma substância repelente faz com que um organismo realize movimentos em direção oposta à fonte de estímulo. Como os carrapatos utilizam os odores do hospedeiro em seu comportamento de busca, algumas substâncias voláteis podem mascarar ou encobrir esses odores. A atividade de busca será então interrompida, e o ciclo parasitário será quebrado.

2. Revisão de metodologias *in vitro* disponíveis e uso de solventes*

Existem basicamente quatro tipos de testes utilizados para avaliação de substâncias ativas sobre *R. (B.) microplus*: pulverização, aplicação tópica ou injeção, impregnação de papéis de filtro e imersão. O primeiro consiste na aplicação de gotas diretamente na superfície corporal do artrópode, indicando-se como líquido carreador a acetona, que pode ser bem manejada em pequenas quantidades, é amplamente disponível e tem excelente poder como solvente. O método é criticado porque dificilmente consegue-se pulverizar uniformemente o parasita, e os compostos são aparentemente menos tóxicos nesse processo (FAO, 1987). O método de aplicação tópica foi desenvolvido por Kitaoka e Yajima (1961) e aperfeiçoado por Kitaoka e Morii (1963). Nesse método o produto é injetado dentro da fêmea ingurgitada usando-se uma micro-seringa. Determinados tipos de formulações, tais como pó em suspensão, não podem ser usadas em uma micro-seringa (AMARAL, 1993).

A utilização de papéis filtro impregnados consiste em forçar o contato do parasita com a substância teste na dose estipulada, prendendo-o na superfície interna do papel. A metodologia desenvolvida por Stone e Haydock (1962) consegue confinar larvas de *R. (B.) microplus* em papéis filtro impregnados formando um envelope vedado, com realização da leitura após 24 horas. Critica-se esse processo pelo fato das larvas ficarem em contato com a superfície tratada por 24 horas, sendo, portanto, seu efeito cumulativo e dependente do comportamento individual de cada larva, que pode variar durante esse período de tempo. Entretanto, posteriormente esse método foi adotado e recomendado para experimentos de detecção e medida de resistência em larvas de carrapato (Larval Packet Test - LPT). Nele recomendava-se a utilização do azeite de oliva que seria o solvente carreador e também a utilização de um solvente volátil: tricloroetileno ou clorofórmio (FAO, 1971).

* Baseada na tese de doutorado de Chagas (2001).

A técnica de imersão, sugerida inicialmente por Whitehead (1958) com larvas (Larval Immersion Test - LIT) e fêmeas ingurgitadas de *Boophilus decoloratus* (Adult Immersion Test - AIT), foi aprimorada por Shaw (1966) para as larvas de *R. (B.) microplus*, consistindo na imersão das mesmas por 10 minutos no produto a ser testado. Após este período, as larvas são secas e aproximadamente 100 exemplares são transferidos para papéis filtro secos e acondicionados em estufa com leitura de mortalidade após 24 horas. Para a imersão de fêmeas ingurgitadas, o teste mais utilizado é o aprimorado por Drummond et al. (1973), no qual elas são coletadas dos bovinos, lavadas, secas e divididas em grupos de 10 para serem imersas por 5 minutos nos produtos-teste. Após esse período, as fêmeas são secas, colocadas em placas de Petri e acondicionadas em estufas climatizadas. As que sobrevivem têm seus ovos pesados e a eclodibilidade verificada para cálculo da eficácia conforme fórmulas sugeridas pelos autores.

Trabalhos que tratam dos efeitos repelentes sobre larvas de *R. (B.) microplus* não são muito comuns, visto que a maioria dos testes *in vitro* visa à detecção da ação de mortalidade sobre as fêmeas ingurgitadas. Entretanto, a ação repelente pode ser bastante interessante, já que viria a complementar a ação letal de alguns carrapaticidas comerciais disponíveis no mercado. Louly et al. (2010) avaliaram a repelência/atratividade de substâncias em adultos de *Rhipicephalus sanguineus* por meio de um aparato denominado olfatômetro de quatro entradas de acordo com Vet et al. (1983). As metodologias desenvolvidas para outras espécies de carrapato não são muito úteis, por se tratarem de parasitas heteroxenos e utilizarem normalmente o estágio de adulto, como em *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus evertsi* (WANZALA et al., 2004), ou de ninfa, como em *Ixodes ricinus* (JAENSON et al., 2005; 2006).

