

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO COMPARATIVO DA EFETIVIDADE DOS ACARICIDAS NO COMBATE
AO CARRAPATO *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:
Ixodidae) NAS REGIÕES DE ARUJÁ E PINDAMONHANGABA
NO ESTADO DE SÃO PAULO

SOSUKE TAKAHASHI

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:

DR. GONZALO EFRAIN MOYA BORJA

TESE SUBMETIDA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM MEDICINA VE-
TERINÁRIA, ÁREA DE CONCENTRA-
ÇÃO EM PARASITOLOGIA VETERINÁ-
RIA

Itaguaí, Rio de Janeiro
setembro, 1985

TÍTULO DA TESE

ESTUDO COMPARATIVO DA EFETIVIDADE DOS ACARICIDAS NO
COMBATE AO CARRAPATO *Boophilus microplus* (Canestri-
ni) (Acarina: Ixodidae) NAS REGIÕES DE ARUJÁ E
PINDAMONHANGABA NO ESTADO DE SÃO PAULO

AUTOR

SOSUKE TAKAHASHI

DR. GONZALO EFRAIN MOYA BORJA
Presidente

DR. HUMBERTO MACHARETTI

DR. GENEROSO MANOEL CHAGAS

À minha esposa Fátima

Ao meu filho Ákira

Aos meus pais Gunji e Teruko

BIOGRAFIA

SOSUKE TAKAHASHI, filho de Gunji Takahashi e Teruko Takahashi, nasceu em 20 de junho de 1946, em Miyagi, Japão, onde realizou o curso primário e secundário na Escola Municipal de Ishinomaki e o curso colegial no Colégio Municipal de Miyagi.

Ingressou na Faculdade de Agronomia da Universidade de Tóquio de Agricultura e Tecnologia em 1966, concluindo o curso de Fitossanitarismo em 1970, tendo sido bolsista da disciplina do mesmo durante todo o período universitário.

Ao final do curso universitário optou pela invenção de novos herbicidas e seus mecanismos de ação na plantação de arroz, como tese de Bacharelado. Tal herbicida foi patenteadado pela Universidade.

Em 1970, obteve o grau de Bacharel em Ciências Agrícolas pela Univesidade de Tóquio de Agricultura e Tecnologia. Logo após, ingressou à Divisão de Química Fina no Laboratório Central de Pesquisas da Showa Denko S.A., em Tóquio, Japão até novembro de 1978.

Neste período, realizou estudos e pesquisas sobre pesticidas, produtos veterinários e medicamentos; em 1971, invenção e desenvolvimento do novo herbicida SK-41, denominado "Stucker". Em 1973, participou do grupo de pesquisas sobre desenvolvimento dos produtos veterinários no Instituto Nacional de Saúde Animal, em Tóquio.

Em 1974, participou ativamente da Conferência Anual da Associação Japonesa de Entomologia e Zoologia Aplicada e, em 1975, participou do 1º Curso Intensivo sobre Coccidiose Aviária na UFRGS, Brasil. Neste mesmo ano, inventou o novo acaricida SK-09 e SK-38, incorporando-se ao grupo de toxicologia e continuou a criar novos produtos.

Em 1978, saiu da Showa Denko S.A. e imigrou ao Brasil. No período de 8 anos, sintetizou cerca de 6 mil produtos, 8 publicações e 10 patentes internacionais e domésticas.

Após 5 meses no Brasil, ingressou à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. De 1979 a 1981, trabalhou na Divisão Agroquímica da Sandoz S.A., Rio de Janeiro, Brasil, onde pesquisou novas formulações de pesticidas.

Em 1981, iniciou o Curso de Pós-Graduação a nível de mestrado em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento em especial ao Vice-Reitor da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ), Professor HUGO EDISON BARBOSA DE RESENDE, pelo apoio e a amizade a mim dedicada e oportunidade de ingresso à UFRRJ;

aos Professores GONZALO EFRAIN MOYA BORJA, HUMBERTO MACHARETTI e GENEROSO MANOEL CHAGAS, pela prestimosa orientação a mim dispensada;

aos Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária, os Professores LAERTE GRISI e NICOLAU MAUÉS DA SERRA FREIRE, pelo auxílio e esclarecimentos prestados no desenvolvimento deste trabalho;

ao Doutor DONALD HANSEN da Oregon State University - School of Veterinary Medicine, Oregon, E.E.U.U., pelas informações para localização de referências internacionais;

ao Professor YASUO CHINZEI da Mie University, School of Medicine - Department of Medical Zoology, Japão, pelo envio de referências e informação técnica;

ao Doutor SHIGEO KITAOKA do National Institute of

Animal Health, Tsukuba, Japão, pelo envio de referências bibliográficas;

ao Doutor YOSHIATSU TSUTSUMI da Beecham Japan S.A., pela doação de reagentes para eletroforese;

ao Sr. SERGIO AKIO KONDO da Fatec Química Industrial S.A., pelo acompanhamento de todo o bioensaio realizado;

a todos os Professores e colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo apoio e carinho demonstrado;

aos funcionários do Curso de Parasitologia da UFRRJ pela dedicação e prestação de serviço.

