UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Camila Balconi Marques

Avaliação da atividade acaricida *in vitro* e *in vivo* de siloxanos organo-modificados em populações de *Rhipicephalus microplus*.

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Camila Balconi Marques

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACARICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SILOXANOS ORGANO-MODIFICADOS EM POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus microplus*.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Profª Dr.ª Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS

2018

Camila Balconi Marques

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACARICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SILOXANOS ORGANO-MODIFICADOS EM POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus microplus*.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Aprovado em: 06 de agosto de 2018:

_____

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)

(Presidente/Orientador)

_____

Gustavo Freitas Ilha, Dr. (Boehringer Ingelheim)

_____

Felipe Libardoni, Dr. (UNIJUÍ)

Santa Maria, RS

2018

AGRADECIMENTOS

À universidade, seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade de crescimento que me foi concedida;

Aos meus pais, Paulo Cezar e Magda, por todo apoio que foi necessário para chegar até aqui. Espero continuar orgulhando-os;

Aos meus irmãos Victor e Julia, pela convivência e ajuda durante esse tempo;

Ao Felipe Ceni, que mesmo longe, foi meu grande companheiro e incentivador em todas as horas;

A minha orientadora, pelas ideias, oportunidades e instruções as quais foram imprescindíveis;

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Sangioni, pelo apoio e carinho dentro e fora do ambiente universitário;

Ao Prof. Dr. Tiago Gallina, o qual considero meu "co-orientador extra-oficial", pela disponibilidade de sanar minhas dúvidas, debater e ensinar, ajudando até mesmo nas "emergências";

Aos proprietários que foram inseridos nos projetos, por toda contribuição e disponibilidade;

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias, por toda parceria e ajuda, desde a elaboração deste projeto até a execução e finalização do mesmo. Um agradecimento especial aos estagiários: Fagner Fernandes, Gisele Gehrke e Denise Ramos; e pós-graduandos: Fernanda Ramos e Vanessa Osmari, que auxiliaram ativamente;

Às minhas amigas Franciéle Gusatto, Izaura Scherer, Karine Campagnolo e Thaís Souto por todo amparo, e o tão precioso "ombro amigo"!

Enfim, todos que de alguma forma me auxiliaram e torceram pelo meu sucesso, serei sempre gata.

Muito obrigada.

“ O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos todos os dias. ”

Robert Collier

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACARICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SILOXANOS ORGANO-MODIFICADOS EM POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus microplus*.

AUTOR: Camila Balconi Marques

ORIENTADOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

Atualmente, a infestação por *Rhipicephalus microplus* acarreta grandes prejuízos à bovinocultura no Brasil. O controle do R. microplus é realizado quase que exclusivamente através da utilização de produtos químicos. Desse modo, a disponibilidade de produtos com atividade acaricida é limitada e o desenvolvimento de novas drogas é um processo lento e gradual. Sabe-se que as condições epidemiológicas estão mais favoráveis a manutenção do carrapato no ambiente bem como para a infestação dos animais. Em decorrência disto, animais tem sido tratados com maior frequência, acaricidas utilizados excessivamente sem critério técnico ou avaliação de eficácia dos tratamentos, culminando no aparecimento de resistência parasitária pelo carrapato. Neste contexto, o presente trabalho visa determinar a atividade acaricida in vitro e in vivo de siloxanos organo-modificados associados ou não ao Butóxido de Piperonila (BPO). Para isso, foram coletadas teleóginas de *R. microplus* oriundas de diferentes propriedades do estado do Rio Grande do Sul, submetidas ao teste de imersão de teleóginas descrito por Drummond et al. (1973) traçando também um comparativo de eficácia com uma associação de organofosforado e piretróide disponível comercialmente. Após observação dos resultados in vitro, foram iniciados testes in vivo em quatro propriedades da região de Santa Maria - RS. Foi aplicado uma concentração média dos siloxanos organo-modificados associados ou não, por meio de banho de aspersão e avaliação da eficácia segundo o proposto por Roulston et al. (1968). Os resultados revelaram alta atividade acaricida (100%) in vitro na concentração de 5% na forma não associada, e nas concentrações de 0,6; 1,0; 2,5% combinadas com BPO. Os resultados in vivo também apresentaram melhoria com a associação de BPO, sendo que a eficácia aumentou significativamente. Este trabalho permitiu concluir que os siloxanos organo-modificados demonstraram atividade acaricida, além do efeito sinérgico da associação de BPO. Evidenciando sua importância, frente ao atual cenário de multirresistência do carrapato *R. microplus* aos diferentes compostos comercialmente disponíveis.

Palavras-chave: acaricida, resistência, bovinos, carrapato, BPO.

ABSTRACT

IN VITRO AND *IN VIVO* ACARICIDAL ACTIVITY EVALUATION OF ORGANO-MODIFIED SILOXANES IN POPULATIONS OF *Rhipicephalus microplus.*

AUTHOR: Camila Balconi Marques

ADVISER: Fernanda Silveira Flores Vogel

Currently, the *Rhipicephalus microplus* infestation causes great losses to cattle production in Brazil. The control of *R. microplus* is carried out almost exclusively using chemical products. In this way, the availability of products with acaricidal activity is limited and the development of new drugs is a slow and gradual process. It is known that the epidemiological conditions are more favorable to the maintenance of the tick in the environment as well as to the infestation of the animals. As a result, the animals have been treated more frequently, together with the excessive use of these acaricides, often without technical criteria or evaluation of the effectiveness of the treatments, culminating in the appearance of parasitic resistance by the tick. In this context, the present work aims to determine the acaricidal activity *in vitro* and *in vivo* of organo-modified siloxanes associated or not with Piperonyl Butotoxide (PBO). For this, *R. microplus* teleogines were collected from different properties in the state of Rio Grande do Sul, submitted to the immersion test of teleogines described by Drummond et al. (1973), also outlining a comparative efficacy with a commercially available combination of organophosphates and pyrethroids. After observing the *in vitro* results, *in vivo* tests were started at four properties in the Santa Maria - RS region. A medium concentration of the associated organo-modified siloxanes was applied by spraying bath and the efficacy evaluation was perfomed according to the proposed by Roulston et al. (1968). The results revealed high acaricidal activity (100%) *in vitro* in the concentration of 5% on non-associated form, and in combinations of concentrations of 0.6; 1.0; 2.5% with PBO. The *in vivo* results also increased with the association of PBO, being that the efficacy significantly improved. This work allowed to conclude that the organo-modified siloxanes demonstrated acaricide activity, in addition to the synergistic effect of PBO association. Evidencing its importance, in face of the current multiresistance scenario of the *R. microplus* tick to the different commercially available compounds.

Keywords: acaricide, resistance, cattle, tick, PBO.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 11
2.1 *Rhipicephalus microplus* 11
2.1.1 Origem e distribuição 11
2.1.2 Ciclo 11
2.1.3 Perdas econômicas 13
2.1.4 Resistência e controle do *R. microplus* 14
2.2 SILOXANOS ORGANO-MODIFICADOS 17
3 CAPÍTULO 1 19
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 35
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

1 INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus microplus* é um carrapato monoxeno, considerado o principal e o mais importante ectoparasito que acomete bovinos entre os paralelos 32º Norte e Sul (MATHIAS *et al.*, 2013). Entre os prejuízos causados, destacam-se lesões no couro, diminuição da taxa de reprodução, perdas de peso e produção (KESSLER & SCHENK, 1998), levando a prejuízos estimados de US$ 3,24 bilhões por ano (GRISI et al., 2014). Para o controle dessa situação, os acaricidas assumiram um papel importante no controle do *R. microplus* desde o início do século, quando a ixodidiose passou a ser encarada como um sério problema na bovinocultura (CHIMINAZZO *et al.*, 2004).