Entretanto, no caso de *R. (B.) microplus*, as fases de ninfa a adulto ocorrem sobre o bovino, e a fase que deve ser exposta à ação de repelência são as larvas que se encontram na pastagem em busca do hospedeiro. Na metodologia de Novelino et al. (2007), as larvas de

R. (B.) microplus foram adicionadas na base de copos de polietileno contendo areia e subiam em hastes de madeira a uma altura máxima de 12 cm. Essas hastes foram divididas em quatro partes: base, primeiro terço (base-4 cm), segundo terço (4-8 cm) e terceiro terço (8-12 cm). As contagens eram realizadas a cada duas horas, totalizando 12 horas de observação. Lima et al. (2010) desenvolveram uma técnica na qual as larvas de *R. (B.) microplus* são colocadas na base de um bastão de vidro de 22 cm e a substância teste é colocada nos 5 cm da extremidade superior, em papel filtro impregnado (2,5 x 5 cm). Abaixo desse é fixado outro papel filtro de mesmo tamanho servindo como papel neutro. As larvas são contadas a cada 20 minutos na primeira hora e a cada 30 minutos a partir da segunda hora até 4 horas do início do experimento.

Independente da metodologia adotada, a inexistência de grupo controle é inaceitável. Torrado e Gutierrez (1969) já destacavam sua importância e determinaram que a ocorrência de mortalidade superior a 3% dos parasitas nesse grupo invalida todo o teste. Isso pode ocorrer em alguns casos, como por exemplo quando o próprio papel filtro, por desequilíbrio da umidade externa com a interna, causa a dessecação e a morte das larvas. De acordo com Beadles et al. (1973), deve-se distinguir entre o efeito do produto e o do solvente utilizado para diluir o produto. Dessa forma, faz-se necessária a existência de um grupo controle composto somente do solvente utilizado, bem como um grupo controle composto somente de água destilada.

É notória a importância da escolha do tipo de solvente/emulsificante e sua concentração na solubilização adequada dos bioativos, bem como a avaliação de sua toxicidade sobre o parasita, que usualmente é o principal critério de escolha para a execução de testes. Estudos anteriores podem direcionar a escolha e a concentração do solvente, que também deverá ser utilizado no controle. De acordo com Chagas et al. (2003), no teste com papel impregnado, as larvas de *R. (B.) microplus* não sofreram ação letal superior a 5% diante do álcool metílico, álcool etílico, acetona, acetato de etila e mistura com triton,

na concentração de 100% em 24h ou 48h. O dimetilsulfóxido (DMSO) a 25% causou mortalidade de 22,5% em 24h e de 93% em 48h. O xilol causou mortalidade média de 100% nas concentrações de 100, 75, 50 e 25% e, na concentração de 5%, a mortalidade foi de 1% em 24h e de 2,4% em 48h. A toxicidade dos solventes na metodologia de imersão de larvas pode ser visualizada na Tabela 1, na metodologia de imersão de fêmeas na Tabela 2 e a toxicidade geral na Tabela 3 (CHAGAS et al., 2003). Como pode ocorrer pequena variação para cada população de carrapatos, sugere-se que um teste preliminar com o solvente seja realizado para confirmação.

Tabela 1. Mortalidade média (%) de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas ao teste de imersão com solventes.

solventes	concentrações				
	100%	75%	50%	25%	5%
controle (água)	0,5				
álcool metílico	15,4	0	*	*	*
álcool etílico	3,9	*	*	*	*
acetona	8,9	6,7	0	*	*
DMSO	93,5	100	67	45	**
acetato de etila	100	100	100	41,3	**
mistura triton	36,4	77,5	7	2,1	*
xilol	100	100	100	93	20,2

* Quando a mortalidade foi < que 5% na maior concentração, não foram feitos os demais testes.

** Teste não realizado

Tabela 2. Mortalidade média (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas ao teste de imersão com álcool metílico (M), álcool etílico (E), acetona (A), dimetilsulfóxido (D), acetato de etila (AE), mistura com triton (T) e xilol (X) em diversas concentrações (Conc.).

Conc.	M	E	A	D	AE	T	X
100%	15	56	100	89	100	70	100
75%	0	0	10	55	88	72	100
50%	0	0	2	47	59	61	100
25%	0	0	0	24	78	53	100
5%	*	*	*	*	*	*	92

* Teste não realizado.

Tabela 3. Comparação da mortalidade média geral (%) causada pelos solventes em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em três métodos utilizados.

