

EFICÁCIA *IN VITRO* DE LACTONAS MACROCÍCLICAS SOBRE TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)*

IN VITRO EFFICACY OF MACROCYCLIC LACTONES AGAINST ENGORGED FEMALES OF Rhipicephalus (Boophilus) microplus (ACARI: IXODIDAE)

Yara Peluso Cid¹, Viviane de Souza Magalhães², Diego Dias da Silva³, Monique Moraes Lambert⁴ e Fábio Babour Scott⁵

ABSTRACT. Cid Y.P., Magalhães V. de S., Silva D.D. da, Lambert M.M. & Scott F.B. [*In vitro* efficacy of macrocyclic lactones against engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)]. Eficácia *in vitro* de lactonas macrocíclicas sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(Supl. 1):7-10, 2010. Programa Binacional em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: yaracid@yahoo.com.br.

Laboratory tests were performed to evaluate efficacy of acaricide formulated as emulsifiable concentrate containing avermectins against the cattle tick *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. Tests were carried out over engorged females using immersion technique. Highest efficacy was evidenced for formulation containing ivermectin 500ppm (96.58%) followed by abamectin 250 ppm (90.42%) and doramectin 500 ppm (55.14%). All formulations developed presented better efficacy than commercial formulation (deltamethrin 2.5%) 100 ppm (19.68%) that was used as positive control. Emulsifiables concentrates developed have allowed *in vitro* studies for *R. (B.) microplus*.

KEY WORDS. *In vitro* efficacy, avermectins, emulsifiable concentrate, *Rhipicephalus (boophilus) microplus*.

RESUMO. Foram realizados testes laboratoriais para avaliar a eficácia de carrapaticidas formulados como concentrados emulsionáveis contendo avermectinas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos. Os testes foram efetuados sobre teleóginas ingurgitadas utilizando-se a técnica de imersão. Foi evidenciada uma maior eficácia para a formulação contendo ivermectina 500 ppm (96,58%), seguida de abamectina 250 ppm (90,42%) e doramectina 500 ppm (55,14%). Todas as formulações desenvolvidas apresentaram eficácia superior à formulação comercial (deltametrina 2,5%)

na concentração de 100 ppm (19,68%) utilizada como controle positivo. Os concentrados emulsionáveis desenvolvidos possibilitaram a realização de estudos *in vitro* para *R. (B.) microplus*.

PALAVRAS-CHAVE. Eficácia *in vitro*, avermectinas, concentrado emulsionável, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* classifica-se como uma espécie de um só hospedeiro bovino. Está amplamente distribuído por todos os 26

* Recebido em 19 de outubro de 2009.

¹ Farmacêutica Industrial. Programa Binacional em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: yaracid@yahoo.com.br - Bolsista Capes.

² Farmacêutica Industrial Autônoma. E-mail: vsmagalhaes@yahoo.com.br

³ Curso de Medicina Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal (DPA). Instituto de Veterinária (IV). UFRRJ, Seropédica, RJ. E-mail: diegias@hotmail.com - Bolsista BIEXT,

⁴ Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal (DPA). Instituto de Veterinária (IV). UFRRJ, Seropédica, RJ. E-mail: monique_lambert@hotmail.com - Bolsista PIBIC (CNPq/UFRRJ).

⁵ Médico-veterinário. Dr. CsVs. DPA, IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: scott@ufrjr.br

estados brasileiros, sendo que, em 66,04% destes observa-se sua ocorrência durante os 12 meses do ano (Caproni et al., 1998). Os carrapatos podem causar danos diretos e indiretos, sendo os primeiros relacionados à perda sanguínea, como toxicoses, além de injúrias e danos, como abscessos. Indiretamente atuam como vetores de diversos organismos patogênicos (Holdsworth et al., 2006), principalmente os agentes etiológicos responsáveis pela Piroplasmose bovina, doença causada por protozoários do gênero *Babesia* (Pereira et al., 2008).