Sabe-se que o uso indiscriminado de carrapaticidas contribuiu para o aparecimento de diversos casos de resistência dos ixodídeos a várias drogas (CHAGAS *et al.*, 2004). Este fato representa um sério problema no controle no controle do carrapato, além de ser uma preocupação da sociedade e órgãos governamentais com os resíduos nos produtos de origem animal (CAMILLO et al., 2009). No Brasil, foram registradas populações de carrapatos resistentes a maioria das classes de drogas usadas para o seu controle. Farias (1999) relatou casos de resistência a organofosforados e piretróides sintéticos**;** Furlong (1999) ao amitraz na região sul e sudeste. Em meados da década de 90, intensificou-se o uso das lactonas macrocíclicas, servindo como uma alternativa no controle de populações resistentes aos compostos citados anteriormente, e pela facilidade de aplicação. O resultado desse uso massivo foi o surgimento de populações de campo resistentes a esse grupo químico (MARTINS & FURLONG, 2001) e posteriomente foi detectada resistência à ivermectina através de testes *in vitro* (KLAFKE *et al*., 2006). Castro-Janer *et al*. (2010) confirmaram a ocorrência de populações de carrapatos resistentes a Fipronil no Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo e, mais recentemente resistência ao Fluazuron no estado do Rio Grande do Sul (RECK *et al.*, 2014).

Os siloxanos organo-modificados são compostos que geram uma ação de contato específica, resultando em desidratação, imobilização e eventual sufocamento no parasito. Trazem modo de ação físico, e por isso, tornam-se candidatos perfeitos para uma alternativa segura e eficaz, retardando o desenvolvimento de resistência (LISZKA & DHANG, 2014). O Butóxido de Piperonila (BPO) foi semi-sintetizado a partir do safrol, o principal componente do óleo de cânfora (KNOWLES, 1991; TOZZI, 1998). É um líquido de coloração próxima ao incolor ou amarelo pálido, é moderadamente estável na medida em que é resistente à hidrólise, oxidação e exposição à luz solar (KIDD &

JAMES, 1994). Desde a sua descoberta, e desde que a resistência a pesticidas surgiu como um problema, o BPO tem sido frequentemente usado como um sinergista inseticida, em mais de 1700 inseticidas (USEPA, 2002). É comumente associado com piretrinas e piretróides sintéticos, incluindo em medicina humana e veterinária (TOZZI, 1999).

Considerando a necessidade de novas alternativas para o controle do *R. microplus*, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo avaliar a atividade acaricida *in vitro* e *in vivo* de siloxanos organo-modificados em populações de *R. microplus*, associados ou não ao BPO.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

2.1.1 Origem e distribuição

A espécie *R. microplus* originou-se na Ásia, adaptando-se perfeitamente ao clima das áreas tropicais, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWELL & REID, 1982). Sendo, portanto, um dos principais parasitos que afetam negativamente a pecuária entre os paralelos 32ºN e 32ºS. Este carrapato é um ectoparasito hematófago cujo principal hospedeiro é o bovino, encontrando-se amplamente distribuído nos rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania (LEAL *et al*., 2003). Sua presença é confirmada em todo o território nacional, sendo observado durante os 12 meses do ano em 66,04% dos municípios (HORN, 1983; SILVA & ROCHA, 2004).

2.1.2 Ciclo

O *R. microplus* é um carrapato monoxeno, ou seja, utiliza apenas um único hospedeiro para fechar o ciclo, realizando seu desenvolvimento total por meio de duas metamorfoses. O ciclo de vida dos carrapatos da família Ixodidae consiste na fase de ovo e 3 estágios ativos (larva, ninfa e adulto). Cada estágio alimenta-se apenas uma vez, embora as fêmeas separadas de seus hospedeiros possam reconectar-se e continuar sua alimentação interrompida (APANASKEVICH & OLIVER JR, 2013). Seu ciclo biológico pode ser dividido em duas fases: ciclo de vida parasitária, que dura em média 22 dias, e ciclo de vida livre ou não parasitária, que ocorre no ambiente e prolonga-se por, aproximadamente, três meses, dependendo, principalmente, das condições do clima da região (GONZÁLES, 2002).

A fase parasitária inicia quando as larvas presentes nas pastagens, sobem no hospedeiro, fixam-se por meio do aparelho bucal e então começam a se alimentarem de linfa, para posteriormente atingir o estágio de ninfa. Nesta fase, o carrapato imaturo se alimenta de sangue do animal parasitado. Posteriormente, ao atingem a fase adulta, acontece a fecundação das fêmeas e o ingurgitamento, quando passam a ser denominadas

teleóginas, (FURLONG & PRATA, 2005) que se desprendem do hospedeiro para realizarem a ovipostura no ambiente. Os machos são pequenos, cerca de dez vezes menores que a fêmea e permanecem por até 38 dias sobre o bovino onde podem fecundar inúmeras fêmeas. Neste período do ciclo biológico, o carrapato é pouco afetado pelas condições climáticas ambientais (PEREIRA *et al.*, 2008). Já a fase não parasitária (ambiental) se inicia após a queda da teleógina no solo, com o período de pré-postura, que tem em média, duração de dois a três dias. Cada fêmea tem capacidade de postura de 2000 a 3000 ovos viáveis, que em condições ideais de temperatura e umidade, irão eclodir em um período de aproximadamente 15 dias. Após a eclosão, as larvas tornam-se aptas para o parasitarismo dentro de quatro a seis dias. Sendo guiadas por estímulo luminoso, sobem na vegetação à procura do hospedeiro, apresentando geotropismo negativo (GONZALES, 1975). Nesse período, o carrapato não se alimenta e sobrevive exclusivamente das suas reservas (FARIAS, 2007).

O acasalamento ocorre a partir do 17º dia da infestação (LONDT & ARTUR, 1975) durante o repasto sanguíneo da fêmea. A taxa de sucesso de alimentação e potencial reprodutivo são altas e, em alguns casos, podem ser transmitidas da fêmea para a próxima geração por meio dos ovos (ANDERSON *et al*., 2008). Quando iniciam o parasitismo na forma de ninfa, geralmente são despercebidos pelos hospedeiros e não são facilmente deslocados. Suas secreções salivares iniciais impedem a coagulação do sangue, dilatam os capilares da pele, digerem os tecidos do hospedeiro, causam hemorragia extensa e fazem supressão de respostas inflamatórias do hospedeiro (KEMP & BINNINGTON, 1982). Os alvos mais freqüentes para inibição da cascata de coagulação são o fator Xa e a trombina. Essas duas moléculas fazem parte tanto da via extrínseca como da via intrínseca. A trombina desenvolve um papel central na hemostasia, não apenas convertendo fibrinogênio em fibrina, mas também por regular a sua própria produção pela ativação de outros fatores da coagulação (fV, fVIII, fXI, e proteína C). (PARIZI *et al.*, 2007)

Entre a grande maioria dos carrapatos ixodideos em circunstâncias normais, as fêmeas fecundadas consomem grandes quantidades de sangue e aumentam a massa corporal até 100 vezes. Após a ingurgitação completa, desprendem-se de seu hospedeiro e colocam seus ovos (APANASKEVICH & OLIVER JR, 2013).