ABREVIATURAS

1. AChE Acetilcolinesterase
2. BIS N,N-Metilenbisacrilamida
3. BPB Azul de Bromofenol
4. DL 50 Dose Letal 50
5. FAO Organização Mundial de Alimentos
e Agricultura
6. HJ Hormônio Juvenil
7. MAO Monoaminoxidase
8. PAGE Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
9. PAS Ácido Periódico-Schiff
10. ppm partes por milhão
11. (p/p)%C $b/a + b \times 100$; onde, a=acrilamida; b=BIS
12. (p/v)%T $(a + b)\%$; peso total dos produtos
dissolvidos em 100 ml de água
13. Pindaba Pindamonhangaba
14. SDS-PAG Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
com Dodecilsulfato de Sódio
15. SDS Dodecilsulfato de Sódio
16. Tris Tris (hidroximetil) aminoetano
17. Vn Vitelina
18. Vg Vitelogenina

Í N D I C E

	pág.
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
A. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CARRAPATO	
<i>Boophilus microplus</i>	3
B. RESITÊNCIA	5
C. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA	7
1. Bioensaio Direto	7
2. Estudo Bioquímico	10
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
A. ANÁLISE DA COMPARAÇÃO DA RESITÊNCIA DOS CARRAPATOS	
DE ARUJÁ E PINDAMONHANGABA	15

1. Carrapato	15
2. Produtos Usados	15
3. Procedimentos do Bioensaio	17
B. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS	18
1. Produtos Usados	18
2. Extração e Purificação das Proteínas dos Ovos e Larvas	18
3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	19
4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	20
5. Identificação das Proteínas	21
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
A. SUSCEPTIBILIDADE DAS LARVAS EM DIFERENTES IDADES	22
B. INTERPRETAÇÃO DA ELETROFORESE	24
1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	24
2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	25
3. Caracterização da Resistência dos Carrapatos	26
V. CONCLUSÕES	30
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
VII. APÊNDICE	42

ÍNDICE DAS FIGURAS

	pág.
Figura 1. Desenvolvimento seqüencial na espécie <i>Boophilus microplus</i> na Austrália e a redução da eficiência dos carrapatos	43
Figura 2. Ovopostura de <i>B. microplus</i> no 4° a 6° dia após a coleta	44
Figura 3. Larvas de <i>B. microplus</i> de duas semanas de idade	44
Figura 4. Coleta das larvas de <i>B. microplus</i> no tubo de ensaio com um pincel n° 1	45
Figura 5. Transferência das larvas de <i>B. microplus</i> para um funil de papel de filtro	45
Figura 6. Funis contendo as larvas de <i>B. microplus</i> com sua base lacrada	46

- Figura 7. Sistema de "Slab" - eletroforese em gel de poliacrilamida com ou sem dodecil sulfato de sódio 46
- Figura 8. Comparação da susceptibilidade das larvas de *B. microplus* em diferentes idades, provenientes de Pindamonhangaba aos acaricidas, Coumaphos e Decamethrin 48
- Figura 9. Susceptibilidade das larvas de *B. microplus* provenientes de Arujá e Pindamonhangaba a 5 acaricidas 50
- Figura 10. "Slab" - eletroforese em gel de poliacrilamida: as proteínas dos ovos (O) e das larvas (L) 51
- Figura 11. Cálculo da migração eletroforítica das proteínas dos ovos (O) e das larvas (L) 51
- Figura 12. Identificação da glicoproteína dos ovos (O) e das larvas (L) pela relação PAS 52
- Figura 13. Identificação da lipoproteína dos ovos e das larvas pelo corante Sudan Negro B 52

- Figura 14. "Slab" - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE): as proteínas dos ovos foram desnaturadas com 2% de SDS e 5% de 2-mercaptoetanol em 100°C durante 2 minutos e aplicadas com 0,1% de SDS 53
- Figura 15. Identificação das glicoproteínas dos ovos pela PAS em SDS-PAGE 54
- Figura 16. Comparação das proteínas das larvas entre PAGE em SDS-PAGE 54
- Figura 17. Migração eletroforética das proteínas das larvas em SDS-PAGE 55
- Figura 18. Identificação das glicoproteínas das larvas pela reação PAS e SDS-PAGE 55

ÍNDICE DAS TABELAS

	pág.
TABELA 1. Susceptibilidade de cada período de idade das larvas <i>Boophilus microplus</i> em Pindamonhangaba	47
TABELA 2. Comparação da susceptibilidade das larvas de <i>B. microplus</i> de duas semanas de idade, provenientes de Arujá e Pindamonhangaba no Estado de São Paulo	49

RESUMO

As larvas do carrapato bovino, *Boophilus microplus* de duas regiões diferentes do Estado de São Paulo, no Brasil, foram testadas quanto à resistência a cinco acaricidas (Malathion, Chlorfenvinphos, Coumaphos, Fenvalerate e Decamethrin) pela inclusão das larvas em papéis de filtro impregnados com solução de óleo de acaricidas (Método da FAO).

Larvas provenientes de Pindamonhangaba mostraram-se mais resistentes que as de Arujá com 40% a 70% de resistência aos organofosforados, mas, não houve diferença entre ambas as regiões aos piretróides sintéticos.

A caracterização de resistência das larvas de ambas as regiões foi similar ao tipo Mackay ou tipo Ridglands na Austrália, a qual teve maior resistência ao Chlorfenvinphos e baixa resistência ao Coumaphos.

As estruturas brutas das proteínas dos ovos e larvas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

A proteína principal dos ovos (P2) na PAGE foi identificada como lipo-glicoproteína e uma das principais proteínas das larvas (P5), também foi identificada como a mesma dos ovos.

Outra proteína principal das larvas (P6), entretanto, não foi identificada como lipo-glicoproteína. As principais proteínas isoladas pelo SDS-PAGE, foram sugeridas como sendo (P2) dos ovos e (P5) das larvas devido à reação positiva na coloração de PAS.