O uso de fármacos com efeito carrapaticida é a principal arma disponível no combate aos carrapatos. Dentre os registrados no Brasil, podemos destacar algumas classes como organofosforados, piretróides, amidinas, benzilfeliuréias e lactonas macrocíclicas. Dentro do grupo químico de lactonas macrocíclicas, podemos destacar a ivermectina, abamectina e doramectina, classificadas com avermectinas, que são produtos naturais da fermentação do fungo *Streptomyces* (Omura, 2008). O mecanismo de ação desta classe está envolvido com a ação especialmente nos canais de cloro, controlados pelo ácido glutâmico e, secundariamente, naqueles canais de cloro controlados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico). O potencial de ação associado à formulações inovadoras e ao amplo espectro de atuação de formulações contendo avermectinas mantêm a relevância dessas formulações no controle de parasitas (Shoop & Soll, 2002).

São várias as formas de emprego de compostos acaricidas com a finalidade de controlar o carrapato em bovinos: pulverização, banhos de imersão, aplicação tópica ao longo do dorso *pour-on* e injetável. No caso da pulverização, as formulações mais empregadas utilizando a água como veículo: pó molhável e concentrado emulsionável. Concentrados emulsionáveis (CE) são soluções concentradas oleosas de princípios ativos de baixa solubilidade que se destinam a ser diluídas em água formando uma emulsão relativamente estável para aplicação. A calda resultante da mistura do concentrado emulsionável com água tem uma aparência opaca ou leitosa. O agente emulsionante utilizado, com uma ação detergente, torna possível a suspensão de partículas de reduzida dimensão em água, formando uma suspensão.

Um dos grandes empecilhos de se monitorar a eficácia das avermectinas é que, no mercado, não se encontram formulações que possam ser diluídas em água e que ser, conseqüentemente, empregadas em testes *in vitro* de imersão de teleóginas, que se serviriam para monitorar o problema da resistência no campo deste carrapato frente às avermectinas.

O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento e a avaliação da eficácia *in vitro*, de formulações na forma de concentrado emulsionável, contendo avermectinas para avaliação da sensibilidade de populações de *R. (B.) microplus*.

MATERIAL E MÉTODOS

As formulações foram desenvolvidas a partir da solubilização do fármaco no solvente e posterior incorporação do tensoativo. As formulações desenvolvidas estão descritas a na Tabela 1. O produto comercial Butox (Deltametrina 25g/1L) foi usado como controle positivo.

Para a avaliação *in vitro* da eficácia carrapaticida das formulações, foram colhidas teleóginas desprendidas naturalmente de *R. (B.) microplus* de bovinos, naturalmente infestados. A seguir, procedeu-se ao teste *in vitro* por imersão de teleóginas. Estas foram lavadas em água corrente, secas em papel toalha e então separadas em grupos homogêneos contendo 10 em cada placa de petri.

Os carrapaticidas foram diluídos em água, ajustando-se a concentração para valores usuais, que foram estipulados em experiências prévias. As formulações CE de ivermectina, abamectina e doramectina foram testadas nas concentrações de 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm e 15,62 ppm. No caso do produto Butox (controle positivo), foram testadas as concentrações de 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm e 3,12 ppm.

Cada grupo de teleóginas foi submetido à imersão em Becker de 100 mL, contendo 50 mL de carrapaticida na concentração a ser testada, durante cinco minutos. O teste foi realizado em duplicata para cada concentração testada, duas repetições. Os grupos controles de teleóginas foram imersos em água destilada e outro grupo, em veículo diluído em água na mesma concentração dos CEs, contendo as avermectinas empregadas. Após a imersão, o excesso de carrapaticida foi retirado com o auxílio de papel toalha. As teleóginas foram acondicionadas em placa de Petri descartável, devidamente identificada com data, dia experimental, grupo, peso e número de repetições e coladas nas placas de petri e fixadas com auxílio de uma fita dupla face. O material foi então incubado em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.), a 27°C de temperatura, umidade relativa do

Tabela 1. Formulações do concentrado emulsionável (CE) contendo avermectinas desenvolvidas.