A dinâmica populacional de *R. microplus* no estado do Rio Grande do Sul é caracterizada por um grande pico de abundância no outono, diminuindo no inverno, quando as condições climáticas se tornam desfavoráveis para as fases de vida livre. A

ectoparasitose dos bovinos volta a acontecer no início da primavera, onde ocorre a primeira geração de carrapatos, que se caracteriza por uma baixa infestação dos animais (MARTINS *et al.*, 2002).

2.1.3 Perdas econômicas

Cada fêmea adulta ingere cerca de 2 mL de sangue, sendo que cada teleógina ingurgitada é responsável pela perda de aproximadamente 1g de peso vivo e de 10mL de leite em vacas em lactação (SILVEIRA *et al*., 2014). Dentre os prejuízos causados, destacam-se as lesões no couro que reduzem o valor comercial do produto e favorecem a ocorrência de miíases, perda de peso, diminuição da taxa de reprodução, perdas na produção de carne e leite (KESSLER & SCHENK, 1998). Influenciam negativamente o bem-estar, o desenvolvimento de animais de produção, trazendo prejuízos econômicos relacionados ao stress, bem como aos custos com tratamentos (CAMILLO *et al.*, 2009).

Além disso, o carrapato é eficaz na transmissão de doenças devido ao carreamento de uma variedade de protozoários, rickettsias, vírus e bactérias para diferentes vertebrados no mundo inteiro (CUPP, 1991). É, portanto, vetor de agentes etiológicos da Tristeza Parasitária Bovina, *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp, (CORDOVES, 1997), caracterizando danos de ação indireta.

No ano de 2009, estudos avaliaram o impacto econômico da ação dos ectoparasitos na América do Sul e consideraram que, no Brasil, as perdas chegaram a 2,5 milhões de cabeças de gado, o que representou a perda de 75 milhões de quilogramas de carne, 1,5 bilhão de litros de leite, 8,6 milhões de dólares por danos secundários e 25 milhões de dólares em acaricidas químicos para combater as infestações por carrapatos (LIBERAL, 2017). A maior susceptibilidade dos rebanhos taurinos ao carrapato, refletem em perdas significativas relacionadas à produtividade e fertilidade. Resultados apresentados por O'Kelly e Spiers (1976) mostraram que, em sua primeira exposição aos carrapatos após o nascimento, os bezerros mestiços zebu foram mais resistentes que os de raças européias, apresentando, uma parcela de imunidade inata. Entre os mecanismos de defesa apresentados pelos animais considerados resistentes, sobressaem-se os de auto-limpeza, que tem demonstrado ser componente de grande importância no processo de resistência ao carrapato. Isso tem favorecido a opção pela criação de rebanhos zebuínos, animais que possuem carne de parâmetros organolépticos inferiores à de origem taurina

e, nas raças não especializadas, baixa aptidão leiteira (BRITO, 2009). Atualmente as perdas são estimadas em mais de US $ 3,90 bilhões de dólares (GRISI *et al.*, 2013).

2.1.4 Resistência e controle do *R. microplus*

Com o passar dos anos e pressão de seleção pelo uso de diferentes acaricidas, vários mecanismos foram desenvolvidos pelos carrapatos permitindo que estes sobrevivam aos diferentes tratamentos. O uso indiscriminado contribuiu para o aparecimento de diversos casos de resistência dos ixodídeos a várias drogas, o que representa um sério problema no controle dos mesmos, além de ser uma preocupação da sociedade e órgãos governamentais com os resíduos nos produtos de origem animal (CHAGAS *et al.*, 2004; CAMILLO *et al.*, 2009). Segundo FAO (2004) a resistência pode ser definida como um aumento significativo no número de carrapatos, capazes de tolerar doses de drogas comprovadamente letais para a maioria dos indivíduos da mesma espécie. A resistência dos *R. microplus* para os vários acaricidas aparecem cronologicamente com a sua utilização, um indício do desenvolvimento de resistência à campo é, quando o produto que anteriormente se mostrava eficiente para o controle, já não demonstra o mesmo efeito, desde que utilizado sob condições adequadas de aplicação (BENAVIDES *et al.*, 2001).

Dentre os principais mecanismos utilizados pelos carrapatos resistentes para sobreviver aos acaricidas, destacam-se a redução da taxa de penetração do produto, alterando o tegumento externo; as mudanças no metabolismo, armazenamento e excreção do produto químico e, mudanças no local de ação do produto (FURLONG & MARTINS, 2000). O caráter molecular da resistência pode ser resumido em aumento da expressão de genes ou aumento da atividade de enzimas envolvidas em metabolismo de detoxificação, mutações em neurorreceptores e mutações em canais de sódio (RUFINGIER et al, 1999). Para isso, três sistemas enzimáticos podem estar envolvidos no metabolismo de inseticidas em geral: as citocromos P450, as esterases e as glutationas S-tranferases (RANSON et al.,2002).

Os citocromos P450 são um grupo de enzimas que catalisam uma grande variedade de reações químicas e agem sobre diversos substratos, oxidando compostos endógenos e exógenos ou tornando os compostos tóxicos mais solúveis, facilitando a sua excreção. As P450 monoxigenases são enzimas capazes de detoxificar artrópodes, inclusive *R. microplus* de piretróides e organofosforados (LEE *et al.*, 2002). As esterases

estão envolvidas na detoxificação de organofosforados, em especial as acetilcolinesterases (AChE) e as carboxipeptidases. E por fim, as glutationas S-tranferases, são capazes de conjugar a glutationa reduzida aos centros eletrofílicos de compostos exógenos e endógenos, para formar um composto mais solúvel e fácil de ser excretado. Elas são responsáveis pela detoxificação de organoclorados, organofosforados e piretróides sintéticos (LI *et al.*, 2007) e ivermectina (STUMPF & NAUEN, 2002).

Características de resistência apresentadas pelos carrapatos são genéticas e de caráter irreversível: descendentes de indivíduos resistentes também serão resistentes, e, se houver estabelecimento da resistência a um produto, a suspensão do uso do mesmo por um determinado período não o habilitará a um novo uso eficaz (GONZÁLES, 1975). Além disso, o *R. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período entre as gerações (SABATINI, 2001), demonstrando a necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle.

Após a morte dos parasitos sensíveis, há o acasalamento dos resistentes, propagando o alelo resistente na população sobrevivente. (FURLONG & MARTINS, 2000). Logo, escolha e utilização correta de antiparasitários, assim como a mudança de produto quando necessário, são fatores preponderantes para a obtenção dos resultados satisfatórios, pois o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes tem ocorrido, historicamente, após algum tempo de utilização da maioria dos carrapaticidas lançados no mercado (SILVEIRA *et al.*, 2014).