O controle dos carrapatos bovinos pelos sistemas dos produtos não-acaricidas foi discutido pelo conhecimento da biossíntese da Vitelogenina e Vitelina.

SUMMARY

The larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* from two different regions of the State of São Paulo in Brazil, were tested for susceptibility to five acaricides (Malathion, Chlorfenvinphos, Coumaphos, Fenvalerate and Decamethrin) by enclosure of larvae in filter paper packet impregnated with oil solutions of acaricides (FAO Method - Food and Agriculture Organization Method).

Larvae from Pindamonhangaba showed higher resistant than that from Arujá with 40 to 70% of degree to organophosphorus, but, there was no difference between both regions to synthetic pyrethroids.

The characterization of resistance of larvae from both regions was similar to Mackay type or Ridgeland type in Australia, which was higher resistant to Chlorfenvinphos and lower resistant to Coumaphos.

The crude extracted proteins of eggs and larvae were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The main

protein of eggs (P2) on PAGE was identified as lipoglycoprotein and one of two main proteins of larvae (P5), was also identified as same as to the eggs.

Other main protein of larvae (P6), however, was not identified as a lipo-glycoprotein. The main protein isolated by SDS-PAGE were suggested as to be P2 of eggs and P5 of larvae by reason to possitive reaction of PAS.

The control of the cattle ticks by non-acaricide product systems was discussed by knowlege of biosynthesis of Vitellogenin and Vitellin.

I. INTRODUÇÃO

Após a II Guerra Mundial, os inseticidas sintéticos vêm sendo utilizados tanto no combate aos carrapatos quanto aos insetos em geral. Da mesma forma, os acaricidas vêm sendo muito usados, e paralelamente a esse uso, novos compostos têm sido descobertos na ostensiva luta contra tais pragas.

Em determinada época, julgou-se possível o extermínio dos carrapatos devido aos excelentes efeitos dos acaricidas até então aplicados. Entretanto, surgiram raças resistentes no decorrer do uso dos mesmos.

Assim sendo, a grande diversidade na estrutura e mecanismo de ação dos compostos utilizados tem, freqüentemente, induzido resistência após cada período de uso. Estudos realizados em várias épocas, mostram que paralelamente ao desenvolvimento dos acaricidas ocorreu o aparecimento de resistência por parte dos carrapatos.

No presente trabalho, desenvolvemos um estudo comparativo da sensibilidade dos carrapatos nos municípios de Arujá e Pindamonhangaba, no Estado de São Paulo, a cinco

acaricidas. Estas regiões foram escolhidas porque nelas existe um padrão constante de aplicação de acaricidas: Coumaphos, em Arujá; Diazinon e Amitraz, em Pindamonhangaba.

Além disso, as diferenças climáticas nessas regiões determinam diferentes durações para o ciclo vital dos carrapatos.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CARRAPATO *Boophilus microplus*

O carrapato bovino *B. microplus*, é o mais importante artrópodo parasito do gado bovino, atingindo-o de várias maneiras:

- 1) Prejuízos diretos na produção animal devido a danos no couro, perda de sangue e queda na produção de leite e carne.
- 2) Prejuízos indiretos pela transmissão de agentes patogênicos causantes ou doenças tais como a Babesiose e Anaplasnose.

Apesar da vasta importância dos carrapatos como vetores de agentes patogênicos, existem atualmente, poucos estudos detalhados na bovinocultura.

Em 1972, na Austrália, os prejuízos totais anuais estimados, atribuídos ao carrapato *B. microplus*, foram de cerca de A\$ 42 milhões (U\$ 62 milhões), correspondente a U\$ 7,30 por cabeça de gado na área infestada (McCOSKER, 1979). No Brasil, um prejuízo de Cr\$ 356 milhões foi atribuído ao parasitismo

pelo carrapato *B. microplus* em 1974 (BECK, 1979).

O controle dos carrapatos visa principalmente:

- 1) Eliminar os efeitos prejudiciais diretos destes parasitos na produção de leite e carne.
- 2) Reduzir as perdas econômicas, morte ou prejuízos crônicos causados pela maioria das doenças fatais.

A biologia do carrapato e a dinâmica populacional determinam a freqüência dos banhos de imersão no gado e, conseqüentemente, o custo do seu controle. Quanto às perdas econômicas: morte, prejuízos crônicos e transmissão de doenças, se faz necessário um controle muito mais rigoroso.

No final do século XIX, foi introduzido um método de controle aos carrapatos, até hoje tradicional, que consiste na aplicação de acaricidas por meio de banho de imersão ou pulverização nos animais. Apesar de oneroso pelo custo da mão-de-obra e materiais, incluído os acaricidas, é ainda o único método viável de controle dos carrapatos.

Este processo porém, é inconveniente e economicamente menos aceitável. Embora o controle químico com novos compostos acaricidas venha sendo mundialmente utilizado, os carrapatos ainda não estão totalmente erradicados.

O carrapato *B. microplus*, foi erradicado dos Estados Unidos em 1961, primeiro aplicado arsenicais em 1923 e após o DDT (WHARTON & NORRIS, 1980); porém, na Austrália e América Latina, a tentativa de extermínio dos carrapatos, ainda não obteve êxito. O grande problema hoje, é a resistência aos produtos usados.