Solventes	Contato larva	Imersão larva	Imersão fêmea
álcool metílico	2,3 a	3,9 a	19,5 a
álcool etílico	3,5 a	1,0 a	24,6 a
acetona	2,2 a	3,9 a	40,1 b
DMSO	100 b	76,4 b	64,6 c
acetato de etila	2,7 a	85,3 b	71,9 c
triton	2,4 a	30,7 c	66,9 c
xilol	100 b	82,6 b	98,1 d
média	30,4	40,5	55,1

* Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística ($p < 0,05$).

3. Objetivo do documento técnico

Descrever metodologia para a detecção de substâncias com atividade repelente sobre o carrapato *R. (B.) microplus*, bem como disponibilizar informações importantes para a execução de testes *in vitro*, tais como critérios para a definição dos solventes/emulsificantes e sua concentração, preparação de grupos controle, cálculos de concentração dos bioativos e outros.

4. Material e Métodos

4.1. Isolados comerciais de plantas

Em função de possibilidade de parceria futura com empresa para desenvolvimento de formulações com os bioativos avaliados, optou-se pela apresentação dos mesmos na forma de código. Levou-se em consideração que o objetivo principal do presente documento é descrever o passo a passo da metodologia e não os resultados de repelência.

O teste foi padronizado no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), localizada na cidade de São Carlos, SP. Os bioativos avaliados no teste de repelência foram: A (95% de pureza), B (85% de pureza), C (97% de pureza), D (98% de pureza) e E (85% de pureza). Em função da pureza e densidade de cada substância, há a necessidade de correção para cálculo da concentração em mg/mL, já que essa medida é mais precisa do que concentrações baseadas apenas em porcentagem. A densidade pode estar disponível no rótulo ou pode ser obtida por meio do peso de 3 a 5 repetições de 1 mL da substância para cálculo da média. Optou-se por avaliar os bioativos a 10 mg/mL porque é a mesma concentração de muitas substâncias químicas presentes em formulações comerciais, tais como ivermectina, doramectina, moxidectina e abamectina ou mesmo do próprio citronelal em carrapaticidas comerciais, mas nada impede que outras concentrações sejam avaliadas. Segue cálculo para a produção das soluções a 10 mg/mL em um volume de 50 mL:

a) Bioativo A

Pureza (P) = 95%; Densidade (D) = 0,888 g/mL , Concentração (C = P x D) = 843,6 mg/L

Solução 10 mg/mL --> $843,6 \text{ mg/mL} \times V = 10 \text{ mg/mL} \times 50 \text{ mL}$ -->
 $V = 0,5925 \text{ mL}$ ou $592,5 \mu\text{L}$ em 50 mL.

b) Bioativo B

P = 85%; D = 0,858 g/mL, C = 729,3 mg/L

Solução 10 mg/mL --> $729,3 \text{ mg/mL} \times V = 10 \text{ mg/mL} \times 50 \text{ mL}$ -->
 $V = 0,6856 \text{ mL}$ ou $686 \mu\text{L}$ em 50 mL.

c) Bioativo C

P = 97%; D = 0,910 g/mL, C = 882,7 mg/L

Solução 10 mg/mL --> $882,7 \text{ mg/mL} \times V = 10 \text{ mg/mL} \times 50 \text{ mL}$ -->
 $V = 0,5666 \text{ mL}$ ou $566,6 \mu\text{L}$ em 50 mL.

d) Bioativo D

$$P = 98\%; D = 0,842 \text{ g/mL}, C = 825,2 \text{ mg/L}$$

$$\begin{aligned} \text{Solução } 10 \text{ mg/mL} \rightarrow 825,2 \text{ mg/mL} \times V &= 10 \text{ mg/mL} \times 50 \text{ mL} \rightarrow \\ V &= 0,606 \text{ mL ou } 606 \mu\text{L em } 50 \text{ mL.} \end{aligned}$$

e) Bioativo E

$$P = 85\%; D = 0,862 \text{ g/mL}, C = 732,7 \text{ mg/L}$$

$$\begin{aligned} \text{Solução } 10 \text{ mg/mL} \rightarrow 732,7 \text{ mg/mL} \times V &= 10 \text{ mg/mL} \times 50 \text{ mL} \rightarrow \\ V &= 0,6825 \text{ mL ou } 682,5 \mu\text{L em } 50 \text{ mL.} \end{aligned}$$

4.2. Solubilização de substâncias lipofílicas

No teste de repelência pode-se utilizar os níveis de toxicidade estabelecidos no teste de imersão de larvas (Tabela 1), que também é um teste de contato. O tween 80 a 2% v/v foi usado como emulsificante, e o controle negativo foi composto por água destilada (q.s.p. 50 mL) e tween 80 a 2%, ou seja, na produção de um volume de 50 mL, usou-se 1 mL de tween. A ordem de inserção das substâncias nos tubos Falcon também pode tornar a solubilização da substância-teste mais rápida. Os bioativos devem ser adicionados primeiro, logo a seguir o tween 80 e por último a água destilada para subsequente agitação em vórtex. Como o tween é bastante viscoso, uma solução para que ele possa ser pipetado mais rapidamente é cortar a extremidade da ponteira para ampliar o espaço de entrada do líquido.