Carrapaticidas podem ser classificados em famílias ou grupos químicos, além de conforme sua atuação, sendo, sistêmicos ou de contato. Compostos sistêmicos são metabolizados pelo organismo e distribuídos a todo o corpo do animal, chegando, através da circulação, aos carrapatos. Compostos de contato são aplicados por meio de pulverização, imersão ou *pour on*. Para agirem é necessário o contato do produto com o carrapato o qual acaba penetrando pelos orifícios naturais ou mesmo pela cutícula, provocando a intoxicação e morte do parasito. Estes produtos, assumiram um papel importante no controle do *R. microplus* desde o início do século, quando a ixodidose passou a ser encarada como um sério problema na criação de gado (CHIMINAZZO *et al.*, 2004). Apesar de serem usados amplamente há muito tempo, muitas vezes se observa o emprego destes compostos de maneira incorreta, sem considerar os conhecimentos básicos do ciclo do parasito. (ROCHA *et al.*, 2006).

No Brasil, foram registradas populações de carrapatos resistentes a maioria das classes de drogas usadas para o seu controle. Farias (1999) relatou casos de resistência a

organofosforados e piretróides sintéticos; Furlong (1999) ao amitraz na região sul e sudeste. Em meados da década de 90, intensificou-se o uso das lactonas macrocíclicas, servindo como uma alternativa no controle de populações resistentes aos compostos citados anteriormente, e pela facilidade de aplicação. O resultado desse uso intensificado foi o surgimento de populações de campo resistentes a esse grupo químico (MARTINS & FURLONG, 2001) e posteriomente foi detectada resistência à ivermectina através de testes *in vitro* (KLAFKE *et al*., 2006). Castro-Janer *et al*. (2010) confirmaram a ocorrência de populações de carrapatos resistentes ao Fipronil no Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo e, mais recentemente a resistência ao Fluazuron no estado do Rio Grande do Sul (RECK *et al.*, 2014). Há muito tempo, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides sintéticos e amitraz foram usadas sequencialmente. Mais recentemente, foram introduzidas no mercado avermectinas, reguladores de crescimento, fipronil e spinosad. A resistência à Arsenicais apareceu em 1960, para organofosfatos, no final da década de 1970, e aos piretróides sintéticos no início da década de 1990 (CARDOZO & FRANCHI, 1994).

O controle de parasitos bovinos através de produtos químicos convencionais, além do entrave relacionado aos resíduos nos alimentos, esbarra em problemas relacionados ao desenvolvimento acelerado da resistência. Isto, tem levado os fabricantes e produtores a utilizarem concentrações mais altas, que, ainda assim, muitas vezes não são eficazes. (VIVAN, 2004). Ectoparasiticidas convencionais e seus metabólitos são potencialmente tóxicos a animais de sangue quente, havendo ainda, possibilidade de contaminação dos produtos de origem animal. Os riscos para o consumidor decorrem da insignificante barreira natural entre a aplicação do produto e a contaminação dos alimentos, e do fato de que os parâmetros para segurança alimentar do consumidor são assuntos negligenciados (CHAGAS *et al.*, 2004). Furlong e Martins (2000) salientam que na tentativa de continuar a utilizar o mesmo grupo químico ou família de carrapaticida em que se evidencia resistência, pode ser possível o uso em associação com produtos de diferentes modos de ação.

A necessidade de métodos mais seguros e menos agressivos têm estimulado a busca de novas alternativas, como produtos oriundos de extratos de plantas e até mesmo fármacos que não apresentem agressividade excessiva. Segundo Furlong *et al.* (2007) a situação é crítica no Brasil, tanto quanto nos demais países de clima tropical, e se nada for realizado, o produtor não disporá mais de produtos comerciais capazes de controlar os carrapatos do rebanho com eficácia, economia e segurança. Se faz imprescindível a

pesquisa sobre novas alternativas carrapaticidas, tendo em vista o crescente desafio no controle do carrapato.

2.2 SILOXANOS ORGANO-MODIFICADOS

O produto “Provecta ®” (ICB Pharma) consiste em um Siloxano organo modificado, sendo uma mistura única de compostos poliméricos que combinados em tanques de pulverização com inseticidas para um tratamento mais efetivo. Atualmente é comercializado em países como a Alemanha e Polônia. Originalmente, a recomendação é de que este composto seja misturado com outros inseticidas para controle de populações resistentes de insetos. Os fabricantes também disponibilizam um produto semelhante, denominado “Dergall ®” , o qual é utilizado em forma de aplicação direta em aves para gestão e combate de ácaros. Ambos produtos trazem modo de ação físico, e por isso, tornam-se candidatos perfeitos para uma alternativa segura e eficaz, retardando o desenvolvimento de resistência (LISZKA & DHANG, 2014).

Segundo Montório *et al*. (2005), o acréscimo de surfactantes contribui para a formação de filmes líquidos devido o processo de coalescência de gotas de água. Surfactantes de silicone são um grupo de moléculas pequenas e poliméricas que apresentam uma grande variedade de aplicações devido às propriedades incomuns (RANDAL, 2002). Ainda, apresentam conformação molecular bastante maleável devido à ligação carbono-silício, o que propicia a condição para que o grupamento hidrófobo do surfactante seja mais paralelo à superfície da gota, do que o grupamento hidrófilo que se estende mais para o interior (MONTÓRIO *et al.*, 2005). Isso faz com que aconteça redução da tensão superficial mais rapidamente e com valores menores da tensão superficial do que aqueles observados para os surfactantes não organo-siliconados. Evidenciam conformação mais rígida, devido às ligações carbono-carbono (COSTA, 1997).

Embora estes tipos de surfactantes historicamente tenham sido utilizados na melhoria de formulações agrícolas, o conceito do produto também pode ser aplicado ao controle de parasitos e insetos comuns aos meios urbanos como percevejos, moscas, mosquitos, carrapatos, entre outros. A utilização do Siloxano organo modificado como acaricida permite que seja mantida a susceptibilidade dos parasitos e retarde a resistência estabelecida. Gera uma ação de contato específica, resultando em desidratação, imobilização e eventual sufocamento no parasito (LISZKA & DHANG, 2014).

Tendo em vista o potencial sinérgico do BPO, faz-se presente a hipótese de que possa contribuir para a otimização dos resultados em associação com os siloxanos organo-modificados, uma vez que há vastos relatos trabalhos comprovando seu efeito.

3 CAPÍTULO 1

(Artigo submetido à revista Veterinary Parasitology)

In vitro and *in vivo* acaricidal activity evaluation of organo-modified siloxanes in populations of *Rhipicephalus microplus*.

Authors: Camila Balconi Marques[1]*, Fernanda Ramos[1], Fagner Fernandes[1], Luís Antônio Sangioni[1], Gláucia Kommers[2], Fernanda Silveira Flores Vogel[1]

[1] Laboratório de Doenças Parasitárias (Ladopar), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, prédio 44, sala 5139, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

[2] Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, prédio 44, sala 5139, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.Santa Maria, RS, Brazil.