B. RESISTÊNCIA

O controle químico do carrapato *B. microplus*, foi iniciado em 1895 por produtos arsenicais e, em 1936 a resistência foi pela primeira vez determinada nesta espécie (NOLAN & ROULSTON, 1979).

A resistência do carrapato *B. microplus* aos acaricidas foi dividida em 4 grupos conforme cada tipo de produto:

- 1) Arsenicais
- 2) DDT
- 3) BHC e Clordienas
- 4) Organofosforados e Carbamatos

A cronografia do desenvolvimento da resistência dos carrapato *B. microplus* na Austrália é mostrada na Figura 1.

Os arsenicais foram usados durante 41 anos entre 1895 a 1936 e sua efetividade foi reduzida de 77% para 14%. Quanto aos organoclorados, o DDT foi utilizado de 1946 a 1962, e a resistência deste produto foi detectada na Austrália em 1955 com redução de sua efetividade de 85% para 40%.

Após o DDT, surgiram no mercado, outros produtos organoclorados como BHC, Dieldrin e Toxafene; porém a eliminação destes no leite e o aparecimento da resistência por parte dos carrapatos, tornaram inviável o uso de tais produtos, sendo mesmos retirados do mercado.

No Brasil, o problema da resistência dos carrapatos

foi detectado em 1948 contra arsenicais, em 1953 contra DDT e organoclorados e, em 1963 contra os organofosforados (NOLAN & ROULSTON, 1979).

Em 1956, o primeiro organofosforado Diazinon, foi aprovado no combate aos carrapatos na Austrália (WHARTON & ROULSTON, 1970). Sucessivamente, outros produtos foram introduzidos no mercado como Dioxathiom (1958), Coumaphos (1950), Ethion e o carbamato Carbaril (1962).

Os efeitos iniciais do Diazinon e Dioxithion foram excelentes, auxiliando no controle dos carrapatos, enquanto que, os organoclorados foram retirados do mercado em 1962 devido à toxicidade e resistência.

No decurso de um ano após a eliminação dos organoclorados, a resistência ao produto Dioxathion foi determinada a nível de campo e, posteriormente para todos os organofosforados e carbamatos em uso corrente (NOLAN & ROULSTON, 1979).

Em 1970, um novo tipo de acaricida, Chlordimeform foi introduzido no mercado, associado a organofosforados para combater os carrapatos resistentes a estes (NOLAN, 1981). Contudo, SCHUNTNER (1971) estudou a biotransformação do Chlordimeform em ratos, tendo caracterizado provável efeito cancerígeno de seus metabólitos, posteriormente sua matéria prima (4-clor-0-toluidina) foi identificada como capaz de produzir tumor em ratos (WHARTON & NORRIS, 1980). Os efeitos colaterais observados em 1971 contribuíram para que o

acaricida Chlordimeform fosse retirado no mercado em 1976.

A partir de 1974, o combate aos carrapatos recebeu a contribuição dos acaricidas pertencentes ao grupo dos piretróides sintéticos.

NOLAN et al. (1977), demonstraram o aparecimento da resistência cruzada entre os piretróides sintéticos e o DDT. Entretanto, a associação entre os piretróides sintéticos e os organofosforados, tem se mostrado eficaz no combate dos carrapatos resistentes aos mesmos.

Na Austrália, novos métodos para evitar o parasitismo por carrapatos tem sido usado, como a criação de raças animais resistentes ao parasito, baseada na raça Zebu (*Bos indicus*) ou no seu cruzamento com o gado europeu (POWEL, 1977).

Estas alternativas para enfrentar o problema do parasitismo por carrapato, visam um controle maior quanto ao uso indiscriminado dos acaricidas, tendo em vista o seu alto custo.

C. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA

1. Bioensaio Direto

Segundo NOLAN & ROULSON (1979), o carrapato *B. microplus* tem desenvolvido resistência aos seguintes grupos de produtos:

- 1) Arsenicais,

- 2) DDT,
- 3) BHC e Clordienas ,
- 4) Organofosforados e Carbamatos.

A confirmação da resistência deve ser baseada nos testes da "Dose-Mortalidade", usando os carrapatos no estágio larval não parasitário. Os dois métodos seguintes têm sido usados em vários países:

a. Método de Papel de Filtro Impregnado (STONE & HAYDOCK, 1962)

As larvas dos carrapatos são expostas a papéis de filtro impregnados com solução de óleo de acaricidas e, o critério deste método é a mortalidade das larvas após 24 horas.

b. Método de Imersão (SHAW, 1966)

Este método usa acaricidas formulados e as larvas dos carrapatos são imersas em emulsão ou suspensão diluídas entre discos de papel de filtro durante dez minutos. Após este período, as larvas são transferidas, com auxílio de um pincel para um disco de papel de filtro seco. A análise final se faz pela observação da mortalidade após 24 horas.

Por outro lado, os métodos que utilizam o estágio adulto (fêmea engorgitada), também foram demonstrados por vários pesquisadores: imersão (HITCHCOCK, 1953), injeção (STONE & WEBBER, 1960), aplicação tópica (KITAOKA & YAJIMA, 1961) e papéis impregnados (STONE & HAYDOCK, 1962).

O critério dos métodos acima citados, se faz pela inibição da ovopostura. Porém, para testes de rotina, o uso das larvas é preferível por serem mais uniformes abundantes e de fácil manejo.

Dentre os dois métodos que utilizam as larvas, os fatores da resistência do carrapato *B. microplus* aos organofosforados, foram diferentes, mas, a forma de resistência cruzada foi similar (WHARTON & ROULTON, 1970).