Formulações	Fármaco (10%)	Solvente (70%)	Tensoativo (20%)
1	Ivermectina	Xilol	Triton X-100
2	Doramectina	Xilol	Triton X-100
3	Abamectina	Xilol	Triton X-100

ar de 75%, por 21 dias. Após este período as posturas das teleóginas de cada placa foram pesadas e transferidas para seringas fechadas com algodão. As seringas devidamente identificadas retornaram à estufa B.O.D., nas mesmas condições de umidade e temperatura anteriores até a eclosão das larvas.

A eclodibilidade das larvas foi avaliada por estimativa de porcentagem em relação àquelas que não eclodiram. O cálculo da eficácia dos carrapaticidas sobre *B. microplus*, foi realizado a partir dos dados de peso das teleóginas, peso dos ovos e porcentagem de eclosão de acordo com Drummond (1973).

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

$$EP = \frac{ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado} \times 100}{ER \text{ do grupo controle}}$$

onde:

ER = Eficácia Reprodutiva

EP = Eficácia do produto

RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na Tabela 2. De forma geral a eficácia aumentou com o aumento da con-

Tabela 2. Eficácia média dos carrapaticidas testados em diversas concentrações sobre *Rhipicephalus (B.) microplus*.

Produto	Concentrações (ppm)	Média peso teleóginas (g)	Média peso posturas (g)	Média eclosões (%)	Eficácia Reprodutiva	Eficácia Produto (%)
Controle água	---	1,95	0,97	0,95	9441,42	0
Controle Veículo	500,00	2,04	1,02	0,95	9530,28	0
Deltametrina	3,12	2,21	1,10	0,90	8919,58	5,53
	6,25	2,07	1,07	0,94	9715,53	0
	12,50	1,94	1,03	0,93	9864,51	0
	25,00	1,99	1,04	0,95	9892,75	0
	50,00	2,10	1,00	0,84	7992,19	15,35
Ivermectina	100,00	2,01	0,90	0,85	7583,82	19,68
	15,62	2,13	0,68	0,58	3661,79	61,22
	31,25	2,02	0,54	0,61	3248,50	65,59
	62,50	1,91	0,46	0,42	2006,69	78,75
	125,00	1,98	0,37	0,37	1346,67	85,74
Doramectina	250,00	2,09	0,32	0,38	1146,18	87,86
	500,00	1,97	0,19	0,17	322,56	96,58
	15,62	2,05	0,93	0,96	8706,81	7,78
	31,25	2,04	0,90	0,90	7860,89	16,74
	62,50	2,11	0,75	0,76	5383,33	42,98
Abamectina	125,00	1,77	0,58	0,82	5338,31	43,46
	250,00	2,19	0,70	0,80	5102,03	45,96
	500,00	1,98	0,52	0,81	4235,54	55,14
	15,62	2,24	0,68	0,89	5405,63	42,75
	31,25	2,15	0,50	0,56	2588,36	72,59
	62,50	2,01	0,34	0,56	1884,91	80,04
	125,00	1,99	0,32	0,46	1476,72	84,36
	250,00	2,18	0,30	0,33	904,28	90,42
	500,00	2,09	0,46	0,43	1871,35	80,18

centração do ativo, demonstrando que houve uma relação dose – dependente. Foram obtidos os maiores valores de eficácia para as concentrações de 500 ppm, com exceção do ativo abamectina, que obteve sua eficácia mais elevada na concentração de 250 ppm. A eficácia *in vitro* encontrada para a formulação CE contendo ivermectina foi de 96,58% para concentração de 500ppm. Já para a abamectina foi de 90,42%, para a concentração de 250 ppm e para a doramectina, de 55,14% para a concentração de 500ppm. A formulação comercial contendo deltametrina apresentou eficácia de 19,68%, sendo menor, comparada a todas as formulações testadas, demonstrando que a população empregada era resistente a deltametrina e conseqüentemente a outros piretróides. Os melhores resultados foram obtidos para a formulação contendo Ivermectina na concentração de 500 ppm.