[1]* balconi.camila@gmail.com

Abstract

The infestation by *Rhipicephalus microplus* causes great damage to cattle breeding and its control form is carried out basically through chemical products. There are extensive reports of efficacy losses of the carrapaticid products over time, as well as resistance of the parasites on them, making it necessary to search for new alternatives. The present work aimed to determine the *in vitro* and *in vivo* acaricidal activity of organo-modified Siloxanes associated or not with Piperonyl Butoxide (PBO) in southern Brazil. For the *in vitro* test, engorged females of *R. microplus* were collected, which were submitted to the teleogines immersion test. The formulation containing organo-modified siloxanes was tested at 4 different concentrations: 0.6, 1.0, 2,5 and 5.0%, being that the lowest dilutions (0.6, 1.0 and 2.5%) were also tested in association with PBO 10%. In parallel, acaricides

were tested as a positive control for the carrapaticid effect. The *in vivo* test was carried out by application of 2.5% organo-modified siloxanes, as well as its association with PBO 10%, by spraying. The results revealed high acaricidal activity (100%) *in vitro* in the concentration of 5% on non-associated form, and in combinations of concentrations of 0.6; 1.0; 2.5% with PBO. The *in vivo* results also increased with the association of PBO, being that the efficacy significantly improved. In view of the current multi-resistance scenario of the *R. microplus* tick to the different commercially available acaricidal products, this work aimed at the use of this product in association with PBO as an alternative to *R. microplus* control and the results were positives. To the authors knowledge, this is the first study using organo-modified siloxanes against ticks.

Keywords: acaricide, resistance, cattle, tick, PBO.

Introduction

Rhipicephalus microplus is a monoxene tick, considered the main and most important ectoparasite that affects bovines between the between the 32º North and South parallels (Mathias et al., 2013). Among the damages caused, there are injuries in leather, decrease in reproduction rate, weight and production loss (Kessler and Schenk, 1998), leading to estimated losses of US $ 3.24 billion per year (Grisi et al., 2014). In order to control this situation, acaricides have played an important role in the control of *R. microplus* since the beginning of the century, when ixodidiosis was considered a serious problem in cattle breeding (Chiminazzo et al., 2004).

It is known that the indiscriminate use of acaricidal products contributed to the appearance of several cases of resistance to several drugs (Chagas et al., 2004). This fact represents a serious problem in the control of ticks, as well as being a concern of society and government agencies with residues in animal products (Camillo et al., 2009). In

Brazil, there were registered populations of ticks resistant to most of the classes of drugs used for its control. Arantes et al. (1995) reported cases of resistance to organophosphates and synthetic pyrethroids; Nolan (1994) reported initial traits to amitraz resistance in the south and southeast regions, being confirmed years later. In the mid-1990s, the use of macrocyclic lactones was intensified, serving as an alternative in the control of populations resistant to the aforementioned compounds, and by the ease of application. The results of this massive use were the emergence of field populations resistant to this chemical group (Martins and Furlong, 2001) and later ivermectin resistance was detected through in vitro tests (Klafke et al., 2006). Castro-Janer et al. (2001) confirmed the occurrence of Fipronil-resistant tick populations in Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, and more recently, resistance to Fluazuron in the state of Rio Grande do Sul (Reck et al., 2014).

Organo-modified siloxanes are compounds that generate a specific contact action, resulting in dehydration, immobilization and eventual suffocation in the parasite. They provide physical mode of action, and therefore, they become perfect candidates for a safe and effective alternative, delaying the development of resistance (Liszka and Dhang, 2014). Piperonyl butoxide (PBO) was semi-synthesized from safrole, the main component of camphor oil (Knowles, 1991; Tozzi, 1998). It is a liquid with coloration next to the colorless or pale yellow, is moderately stable as it is resistant to hydrolysis, oxidation and exposure to sunlight (Kidd and James, 1994). Since its discovery, and since pesticide resistance has emerged as a problem, PBO has often been used as an insecticidal synergist in over 1700 insecticides (USEPA, 2002). It is commonly associated with synthetic pyrethrins and pyrethroids, including in human and veterinary medicine (Tozzi, 1999). Considering the need of new alternatives for the control of *R. microplus*, this work

was carried out to evaluate the *in vitro* and *in vivo* acaricidal activity of organo-modified siloxanes in populations of *R. microplus*, associated or not with PBO.

Material and Methods

The organo-modified siloxanes were administered using the product "Provecta ®" (ICB Pharma) which more specifically, contains Polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane and its Chemical Abstracts Service Number is 67674-67-3.

The use of animals for this study was approved by the animal experiment ethics committee of the Federal University of Santa Maria under the protocol number 2881260318.

In vitro tests

The adult immersion test (AIT) described by Drummond et al. (1973) was performed. *R. microplus* engorged females were collected from naturally infested cattle. For each battery of *in vitro* tests were used approximately 200 teleogines collected from animals that have not been treated with contact mode of action products, for at least 21 days, and that have not been treated with systemic mode of action products.

The collected teleogines were maintained refrigerated until the completion of the tests. The period between collection and testing did not exceed 24 hours. The engorged females were weighted and divided into groups containing 10 teleogines.

To the inicial steps, each group was weighed, dipped in a different concentration (described in Table 1) of organo-modified siloxanes in water for 5 minutes, drained, allowed to dry on paper toweling. It is important to explain that the lower concentration of the product was chosen due to stipulated value for treatments of bird mites, already

used in other countries. The *in vitro* efficacy was established using the formulas described by Drummond et al. (1973):

RE = reproductive efficiency:

RE= (eggs weight x % of hatching eggs x 20.000) / teleogines weight

(The 20.000 in this formula is an estimate of the number of larvae in 1g of eggs.)

INR = % of reproduction inibition:

INR = (RE of the control group - RE of the treated group) / RE of the control group x 100

For the interpretation of the results, it was considered as efficacy of the active ingredients the minimum value of 95%, according relevant legislation for the commerce of tick pesticides in the country (Brasil,1989), besides the viability evaluation of the strains by observing the reproductive efficiency of the control group. Also, acaricidal products containing organophosphate and pyrethroid were tested as a parameter of products currently on the market.

Histopathology

R. microplus engorged females of the control group and the submitted to treatment with Organo-modified Siloxanes were used for histological evaluation The selected concentration for the analysis in the teleogines corresponded to the Group 5. The engorged females were fixed in 10% formaldehyde solution for 15 days and then sectioned in a coronal plane. The two sections of each teleogines were processed for histopathology and embedded in paraffin. After that, histological sections of 3 micrometers were cut, stained by hematoxylin and eosin technique and mounted on a

Histological blade and coverslip with synthetic mounting medium. Histopathological data were used for pre and post treatment comparison.

In vivo tests

Animals from four rural properties in the central region of the state of Rio Grande do Sul were used. To the inclusion of the animals at the experimental groups, the same care of the previous experiment was used. In addition, only animals that had a certain infestation rate were selected: minimum counts of 40 engorged females. At day -2, counts of teleogines larger than 4.5 mm were performed. For this, the animals were contained and ticks with a size of 4.5 mm to 8.0 mm on one side of the cattle were counted and multiplied the by two (Holdsworth et al., 2006), the procedure was repeated in all animals.

Three experimental groups were determined based on average concentration value (Untreated control, organo-modified siloxanes 2.5%, organo-modified siloxanes 2.5% + PBO 10%), containing 10 animals each. The applications were performed by manual spraying using a costal pulverizer with 5 liters of the diluted product directed against the hair, throughout the body of the animal, avoiding hours of strong sun and rainy days. Efficacy was determined by comparing pre (day -2) and post-treatment (day 7) counts. All animals were submitted to reassessment, were recounted the live teleogines in the animal's leather and consequent evaluation of the efficacy of the product used was perfomed. The percentage of efficacy against *R. microplus* was calculated using arithmetic means, according to a formula proposed by Roulston et al. (1968) and recommended by Ordinance no. 48 of May 12, 1997, item 2.4.2, field test of acaricidal product (Brasil, 1997). Where:

Ta: average number of teleogines post-treatment (day 7).