4.3. Teste de repelência

Para se chegar à presente metodologia, diferentes bases e substratos foram avaliados (Figura 1), até se obter um modelo que estimulasse da melhor forma possível a subida das larvas no grupo controle.

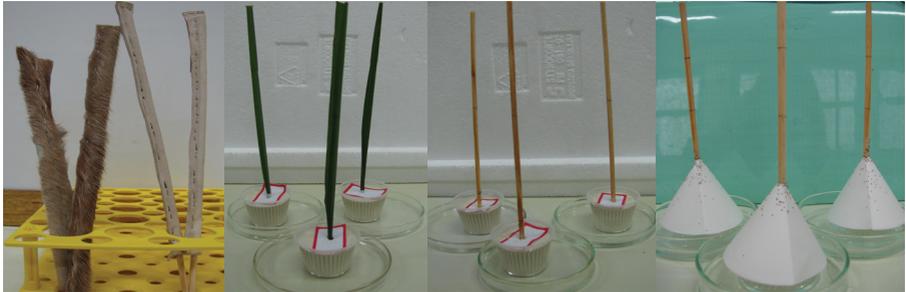


Figura 1. Exemplos de tentativas de estabelecimento da metodologia de repelência em pele ovina com pêlo e sem pêlo, folhas de *Paspalum* sp., hastes de madeira mais curtas e cones de papel-filtro. Fotos: A.C.S. Chagas

A atividade repelente foi avaliada 2, 4, 8, 16 e 32h após a imersão de palitos de madeira de 25 cm de comprimento nas substâncias teste, a 10 mg/mL. A primeira parte do palito próximo à base (15 cm) não teve contato com a solução, enquanto os 10 cm superiores dos palitos, ou seja, a parte mediana (de 15 a 20 cm) e a extremidade superior (de 20 a 25 cm), permaneceram imersos nas soluções por 15 minutos em tubos Falcon de 50 mL (Figura 2a). Após a imersão, os palitos foram fixados no meio de um papel filtro quantitativo (JP41, faixa preta, 12,5 cm de raio, poros de 28 μ m) cortado e montado no formato de um triângulo (6 cm de cada lado ou um papel filtro cortado em 4 pedaços) e inseridos no centro de um copo plástico descartável de 50 mL contendo gesso. O conjunto foi acondicionado em placa de Petri com 5 mL de água no fundo para evitar a fuga das larvas. Aproximadamente 100 larvas de 14 a 21 dias de idade foram removidas de seringas contendo as larvas (Figura 2b) e foram

adicionadas na base do palito (entre 0 e 2 cm), de onde começavam a se deslocar para cima ou a se dispersar no papel filtro (Figura 3a). Cada tratamento teve 3 repetições (total de 300 larvas/tratamento/horário). Dependendo do número de substâncias a serem avaliadas, recomenda-se a execução de 5 repetições.

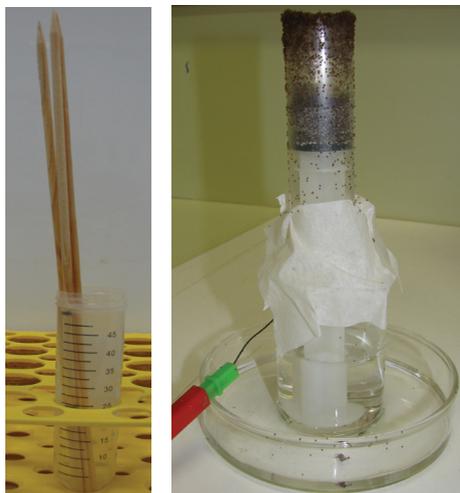


Figura 2. Palitos de madeira imersos em tubos Falcon de 50 mL contendo a solução com o bioativo a 10 mg/mL por 15 minutos (a) e preparação das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para o teste (b). Fotos: A.C.S. Chagas

O controle foi acondicionado em sala separada dos tratamentos em função da volatilidade dos bioativos, e os tratamentos ficaram separados por uma distância mínima de 2 m. Os testes foram realizados em dias diferentes, e as condições de umidade relativa e temperatura foram registradas na Estação Meteorológica do CPPSE.