Na Austrália, o primeiro método (papel impregnado: STONE & HAYDOCK, 1962), tem sido usado sucessivamente para determinar os carrapatos resistentes aos organofosforados (WHARTON & ROULSTON, 1970).

Em 1971, este método foi modificado pela FAO (Food and Agriculture Organization) e demonstrado por HARRIS (1977). As raças resistentes do *B. microplus* aos organofosforados e carbamatos foram caracterizadas mundialmente por NOLAN & ROULSTON (1979).

Na Austrália, existem 9 raças resistentes; dentre elas, Ridgeland (1963), Biarra (1966), Mackay (1967) e Mt. Alford (1970), são as mais estudadas. As características dessas raças são:

- 1) Ridgelans: alta resistência ao Dioxathion e baixa resistência ao Coumaphos.
- 2) Biarra: alta resistência ao Coumaphos e outros organofosforados, principalmente Cyanox, e baixa resistência ao Chloropyrifos.

3) Mt. Alford: alta resistência ao Coumaphos, Ethion e Chloropyrifos, e baixa resistência ao Phosmet.

No Brasil, existem raças resistentes do tipo Ridgелands e do tipo Minas Gerais (NOLAN & ROULSTON, 1979).

2. Estudo Bioquímico

O estudo bioquímico dos carrapatos resistentes pode ser assim dividido:

- a) Mecanismo de ação dos acaricidas,
- b) Estudo Metabólico dos carrapatos.

a) Mecanismo de Ação dos Acaricidas: Os acaricidas não estão sendo estudados profundamente em comparação ao estudo dos inseticidas. Estes foram introduzidos no mercado anteriormente aos acaricidas e ocorreu o problema da resistência que motivou investigações detalhadas sobre seu mecanismo de ação.

Dentre os trabalhos com este objetivo foi analisado como provável mecanismo de ação, a inibição da AChE pelos organofosforados e a inibição da MAO (monoaminoxidase) pelo Chlordimeform.

O mecanismo de ação dos arsenicais e organoclorados, embora tenham sido eliminados do mercado, ainda não está esclarecido. O mecanismo de ação dos organofosforados e carbamatos, está sendo muito pesquisado pelo grupo australiano (NOLAN et al., 1972; SMALLMAN & RIDDLES, 1977; SCHUNTNER &

THOMPSON, 1978).

Até hoje, 9 raças de carrapatos resistentes estão sendo identificadas através da diferença de atividade da AChE (NOLAN & ROULSTON, 1979); divididos em:

- 1) resistência decorrente de diferenças de sensibilidade da AChE aos acaricidas (ROULSTON, et al., 1968);
- 2) resistência decorrente da detoxicação por degradação dos acaricidas pelo parasita.

Por exemplo, a sensibilidade da AChE nas raças resistentes: Ridgeland, Biarra, Mackay e Mt. Alford etc., foi bem baixa em relação à raça susceptível, Yeerongpilly (ROULSTON et al., 1969)

AZIZ & KNOWLES (1973) sugeriram que o mecanismo de ação dos produtos que possuem grupo amidina (como o Chlordimeform) fosse a inibição da MAO, mas, HOLDEN & HADFIELD (1975) e SCHUNTNER & THOMPSON (1976), demonstraram que o mecanismo de ação destes não é a inibição da MAO, mas, provavelmente a inibição da oxidase da função mista; o que foi o efeito primário na ação tóxica do grupo das formamidinas em carrapatos bovinos.

Conseqüentemente, os resultados de trabalhos visando elucidar o mecanismo de ação não foram utilizadas nas pesquisas de novos compostos acaricidas, e sim, para programar o novo método de controle aos carrapatos, associados com os dados de bioensaio direto (NOLAN & ROULSTON, 1979).

b) Estudo Metabólico dos Carrapatos: Este tipo de estudo, realizado com os carrapatos resistentes, foi baseado principalmente na característica da AChE dos carrapatos resistentes aos organofosforados (NOLAN & SCHNITZERLING, 1975 e 1976).

Por outro lado, o estudo dos mecanismos biossintéticos no carrapato foi iniciado por WIGGLESWORTH (1943) e tendo como base a cadeia alimentar nos parasitos hematófagos; ou seja, o pigmento de cor marron na gema dos ovos de *Ixodes*, era proveniente da hemoglobina do hospedeiro. Este trabalho definiu o estudo da biossíntese da Vitelogenina (Vg) e Vitelina (Vn) dos carrapatos.

BREMNER (1959) identificou o pigmento de ovo de *B. microplus* como sendo uma hemoproteína e chamou-o de "Haemixodovin".

TATCHELL (1971), identificou duas proteínas diferentes em ovos e teleóginas do *B. microplus* por eletroforese. Em outros gêneros, DIEHL (1970) mostrou duas proteínas em ovos de *Ornithodoros moubata*, as quais foram equivalentes quando examinadas pelas técnicas de eletroforese e imunodifusão.

BOCTOR & KAMEL (1976), purificaram e identificaram duas lipovitelinas em ovos de *Dermacentor andersoni* as quais foram semelhantes às duas proteínas da hemolinfa da fêmea.

OBENCHAIN et al. (1978), identificaram duas proteínas nos ovos de *Rhipicephalus appendiculatus* como

lipo-hemoproteína.