DISCUSSÃO

Devido principalmente à dificuldade de formular ativos na forma de concentrados emulsionáveis, o número de trabalhos descrevendo teste *in vitro* com teleóginas utilizando lactonas macrocíclicas, como princípio ativo, é escasso. A literatura descreve eficácia *in vivo* desses ativos na forma de injetáveis e *pour-on* contra *R. (B.) microplus* em bovinos. Na avaliação de eficácia entres os dias 28 e 35 após tratamento de injeção subcutânea de 200µg/Kg, observa-se valores entre 92,8% (Caproni et al. 1998) e 99,8% (Leite et al. 1995) para a doramectina, entre 63,8% (Caproni et al. 1998) e 80,15% (Marques et al. 1995) para a ivermectina e de 94% (Bridi et al. 1992) para abamectina. Vale ressaltar que as diferenças nos valores de eficácia variam de acordo com a região avaliada e também em relação ao desenvolvimento de cepas resistentes.

Martins & Furlong (2001) relataram resistência do *R. (B.) microplus* à doramectina, com resistência cruzada com ivermectina, em ensaios de campo pela primeira vez no Brasil. O uso difundido de lactonas macrocíclicas para o controle de parasitos e a limitação na escolha de carrapaticidas alternativos, contribuem para que a resistência a este grupo de compostos se torne um grande problema (George et al. 2004).

Testes *in vitro* para detecção de resistência, são caracterizados por serem de fácil execução, eficientes e de baixo custo. Já foi descrita a utilização do teste de imersão de larvas para diferenciação de cepas resistentes e sensíveis com larvas de *R. (B.) microplus*, com formulações comerciais de ivermectina (Klafke et al. 2006). O desenvolvimento de formulações CE conten-

do avermectinas (abamectina, ivermectina e doramectina) viabiliza a realização de testes *in vitro* com teleóginas permitindo a monitorização da sensibilidade de populações de *R. (B.) microplus*.

CONCLUSÕES

Os concentrados emulsionáveis desenvolvidos contendo ivermectina, doramectina e abamectina possibilitaram a realização de estudos *in vitro* para *R. microplus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bridi A.A., Carvalho L.A.F., Cramer L.G., Gross S.J., Cruz, J.B & Amaral N.K. Efficacy of abamectin against the cattle tick *Boophilus microplus* acarina, ixodidae. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, 1:35-40, 1992.
- Caproni JR L., Umehara O., Moro E. & Golçalves L.C.B. Field efficacy of doramectin and ivermectin against natural infestation of cattle tick *Boophilus microplus*. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, 7:151-155, 1998.
- Drummond R.O., Ernst S.E., Trevino J.L., Gladney W.J. & Graham O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 66:130-133, 1973.
- George J.E., Pound J.M. & Davey R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129 (supl):353-366, 2004.
- Holdsworth P.A., Kemp D., Green P., Peter R.J., de Bruin C., Jonsson N.N., Letonja T., Rehbein S. & Vercruyse J. World association for the advancement of veterinary parasitology (w.a.a.v.p.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (ixodidae) on ruminants. *Vet. Parasitol.*, 136:29-43, 2006.
- Klafke G.M., Sabatini G.A., Albuquerque T.A., Martins J.R., Kemp D.H., Miller R.J. & Schumaker T.S. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 142:386-390, 2006.
- Leite R.C., Muniz R.A., Oliveira P.R., Gonçalves L.C.B. & Rew R.S. Eficácia de doramectin contra infestações naturais de *B. microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em bovinos. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, 4:53-56, 1995.
- Marques A.O., Arantes G.J. & Silva C.R. Avaliação da eficácia da ivermectina a 1% (solução injetável), no tratamento de bovinos naturalmente infestados pelo carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: ixodidae) e mantidos em pastagem. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, 4:117-119, 1995.
- Martins J.R. & Furlong J. Avermectin resistance of cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.*, 149:64, 2001.
- Omura S. Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 31:91-98, 2008.
- Pereira M.C., Labruna M.B., Szabó M.P.J. & Klafke G.M. *Rhipicephalus (boophilus) microplus* *biologia, controle e resistência*. 1ª ed. Medvet, São Paulo, 2008. p.21-25.
- Shoop W. & Soll M. Chemistry, pharmacology and safety of the macrocyclic lactones, p 1-29. In: Vercruyse J. & Rew R.S. (Eds), *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing, New York, 2002.