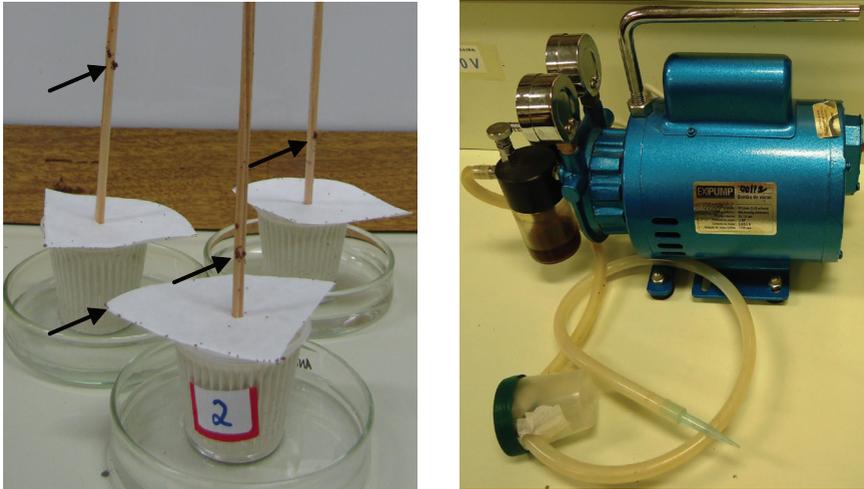


Figura 3. Teste de repelência em palitos de madeira impregnados com bioativos (3 repetições) no qual aproximadamente 100 larvas (setas) são colocadas na base do palito e iniciam dispersão para cima no palito ou para as extremidades do papel (a). Bomba a vácuo adaptada com tubo de borracha e ponteira na extremidade para contagem das larvas (b). Fotos: A.C.S. Chagas

A contagem das larvas foi realizada utilizando-se bomba a vácuo com uma ponteira adaptada na ponta (Figura 3b). A leitura ocorreu da seguinte forma: as larvas foram contadas primeiramente nos primeiros 5 cm da extremidade em todos os palitos (área 1) e depois nos 5 cm subsequentes também em todos os palitos (área 2). O número de larvas foi anotado separadamente para cada parte. Depois as larvas presentes nos 15 cm não impregnados mais no papel filtro e no gesso foram finalmente contadas juntas (área 3). A seguir calculou-se a porcentagem de larvas presentes em cada uma das três áreas do palito em relação ao número total de larvas. Calculou-se também a porcentagem de repelência em cada repetição a partir da quantidade de larvas presentes na área 3 em relação à quantidade total de larvas conforme fórmula abaixo. A seguir, calculou-se a média das 3 repetições.

$$\% \text{ de repelência} = [(larvas \text{ da área } 3 / \text{total de larvas}) \times 100]$$

4.4. Análise estatística

As porcentagens de repelência foram analisadas usando-se o procedimento GLM do SAS. Os efeitos incluídos no modelo foram: tratamento e horas pós-tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

5. Resultados

Como pode ser observado na figura 4, as porcentagens de repelência das substâncias A, B e C foram similares e elevadas, especialmente após 4h (96,4%, 98,6% e 95,3%, respectivamente) e 8h (97,2%, 99,4% e 97,0%, respectivamente) de exposição. O controle apresentou baixo número de larvas na área 3 para os horários de 2, 4, 8 e 16h (13%, 23,4%, 13,2% e 18%, respectivamente), exceto para 32h (32,1%). Devido a isso, optou-se por desconsiderar os resultados obtidos nesse tempo. A substância D apresentou baixa repelência a partir das 8h pós exposição (54,6%). A substância E apresentou baixa repelência às 4h (48,4%), então o teste foi realizado novamente e o resultado foi semelhante ao anterior: 57,6%.