Tb: average number of teleogines at the – 2 day before treatment.

Ca: average number of control teleogines at the day 7.

Cb: average number of control teleogines at the -2 before treatment.

Efficacy (%) = [1 – (Ta x Cb / Tb x Ca)] x 100

Results and discussion

The results obtained in this study are shown in Tables 1 and 2. It can be determined that both in *in vitro* and *in vivo* tests the organo-modified siloxanes showed significant results (P> 0.05) when compared with the control group of *R. microplus* tested.

The *in vitro* tests demonstrated that the organo-modified siloxanes show acaricidal activity. In groups submitted to non-associated organo-modified siloxanes in different concentrations, only the 5% concentration was effective in all tested *R. microplus* samples (100%). The 2.5% concentration obtained 80%, while groups with 0.6 and 1.0% concentration presented values of 71.2% and 79.6%, respectively, measured by percent inhibition of reproduction (INR%). Although the acaricidal activity of organo-modified siloxanes in populations of *R. microplus* has not been previously tested, the high acaricidal efficacy observed in this work is not surprising since this product had efficacy in bird mites and bedbugs (Liska and Dhang, 2014). To the present, this was the only work that brought a description of the acaricidal activity of the organo-modified siloxanes on ticks.

It was also observed that the groups submitted to treatments in association with PBO presented significantly better results (P> 0.05) than of groups that used only organo-modified siloxanes. When analyzing the effectiveness of the organo-modified siloxane in combination with PBO was detected 100% of efficacy, independent of the concentration of the organo-modified siloxane (Table 1) showing that at lower concentrations (0.6, 1.0 and 2.5, %) high efficacy was observed only when associated with PBO.

In the *in vivo* tests (Table 2), Organo-modified Siloxanes 2.5% obtained 93,70% of efficacy, while the result was 98.75% for organo-modified siloxanes 2.5% + PBO 10% formulation. The choice of the organo-modified Siloxanes concentration for *in vivo* testing was determined by the results obtained in the *in vitro* tests. The *in vivo* results also showed that the association of PBO is related to a high synergistic efficacy. This has already been demonstrated by Tozzi et al. (1999) that tested the association of this with a wide range of insecticides.

Although the results obtained in the present study are promising as to the use of this product in vivo, further studies need to be conducted using higher concentrations of organo-modified siloxanes in association with PBO. The data obtained in this work are of great importance, may represent a new alternative and strategy of tick control in different production systems, since acaricidal efficacy of Organo-modified Siloxanes associated or not with PBO has been demonstrated. The determination of a product with acaricidal activity is extremely important in view of the issue of resistance to acaricides already commercially available by the ticks.

Little is known about the mechanism of action of the Organo-modified Siloxanes, it is believed that they act specifically by contact determining dehydration, immobilization and eventual inactivation by suffocation in the parasite (Liszka and Dhang, 2014). The histopathological analysis and comparison of the tissues of pre and post-treatment teleogines corroborate this hypothesis. Comparing the tissues of engorged females pre and post-treatment (Figure 1), can be observed disintegration of tissues and cells after treatment. This disintegration of the cells and tissues is observed in the totality of the teleogine. It is believed that lack of oxygenation may be the cause of this loss of cellular structures and damage.

Currently, the greatest difficulty controlling the cattle ticks is the maintenance of drug efficacy and the consequent resistance of these ticks to acaricides (Veríssimo, 2013). In Brazil, the resistance of tick populations to ticks is generalized. Thus, the high cost of treatment associated with the rapid emergence of resistant to conventional products ticks (Furlong, 2004), as well as residues in food and environmental pollution caused by its use, encourage the search for alternatives, such as fitoterapy (Nicolino, 2013). This alternatives to bovine tick control may be discussed as the selection of naturally more resistant animals (Villares, 1941), biologic control (Veríssimo, 2013) and utilization of phytotherapics that can be associated with conventional production systems, seeking to increase the useful life of the chemicals (Vieira and Cavalcante, 1999). Thus, these methods still do not completely replace the use of acaricides (Leal et al., 2003).

In this sense, it is suggested that the use of Organo-modified Siloxanes can contribute both to retard the process of resistance development and to increase the percentage of parasites susceptible to a certain active principle. This assumption is due to the mode of physical action, and therefore, they become perfect candidates for a safe and effective alternative, retarding the development of resistance (Liszka and Dhang, 2014). Given the general effectiveness of organo-modified siloxanes, one can also think of the association of this with acaricides already used to improve their effectiveness.

Conclusion

Based on the results obtained in the present work, it was concluded that the formulation of organo-modified siloxanes demonstrated high acaricidal activity (100%) *in vitro* in the concentration of 5% on non-associated form, and in combinations of concentrations of 0.6; 1.0; 2.5% with PBO. The *in vivo* results also increased with the association of PBO, being that the efficacy significantly improved of 93,70% (organo-

modified siloxanes 2.5%) to 98,75% (organo-modified siloxanes 2.5% + PBO 10%). This study demonstrated *in vitro* and *in vivo* acaricidal activity of organo-modified siloxanes on engorged females of *R. microplus* and that the association with PBO potentiates the action of the organo-modified siloxanes, also allowing the use of a lower concentration of this one. Therefore, it is suggested that the use of organo-modified siloxanes associated or not with PBO may be an excellent alternative for the control of *R. microplus*. However, other studies need to be conducted principally *in vivo* to better characterize both concentration/efficacy, forms of application and interval between treatments.

References

Arantes, G.J., Marques, A.O., Honer, M.R., 1995. O carrapato do bovino, *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: análise da sua resistência contra carrapaticidas comerciais. Revista Brasileira Parasitologia Veterinária; 4(2): 89-93.

Brasil MAPA. Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários. P*ortaria n. 90*, 04 de dezembro de 1989.

Brasil MAPA. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de
Licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Portaria n. 48, 16 de maio de 1997.

Camillo, G., Vogel, F.F., Sangioni, L.A., Cadore, G.C., Ferrari, R., 2009. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural; 39(2): 490-495.

Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T., 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks *(Rhipicephalus (Boophilus) microplus)* using in vitro larval bioassays. Veterinary Parasitology; 173: 300–306

Chagas, A.C.S., Prates, H.T., Leite, R.C., 2004. Proteção Natural contra o carrapato. Ciência Hoje; 34(203): 58-59.

Chiminazzo, C., Silva, F.R.C., Ceresér, V.H., Queirolo, M.T.C., Bittencourt, H.R., 2004. Eficácia de Carrapaticidas Amidínicos para o Controle *do Boophilus Microplus*: Influência do pH da Calda Carrapaticida. Veterinária em Foco; 2(1).

Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. Boophilus annulatus and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. Journal of Economic Entomology; 66(1): 130-133.

Furlong, J., 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. A Hora Veterinária*;* 23(137): 53-56.

Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D, León, A.A., Pereira, J.B., Villela, H.S, 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária; *23*(2): 150-156.

Holdsworth, P.A., Kemp, D., Green, P., Peter, R.J., De Bruin, C., Jonsson, N.N., Letonja, T., Rehbein, S., Vercruysse, J., 2006. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. Veterinary Parasitology; 136(1): 29-43.