ARAMAN (1979), estudou a biossíntese da Vitelogenina do *Rhipicephalus sanguineus* através da injeção de aminoácidos mistos marcados com ^{14}C no hemocele, cujo resultado mostrou a maior produção das proteínas nas células dos corpos gordurosos. Estes corpos gordurosos correspondem às mesmas células dos insetos e se localizam na traquéia (OBENCHAIN & OLIVER, 1973).

CHINZEI (1984), apresentou dados concordantes com os descritos por OBENCHAIN & OLIVER (1973) através da cultura celular do carrapato no solo com o método do ^{35}S -metionina e anti-Vn anticorpos difusão, cujo produção da proteína (Vitelogenina) teve atividade maior nos corpos gordurosos localizados na traquéia.

Estes resultados, seriam iguais no caso de *B. microplus* e este mecanismo seria controlado através do hormônio juvenil (HJ).

POUND & OLIVER (1979), mostraram a indução na formação dos ovos pela aplicação do hormônio juvenil III na espécie *Ornithodoros parkeri* e CHINZEI (1984) observou a síntese de Vitelogenina por hormônio juvenil I - III e metopleno (ZR-515).

Esta idéia pode ser chamada como o controle dos carrapatos pelos "não-ascaricidas" (OBENCHAIN, 1979); na qual os produtos não acaricidas poderão ser usados para modificar ou até mesmo controlar o metabolismo e desenvolvimento dos carrapatos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

O primeiro passo no estudo do desenvolvimento de resistência dos carrapatos é a detecção de sua ocorrência prévia.

Neste trabalho, os carrapatos foram coletados de duas regiões diferentes no Estado de São Paulo; em Arujá e Pindamonhangaba respectivamente. Em Arujá, o ponto de coleta foi a Fazenda das Andorinhas cujo clima é frio e úmido; onde até hoje, se usa acaricidas (organofosforados - Coumaphos).

Em Pindamonhangaba, a coleta se fez na Estação Experimental de Zootecnia de Pindamonhangaba pertencente ao Instituto de Zootecnia do Estado de São Paulo, onde o clima é quente e úmido. Há 5 anos, usava-se nesta localidade organofosforados (ex: Diazinon); hoje, o grupo amidina (Amitraz) é o produto em uso.

Os carrapatos coletados foram investigados quanto suas resistências aos vários acaricidas através da análise de "Dose-Mortalidade" de DL 50 e suas proteínas foram isoladas e caracterizadas por eletroforese.

A. ANÁLISE DA COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS CARRAPATOS DE ARUJÁ E PINDAMONHANGABA

Existem, afora o teste de bioensaio direto, vários outros métodos para se examinar o grau de resistência. Dentre eles, o mais comum e viável em termos financeiros, é o uso de larvas através do método da FAO (HARRIS, 1977), que utiliza papel de filtro impregnado com o produto químico.

1. Carrapatos:

A coleta dos carrapatos engorgitados (telóginas), foi feita uma vez por semana no período da manhã. Os carrapatos selecionados foram colocados na estufa à temperatura de 27°C e à 90% de umidade relativa.

A ovopostura iniciou-se ao 2º dia e continuou durante 15 a 16 dias (Figura 2). A idade das larvas foi padronizada pela coleta de ovos feita exclusivamente entre o 4º e 6º dias de ovopostura. Este período foi escolhido porque durante ele se obtém a produção máxima de ovos (BENNET, 1974).

Num experimento preliminar, as larvas de uma a cinco semanas de idade, foram testadas quanto às suas susceptibilidades aos acaricidas, Coumaphos e Decamethrin, pela avaliação da DL 50.

2. Produtos Usados:

Para se determinar a DL 50 foram usados os seguintes produtos químicos:

MALATHION

0,0-Dimethyl-S-(1,2-dicarbethoxyethyl) phosphorodithioate:

92% de pureza da Cyanamid Blemco

CHLORFENVINPHOS

2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl diethylphosphate:

92% de pureza da Cela Merck

COUMAPHOS

0,0-Diethyl-0-(3-chloro-4-methyl-2-oxo(2H)-1-benzopyran-7-yl)

phosphorothioate:

92% de pureza da Bayer A.G.

FENVALERATE

Cyano-(3-phenxyphenyl)methyl 4-chloro- β -(1-methyl)ethyl

benzenacetate:

92% de pureza da Sumitomo Chemical Ind. S.A.

DECAMETHRIN

Cyano-3-phenoxybenzyl 1-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethyl

cyclopropan carboxylate:

98,5% de pureza da Químio

3. Procedimento do Bioensaio:

Os papéis de filtro impregnados pelos produtos químicos foram preparados segundo o método de FAO (HARRIS, 1977) com as seguintes modificações:

Uma solução básica de parafina líquida e clorofórmio na proporção de 1 : 1 foi preparada e várias diluições de cada produto foram preparadas a partir dela. A seguir 4 ml de cada diluição foi aplicado sobre dois papéis de filtro (Whatman n° 1) com 11 cm de diâmetro, e colocados numa Placa de Petri. Revirou-se os papéis várias vezes até a completa evaporação do clorofórmio, resultando numa concentração dupla.

Posteriormente, foram dobrados em quatro partes formando uma espécie de funil, e uma quantidade de larvas (200 a 300) com a média de idade de duas semanas, foram colocadas dentro dos funis com auxílio de um pincel n° 1 (Figura 4 e Figura 5).

Lacrrou-se as bordas dos funis, acomodando-os em um suporte com a base lacrada para baixo. Levados à estufa e mantidos a 27°C e 90% de umidade relativa (Figura 6).