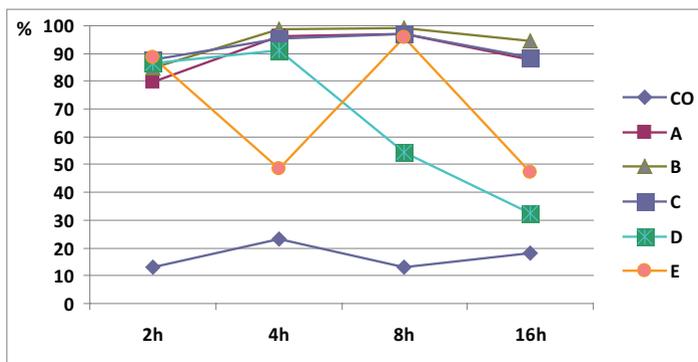


Figura 4. Porcentagem de repelência média das larvas de *R. (B.) microplus* pelos bioativos, em relação ao controle, após 2, 4, 6, 8 e 16h de imersão dos palitos de madeira nas substâncias.

Com relação à distribuição das larvas nas diferentes áreas do palito e papel filtro, observa-se que elas tendem a subir totalmente ou o inverso, pois o número de larvas na área 2 foi muito pequeno nos quatro períodos avaliados. Esse fato pode ser observado na Figura 5.

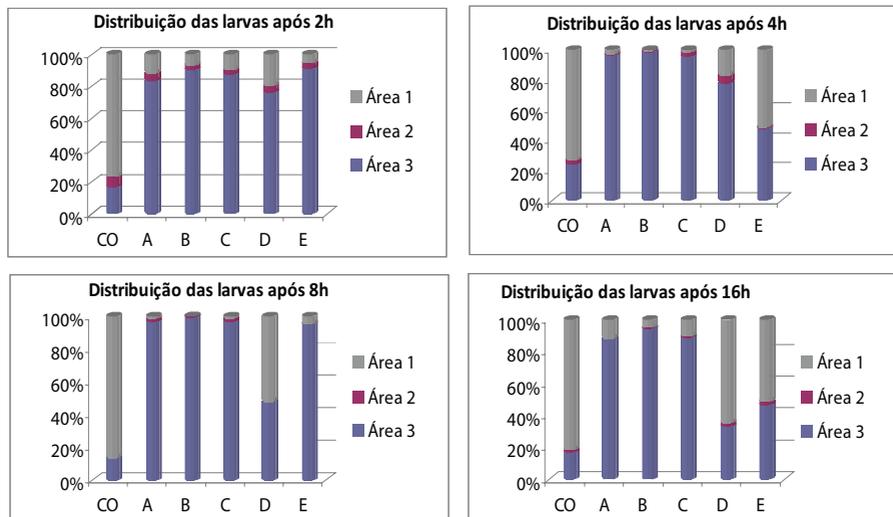


Figura 5. Distribuição do percentual médio de larvas de *R. (B.) microplus* nas áreas 1 (5 cm da extremidade superior), 2 (5 cm subsequentes) e 3 (15 cm inferiores e base de papel) em palitos impregnados pelos bioativos após 2, 4, 8 e 16h de exposição (CO = controle, A a E = substâncias avaliadas).

De forma geral, a análise estatística demonstrou significância com relação ao tratamento ($P < 0,0001$) e com relação à interação tratamento x hora ($P = 0,0021$). Todos os bioativos apresentaram porcentagem de repelência diferente do controle com $P < 0,0001$ para o bioativo A, B e C, com $P < 0,0086$ para o bioativo D e com $P < 0,0006$ para o bioativo E. A repelência total média (desconsiderando os resultados de 32h) foi de: 19,6% para o controle, 88,5% para o A, 91,2% para o B, 90,3% para o C, 61,4% para o D e 74,2% para o E. Na comparação de médias dentro dos tratamentos, entre os diferentes horários, observou-se que não houve diferença estatística.

6. Discussão

No presente trabalho, três substâncias apresentaram atividade repelente às larvas de *R. (B.) microplus* superior a 80% por 16 h após a exposição. Os resultados obtidos na metodologia mostraram-se coerentes e homogêneos, exceto para o bioativo E, já que o resultado de repelência de 4h foi menor do que o de 8h. Provavelmente essa é uma característica da própria substância, que não apresentou resposta linear em relação ao tempo, mesmo após repetição do teste. O controle apresentou baixo número de larvas na área 3 (13%, 23,4%, 13,2% e 18%). Isso representa uma média de 83,5% de larvas que apresentaram o comportamento de subida nos palitos (áreas 1 e 2). Novelino et al. (2007) detectaram média de 70% de larvas de *R. (B.) microplus* no terço superior das hastes-teste. No grupo controle do presente trabalho, 80% das larvas estavam localizadas na extremidade superior ou área 3 do palito e a variação da porcentagem de larvas que permaneceram na área 1 foi de cerca de 10% (entre 13 e 23%), o que reforça a segurança da metodologia. Com 32h a porcentagem de repelência no controle subiu para 32%. Acredita-se que testes longos demais sofram interferência do meio, como a movimentação de pessoas no laboratório, que normalmente é difícil de ser controlada.