Kessler, R.H., Schenk, M.A.M., 1998. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, p.9-33/74-61, 157p,

Kidd, H., James, D.R. (eds), (1994). The agrochemicals handbook 3rd edn. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Klafke, G.M., Sabatini, G.A., De Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker, T.T., 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. Veterinary Parasitology; 142: 386-390.

Knowles, C.O., 1991. Miscellaneous pesticides. In: Hayes WJ, Laws ER. Handbook of pesticide toxicology*;* San Diego: Academic Press; p. 1471.

Leal, A.T., Freitas, D.R.J., Vaz Jr, I., 2003. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. Acta Scientiae Veterinariae; 31: 1-11.

Liszka, D., Dhang, P., 2014. Provecta: a new approach to the inhibition of resistance to insecticides. International Pest Control, 56(5).

Martins, J.R., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus. Brazil. Vet Record*; 149(2): 64.

Mathias, M.I.C. *Guia Básico de Morfologia Interna de Carrapatos Ixodideos*. Editora Unesp;2013.

Nicolino, C.A., 2013. Avaliação in vitro de fitoterápicos no controle de *Rhipicephalus boophilus microplus*. *Nucleus Animalium*; 5(1): 2175-1463.

Nolan, J. Acaricide resistence in the cattle *tick Boophilus microplus*. In: *REPORT OF WORKSHOP LEADER - FAO/UN consultant*. Abstract; 1994. p. 21-25.

Reck, J., Klafke, G.M., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., Vargas, R., dos Santos, J.S., Martins, J.R., 2014. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. Veterinary Parasitology; 201: 128–136.

Tozzi, A. A Brief History of the Development of Piperonyl Butoxide as an Insecticide Synergist. In: Jones DG. *Piperonyl Butoxide the insecticide synergist*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 1-5.

United States Environmental Protection Agency. *USEPA/OPP chemical ingredients database* [online]. 2002 [cited 2018 Jun 05]. Available from: www.cdpr.ca.gov.

Veríssimo, C.J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. Revista de Educação Continuada de Medicina Veterinária e Zootecnia CRMV-SP 2013; 11(1): 14-23.

Vieira, L.S., Cavalcante, A.C.R., 1999. Resistência antihelmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. Pesquisa Veterinária Brasileira; 19(3): 99-103.

Villares, J.B., 1941. Climatologia zootécnica III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. *Boletim de Indústria Animal*; 4: 60-86.

Roulston, W.J, Wharton, R.H., Nolam, J., Kevr, J.D., 1978. Acaricide tests on the bjarra strain of organophosphorus resistant cattle ticks *Boophilus microplus* from southern Queensland. *Aust Vet J*; 43: 129–134.

Table 1 – *In vitro* efficacy of the different concentrations of organo-modified siloxanes determined by percentage of inhibition of reproduction (% INR) in different populations of *R. microplus*.

Group	**Nº of Observations**	**Efficacy (%INR)**	**Standard-Deviation**
Chlorpyrifos 30%, Cipermetrin 15%, Fenthion 15%	10	96,23	8,52
Organo-modified siloxanes 0.6%	10	71,22	20,24
Organo-modified siloxanes 0.6 + PBO 10%	10	100	0
Organo-modified siloxanes 1.0%	10	79,6	12,7
Organo-modified siloxanes 1.0 + PBO 10%	10	100	0
Organo-modified siloxanes 2.5%	10	80	18,68
Organo-modified siloxanes 2.5 + PBO 10%	10	100	0
Organo-modified siloxanes 5%	10	100	0

Table 2 – *In vivo* efficacy of treatments using organo-modified siloxanes associated or not with PBO, determined by the percentage of reduction of infestation rate by *R. microplus.*

Group	Nº of Observations	Efficacy (%INR)	Standard-Deviation
Organo-modified siloxanes 2.5%	3	93,70%	8,07
Organo-modified siloxanes 2.5 + PBO 10%	4	98,75%	1,5

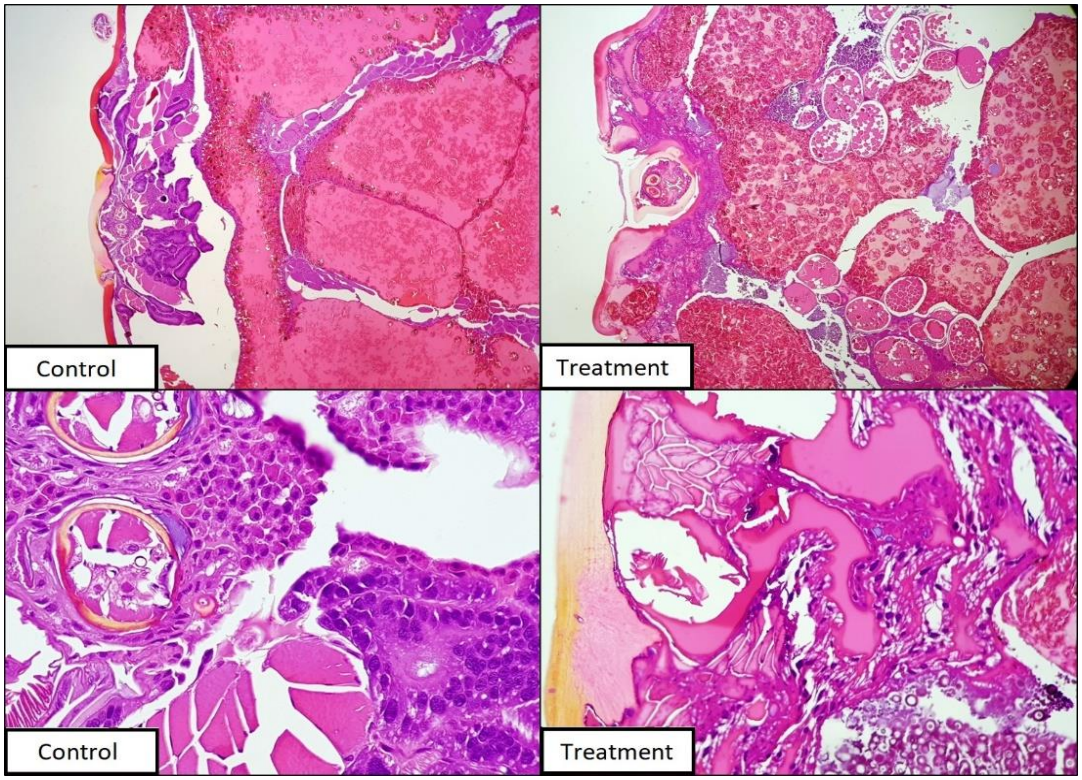

Figure 1 – Histological sections colorated with HE of unprocessed *R. microplus* (Control) and seven days after treatment with organo-modified Siloxanes 2.5% + PBO 10% (Treatment).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do experimento realizado permitem concluir que os siloxanos organo-modificados demonstraram atividade acaricida (100%) *in vitro* na concentração de 5% na forma não associada, e em combinações de concentrações de 0,6; 1,0; 2,5% com BPO. Em formas não associadas com BPO, a concentração de 0,6 % obteve 71,22% de eficácia, enquanto os grupos com concentração de 1,0% e 2,5% de siloxanos organo-modificados apresentaram valores de 79,6% e 80%, respectivamente. Devido modo de ação físico, sugere-se que possa contribuir tanto para retardar o desenvolvimento de resistência como para efeito sinérgico quando associado a produtos de modo de ação químico. Este dado é extremamente relevante uma vez a ixodidiose bovina é uma infestação de grande importância mundial e responsável por importantes prejuízos econômicos. Assim, evidencia-se a necessidade de estudos envolvendo alternativas acaricidas seguras e eficazes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.F.; MAGNARELLI, L.A. Biology of ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, p. 195–215, 2008.