Após este período, retirou-se da estufa os funis e abriu-se sob o calor de uma lâmpada, o mesmo que estimulou a movimentação das larvas, permitindo a contagem das sobreviventes.

Os testes foram realizados em duplicata e refeitos cinco a seis vezes para uma correção de cada diluição. A mortalidade foi corrigida pela fórmula de ABBOTT (1925) e a DL

50 determinada pelo método de FENNEY (1971).

B. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

As principais proteínas presentes nos ovos e larvas dos carrapatos provenientes em Arujá e Pindamonhangaba foram estudadas por eletroforese.

Os carrapatos usados para estes estudos foram preparados da mesma maneira que na seção do bioensaio. A idade dos ovos usados foi de uma a duas semanas e das larvas foi de duas semanas.

1. Produtos Usados:

Todos os produtos usados nestes experimentos, foram de grau analítico e grau bioquímico.

2. Extração e Purificação das Proteínas dos Ovos e Larvas:

OVOS: 1,0 g de ovos foram macerados com 10 ml de uma solução KCl 0,15 M em geral e pistilo sob baixa temperatura (cerca de 4°C), transferidos posteriormente ao homogeneizador de vidro e teflon (tipo Potter-Elvehjem), durante 3 minutos. Após esta operação, centrifugou-se o macerado durante 20 minutos à temperatura de 0 a 4°C com o uso de um centrifugador (Marca FANEM; Modelo - 208N) a 2.300 g. Foram filtrados 2,0 ml de sobrenadante (proteínas e lipídeos hidrossolúveis), transferidos ao tubo de ensaio com 10 ml de KCl 0,15M.

Centrifugou-se mais uma vez nas mesmas condições da primeira centrifugação. O sobrenadante foi utilizado na aplicação da eletroforese.

LARVAS: quanto às larvas, procedeu-se da mesma maneira descrita acima. A quantidade de larvas foi de 2,0 g, vivas e antes de macerá-las, foram colocadas no congelador para imobilizá-las.

3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE):

A técnica de gel de poliacrilamida foi preparada conforme o método de DAVIS (1964) e de MIYAZAKI & HAGIWARA (1981) com algumas modificações.

O sistema de eletroforese foi de T=7,5% e C=2,6% "slab-géis" eletroforese, o qual foi preparado por 30% (p/v) de acrilamida e 0,8% (p/v) de BIS no tampão 0,5M Tris-HCl (pH:6,8).

Após terminar a polimerização dos géis, 0,5 ml de cada solução de proteína foi misturada com 0,1 ml de tampão 0,5M-Tris-HCl (pH=6,8) e 0,1 ml de glicerina a 60% (v/v) contendo 0,001% de corante Azul de Bromofenol (BPB).

Foram tomados 50 microlitros da amostra e aplicadas na parte superior dos géis, e a eletroforese foi executada em tampão 0,025M-Tris-0,192M-Glicina com 100v de voltagem estável até o corante BPB (marcação da corrida) atingir a fase de géis para isolamento. Posteriormente a voltagem foi aumentada para

150v durante 2 horas e meia, a 4°C até o limite de marcação da placa (Figura 7).

Terminada a corrida, as proteínas foram coradas pelo Coomassie Azul R (WEBER & OSBORN, 1969); as glicoproteínas coradas pelo ácido periódico-Schiff (PAS) (ZACHARIUS et al., 1969) e as lipoproteínas coradas pelo método de SWAHN (1952) com o uso do corante Sudan Negro B (ABE et al., 1976).

4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil

Sulfato de Sódio (SDS-PAGE :

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), foi realizada através do método de LAEMMLI (1970), usando gel de acrilamida 7,5% (p/v) constante com 0,1% (p/v) de SDS e com 3% (p/v) de gel para concentração das proteínas.

As amostras foram dissolvidas em 0,5M Tris-HCl (pH=6,8), contendo 2% (p/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol e, aquecidas em água fervente durante 2 minutos. Após resfriá-las, à temperatura ambiente, 1 ml desta amostra foi misturada com 0,1 ml de 0,0625M-Tris-HCl (pH=6,8), contendo 0,05% de BPB e 70% de glicerina.

A eletroforese foi executada com voltagem constante de 100v até o corante BPB (marcação da corrida) atingir a fase de géis para isolamento. Posteriormente, a voltagem foi aumentada para 150v durante duas horas e meia (Figura 7).

5. Identificação das Proteínas:

As proteínas totais foram coradas com 0,25% de Coomassie Azul R, as quais foram diluídas em solução de ácido acético-etanol-água (2:9:9) após eletroforese (HORIO & YAMASHITA, 1981).

As glicoproteínas foram identificadas pelo método do ácido periódico-Schiff (PAS) (ZACHARIUS, 1969).

As lipoproteínas foram identificadas com o corante Sudan Negro B pelo método de SWAHN (1953).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. SUSCEPTIBILIDADE DAS LARVAS EM DIFERENTES IDADES

A susceptibilidade das larvas de diferentes idades, aos acaricidas Coumaphos e Decamethrin é mostrada na Tabela 1 e na Figura 8.

A uma semana de idade das larvas mostrou ser a de maior resistência com 0,024549% (245,49 ppm) de DL 50 e a cinco semanas a de menor resistência; isto é, mais susceptível com 0,011488% (114,88 ppm) de DL 50 contra Coumaphos.