Observou-se a maioria das larvas na área 1 (palitos controles ou impregnados com substâncias de baixa repelência) e na área 3 (substâncias de elevada repelência). A área intermediária foi pouco ocupada, e acredita-se que essa distribuição poderá variar bastante com a altura e o tipo de substrato que a larva terá que subir. Segundo observações de vários autores, as larvas de *R. (B.) microplus* estabelecem-se no topo das folhas em uma hora em folhas curtas, mas em folhas longas elas podem levar até três dias. Isso depende também da espécie vegetal envolvida, da presença de obstáculos na lâmina foliar e da estação do ano (WILKINSON, 1953; FURLONG et al., 2002a,b). Além do tempo para alcançar a extremidade, a idade das larvas também é um fator importante nesse teste, pois se observou no presente trabalho que a maioria das larvas com menos de 14 dias

de vida não apresentou o comportamento de subida vertical imediato. De acordo com Químio (1982), elas necessitam de alguns dias para endurecer a cutícula e para se tornarem mais ativas.

Optou-se por não impregnar os 15 cm próximos à base das hastes, pois dessa forma a atividade larvicida poderia confundir ou interferir na atividade repelente. Esse objetivo foi alcançado, pois nenhum dos bioativos causou mortalidade das larvas (embora já se saiba que eles também possuem essa ação). A letalidade sobre larvas pode ser melhor verificada em metodologias mais adequadas, já descritas no presente trabalho.

7. Conclusões

Atualmente várias formulações comerciais utilizam bioativos na mesma concentração avaliada no presente estudo. A partir dos resultados aqui obtidos, demonstrou-se que três bioativos avaliados são substâncias de igual potencial em relação à capacidade de repelência e podem ser consideradas como novas alternativas a serem incluídas em formulações carrapaticidas após levantamento de toxicidade ao hospedeiro. A metodologia aqui apresentada mostrou-se válida para a identificação de substâncias com atividade repelente.

8. Recomendações

- Trabalhar com larvas com idade mínima de 14 dias;
- Verificar a temperatura antes de executar o teste e manter o ar condicionado desligado para não reduzir a umidade relativa do ar. Recomenda-se que a temperatura esteja entre 17°C e 25°C;
- Calcular a concentração do bioativo em mg/mL, pois cada substância tem um peso diferente e o cálculo da concentração em porcentagem torna-se subjetivo;

- Se o objetivo é observar a repelência (ação indireta), as larvas não devem ter contato inicial direto com a substância-teste. Recomenda-se deixar um espaço entre o ponto de aplicação da substância e o ponto de liberação das larvas para que o comportamento de migração vertical seja melhor visualizado, sem a ocorrência de mortalidade (ação direta);
- As larvas devem ser liberadas no palito (0 -2 cm) e não na base do suporte;
- O grupo controle negativo deve ser mantido em sala separada do grupo tratado;
- No grupo controle negativo a porcentagem de larvas na área 3 (15 cm próximos à base) não deve ultrapassar 25% para validação do teste;
- Um grupo controle positivo pode ser elaborado com um repelente comercial a base de dietiltoluamida (DEET);
- O deslocamento aleatório das larvas no momento da leitura pode ocorrer em função da movimentação do observador e da vibração da bomba a vácuo. Isso pode ser minimizado usando-se máscara na contagem (evitando-se contato direto das larvas com o CO₂ liberado pela respiração do observador) e mantendo-se a bomba fora da bancada (evitando-se vibração na bancada).

9. Agradecimentos

Ao apoio laboratorial fornecido pela estudante de graduação em Ciências Biológicas do Centro Universitário Central Paulista, Karina Alves Feitosa, ao apoio estatístico fornecido pelo doutorando em Genética e Melhoramento Animal da UNESP/FCAV - Jaboticabal, Rodrigo Giglioti, e ao apoio financeiro do projeto da Embrapa 03.11.01.023.00.00.

10. Referências

AMARAL, N. K. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae).

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 2, n. 2, p. 144-151, 1993.

BEADLES, M. L.; DRUMMOND, R. O.; WHETSTONE, T. M. Tropical horse tick: effects of solvents on oviposition. **Journal of Economical Entomology**, v. 66, p. 125-127, 1973.