APANASKEVICH, D.A.; OLIVER JR, J.H. Life Cycles and Natural History of ticks. In: SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M. **Biology of ticks.** v. 1, 2. ed., Nova Iorque: Oxford University Press, p. 59-73, 2013.

BENAVIDES, O. E. *et al*.; Evaluación preliminar de extractos Del Neen (*Azadirachta indica*) como alternativa para el control de La garrapata del ganado *Boophilus microplus (*Acari: ixodidae*).* **Revista Colombiana Entomologia,** v. 27, n. 1-2, p. 1- 8, 2001.

CARDOZO, H.; FRANCHI, M. Garrapata: Epidemiología y control de Boophilus microplus. **Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos**. Bases epidemiologicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay. Montevideo, Uruguay, p. 369–407, 1994.

CASTRO-JANER, E.; *et. al.*; Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks *(Rhipicephalus (Boophilus) microplus)* using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology.** v.173, p.300–306, 2010.

CHAGAS, A.C.S.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C. Proteção Natural contra o carrapato. **Ciência Hoje**, v.34, n.203, p.58-59, 2004.

CHIMINAZZO, C.; *et al.*; Eficácia de Carrapaticidas Amidínicos para o Controle do Boophilus Microplus: Influência do pH da Calda Carrapaticida. **Veterinária em Foco**, v.2, n.1, 2004.

CORDOVÉS, C.O. Carrapato: controle ou erradicação. Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, 197p.1997.

COSTA, E.A.D. **Efeitos de surfatantes sobre a tensão superficial de soluções de rodeo**. 72p. Dissertação (mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 1997.

COTTON, E. C.; The North American fever tick. **University of Tennessee Agricultural Experiment Station**, v. 113, p. 33-67, 1915.

CUPP, E.W. Biology of ticks. **Veterinary Clinics of North America.** Philadelphia, v. 21, n.1, p.1-26. 1991

DRUMMOND, R.O.; *et al*.; Boophilus annulatus and B. microplus: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology,** 66(1): 130-133, 1973.

FAO, 2004. Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. pp. 25-77.

FARIAS, N.A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos.** 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007, p. 524-532.

FARIAS, N.A. *et al*.; Situación de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* en la región sur de Rio Grande do Sur, Brasil. In: **4 Seminario Internacional de Parasitología,** 1999; Puerto Vallarta. Mexico: Conasag; p. 25-31, 1999.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, nº 159, 2007.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A. **Conhecimento básico para controle do carrapato dos bovinos. Carrapatos: problemas e soluções**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2005, p. 9-20.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Juiz de Fora: CNPGL-EMBRAPA, 25p. (Boletim Técnico 59), 2000.

FURLONG, J.; Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* to acaricides in Minas Gerais satate, Brazil. In: **IV SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL**, Puerto Vallarta, Jalisco, México, p. 41-46, 1999.

GONZALES, J.C**. O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Editora Sulina, p.13-46/57-65, 103p, 1975.

GONZÁLES, J.C. O Carrapato dos bovinos Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, ano 21, n. 125, p. 23-28, 2002.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R. **Impacto econômico das parasitoses em bovinos no Brasil**. Campo Grande, 13 de abril de 2013. Palestra proferida na Conferência Nacional para Atualização das Perdas Econômicas pelas Parasitoses, EMBRAPA/CNPGC.

HENNESSY, D. R. Physiology, pharmacology and parasitology. **International Journal for Parasitology**. v. 27, p. 145-52, 1997.

HORN, S.C. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos**. Boletim da Secretaria de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, 1983.

KEMP, D.H.; STONE, B.F.; BINNINGTON, K.C. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. **Physiology of ticks**. Oxford (UK): Pergamon Press; p. 119–68. 1982.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, p.9-33/74-61, 157p, 1998.

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

LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J.; VAZ JUNIOR, I.S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n.1, p.1-11, 2003.

LEE, A. J. *et al.*; Expression and characterization of a *Psoroptes ovis* glutathione s-transferase. **Veterinary Parasitology.** v. 105, n.1, p. 49 – 63, 2002

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUN, M. R.; Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**. v. 52; p. 231-53; 2007.

LIBERAL, M.H.T. **Controle Integrado de Carrapatos em Gado Bovino**. Disponível em: <http://www.pesagro.rj.gov.br/carrapato.html> Acesso em: 02, jun, 2017.

LISZKA, D.; DHANG, P. Provecta: a new approach to the inhibition of resistance to insecticides. **International Pest Control**, v. 56, n. 5, 2014.

LONDT, J.G.H.; ARTHUR, D.R.; The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **Journal of Entomological Society of South Africa,** v. 38, p. 321-40, 1975.

MARTINS, J.R.; FURLONG, J.; Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**. v. 149, n. 2, p. 64, 2001.

MONTÓRIO, G.A.; *et al.*; Eficiência dos surfatantes de uso agricola na redução da tensão superficial. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 8 a 22, ago. 2005. ISSN 2236-1065. Disponível em: <http://www.rbherbicidas.com.br/index.php/rbh/article/view/21>. Acesso em: 12 Jul. 2017.

O'KELLY, J.C.; SPIERS, W.C. Resistance to Boophilus microplus (canestrini) in genetically different types of calves in early life. J. Parasitol. v. 62, n. 2, p. 312-317, 1976.

PARIZI, F.L.; MASUDA, A.; VAZ JUNIOR, I.S. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 285-294, 2007.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KAFKLE, G.M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, Controle e Resistência.** MedVet, São Paulo, p. 169, 2008.

POWELL, R.; REID, T.; Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**. v. 108, n.6, p. 279-300.1982.

RANDAL, M.H. Silicone surfactants — new developments, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Volume 7, Issue 5, Pages 255-261, ISSN 1359-0294. 2002.

RANSON, H.; Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science.** v. 4, n. 298, p.179-81, Oct, 2002.

RECK, J.; *et al.*; First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology.** V.201, p.128–136, 2014.

ROCHA C.M., *et al.*; Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato Boophilus microplus (Acari: Ixodidae), **Ciência Rural** 36(4):1235-1242. 2001.

RUFINGIER, C. e*t al.*; mechanisms of insecticide resistance in the aphid *nasonovia ribisnigri* (mosley) (homoptera: aphididae) from france**. Insect biochemistry molecular biology.** v**.**29, n. 4, p.385-91. Apr, 1999.

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

SILVA, C.R.; ROCHA, U.F. Estudo sazonal da dinâmica populacional dos estágios parasitários de *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) na pele de hospedeiros da raça gir. **A Hora Veterinária**, v.24, n.142, p.19-22. 2004.

SILVEIRA, W.H.; CARVALHO, G.D.; PECONICK, A.P. Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 10, Ed. 259, Art. 1715, Maio, 2014.

STUMPF, N.; NAUEN, R.; Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranycus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 72, p.111-121, 2002.

VIVAN, M.P. **Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*).** 72f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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