CHAGAS, A. C. S. **Efeito acaricida de produtos naturais e sintéticos de plantas e solventes sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG. Tese de Doutorado, 2001. 58p.

CHAGAS, A. C. S.; BARROS, L. D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTTI, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; BIZZO, H. R. *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 295-303, 2012.

CHAGAS, A. C. S., FURLONG, J., BROVINI, C. N. Predation of engorged female tick, *Boophilus microplus*, by the ant *Pachycondyla striata* in pastures. **Bioscience Journal**, v.18, p.77 - 81, 2002.

CHAGAS, A. C. S.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; PRATES, H. T.; PASSOS, W. M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v.33, p.109-114, 2003.

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economical Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

FAO. **El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten** – Manual práctico de campo: control de las garrapatas. Roma, 1987. v. 1, 219 p.

FAO. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for larvae of cattle ticks, *Boophilus microplus* spp. FAO method no. 7. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 19, p. 15-18, 1971.

FURLONG, J., BROVINI, C. N., CHAGAS, A. C. S. Comportamento de larvas de *Boophilus microplus* em pastagem de *Pennisetum purpureum*. **Bioscience Journal**, v.18, p.23 - 31, 2002a.

FURLONG, J., CHAGAS, A. C. S., BROVINI, C. N. Behavior and ecology of *Boophilus microplus* tick larvae in *Brachiaria decumbens* pastures. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 213 - 217, 2002b.

HARLAN, H. J.; FOSTER, W. A. Micrometeorologic factors affecting field host seeking activity of adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, p. 471-479, 1990.

HAZARI, M. M.; MISRA, S. C. Behaviour and survival of *Boophilus microplus* larvae under outdoor conditions. **Indian Veterinary Journal**, v. 3, n. 2, p. 187-188, 1993.

JAENSON, T. G. T.; GARBOUI, S.; PÅLSSON, K. Repellency of oils of lemon eucalyptus, geranium, and lavender and the mosquito repellent MyggA natural to *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 4, p. 731-736, 2006.

JAENSON, T. G. T.; PÅLSSON, K.; BORG-KARLSON, A. K. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. **Medical Veterinary Entomology**, v. 19, n. 4, p. 345-352, 2005.

KITAOKA, S.; MORII, T. Supplementary tests on effects of new organophosphorus and other compounds as tickicides against *Boophilus microplus*. **National Institute of Animal Health**, v. 3, p.32-35, 1963.

KITAOKA, S.; YAJIMA, A. Comparison of effectiveness between pesticides against *Boophilus microplus* by topical application and spraying. **National Institute of Animal Health**, v.1, p.41-52, 1961.

LIMA, A. S.; SOUSA-FILHO, J. G. N.; FOGGIO, M. A.; CHAGAS, A. C. S.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Avaliação do efeito repelente do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBPV, 2010. AR44.

LOULY, C. C. B.; SOARES, S. F.; SILVEIRA, D. N.; GUIMARAES, M. S.; BORGES, L. M. F. Differences in the behavior of *Rhipicephalus sanguineus* tested against resistant and susceptible dogs. **Experimental and Applied Acarology**, v. 51, p. 353–362, 2010.

NOVELINO, A. M. S.; DAEMON, E.; SOARES, G. L. G. Avaliação da atividade repelente do timol, mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarí: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 700-704, 2007.

QUÍMIO. ***Boophilus microplus***: Revisão Taxionômica e morfo-biológica. Rio de Janeiro, 1982. 105p.

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

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. Oxford: University Press, 1991. v. 1, 447 p.

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

TORRADO, J. M. G., GUTIERREZ, R. O. Método para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata: Evaluación de sensibilidad. **Revista do Instituto Agropecuário de Patologia Animal**, v. 6, n. 14, p.135-158, 1969.

VET, L. E. M.; LENTEREN, J. C. V; HEYMANS, M.; MEELIS, E. An airflow olfactometer for measuring olfactory response of Hymenopterous parasitoids and other small insects. **Physiological Entomology**, v. 8, p. 97-106, 1983.

WANZALA, W.; SIKAN, F. K.; GULE, S.; HASANALI, A. Attractive and repellent host odours guide ticks to their respective feeding sites. **Chemoecology**, v. 14, p. 229-232, 2004.

WHITEHEAD, G. B. Acaricide resistance in the blue tick, *Boophilus decoloratus* (Koch) – Part I. **Bulletin of Entomological Research**, v. 49, p. 661-673, 1958.

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