Entre as duas e quatro semanas de idade, a DL 50 foi de 0,0201% (201 ppm) a 0,0207% (207 ppm) ao Coumaphos, mostrando pequena variação. Quando se compara à DL 99, a resistência das larvas de cada período de idade foi de uma a cinco semanas; ou seja, quanto maior a idade, menor resistência.

Por outro lado (contra Decamethrin), as larvas de duas semanas de idade, mostraram ser a de maior resistência com 0,001712% (17,12 ppm) de DL 50 e quatro semanas de idade, menor resistência: isto é, mais susceptível com 0,000552%

(5,52 ppm) de DL 50.

Segundo o método de FAO (HARRIS, 1977), as larvas devem ser utilizadas para bioensaio entre 7 dias de idade no mínimo e de 21 dias no máximo. Conforme a Tabela 1 e Figura 8, a melhor fase das larvas do *B. microplus*, foi a uma e duas semanas de idade, onde se obteve a maior resistência aos produtos químicos.

A análise da DL 50 dos cinco acaricidas contra as larvas de duas semanas de idade, comparando o grau de resistência entre Arujá e Pindamonhangaba, foi mostrado na Tabela 2 e Figura 9.

Dentre os 5 acaricidas, Decamethrin foi o mais tóxico já que a DL 50 foi de aproximadamente 7,1 a 7,8 ppm para as larvas de Arujá e Pindamonhangaba, respectivamente.

Na comparação entre os piretróides sintéticos e os organofosforados, os piretróides sintéticos foram mais tóxicos que os do grupo organofosforados. A maior resistência mostrada pelas larvas aos organofosforados pode ser atribuída ao uso integral destes produtos nas regiões estudadas.

De acordo com as avaliações efetuadas, as larvas provenientes de Pindamonhangaba se mostraram de 41 a 69% mais resistentes aos organofosforados que as provenientes de Arujá.

No grupo dos piretróides sintéticos, não houve diferença evidente tanto em Arujá e como em Pindamonhangaba; isto significa, que a ocorrência da resistência cruzada entre organofosforados e piretróides não foi observada.

B. INTERPRETAÇÃO DA ELTROFORESE

A eletroforese do material obtido de ovos e larvas em ambas as regiões estudadas, mostrou que não houve nenhuma diferença na primeira experiência, embora o resultado do bioensaio direto (análise da DL 50) determinasse a resistência aos organofosforados em Pindamonhangaba maior que em Arujá.

Neste trabalho, parte do isolamento das enzimas por eletroforese, foi realizado com os carrapatos coletados em Pindamonhangaba.

1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese do material obtido dos ovos apresentou mais de 8 bandas, sendo que 3 delas (P1, P2 e P3) foram mais nítidas. A banda P2 foi a mais evidente (Figura 10).

Nas larvas, a eletroforese resultou em mais de 6 bandas, sendo 4 bandas (P4, P5, P6 e P7) mais nítidas; principalmente P5 e P6 (Figura 10). Na comparação das bandas entre ovos e larvas, P1 & P4, P2 & P5 e P3 & P6, foram observadas praticamente a mesma migração eletroforética; com 0,04 a 0,05, 0,12 a 0,14 e 0,21 a 0,22 (Figura 11).

A reação do PAS demonstrou a característica das bandas isoladas dos ovos e larvas; somente P2 dos ovos e P5 das larvas foram positivas na reação PAS (Figura 12); ou seja, as bandas P2 e P5 são constituídas por glicoproteínas.

Mas, com o corante Sudan Negro B, apenas P2 foi positiva e P5 e P6 foram fracamente positivas (Figura 13); ou seja, P2 é constituída por lipoproteína. Isto significa que a proteína principal dos ovos é uma lipo-glicoproteína e P6 é outra proteína diferente.

2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

As proteínas foram isoladas também por eletroforese com SDS e o que permitiu a separação conforme seus pesos moleculares. As proteínas dos ovos foram separadas em mais de 12 bandas, sendo 3 bandas muito nítidas (Figura 14).

Após tratamento das proteínas com PAS, 5 bandas resultaram positivas (Figura 15), justificando a constituição como glicoproteína. O isolamento por PAGE apresentou uma banda P2 positiva ao PAS; ou seja, as 5 bandas de SDS-PAGE correspondem a P2 na PAGE.

As proteínas das larvas foram separadas em mais de 20 bandas, sendo 3 grupos nitidamente isolados, embora duas bandas (P5 e P6) fossem bem isoladas na PAGE (Figura 16). O primeiro grupo da banda G1 foi de 0,23 da migração eletroforética e G2 e G3 foram de 0,37 e 0,61 de cada migração eletroforética (Figura 17).

Estes grupos testados por PAS foram fracamente positivos (Figura 18) e, iguais à P5 na PAGE porque teve como base a glicoproteína (Figura 12).

3. Caracterização da Resistência dos Carrapatos

os resultados do bioensaio mostraram que as larvas provenientes de Pindamonhangaba apresentaram maior resistência aos organofosforados que às larvas provenientes de Arujá.

A característica dos carrapatos, em ambas as regiões, foi a alta resistência ao Malthion e ao Chlorfenvinphos e, baixa resistência ao Coumaphos, Fenvalerate e Decamethrin. As razões das DL 50 de Chlorfenvinphos e Coumaphos foram de 2,01 em Arujá e 2,33 em Pindamonhangaba; característica semelhante à das raças Mackay e Ridgелands na Austrália (WHARTON & ROULSTON, 1970 e STONE et al., 1976). Segundo NOLAN & ROULSTON (1979), existem no Brasil dois tipos de resistência aos organofosforados; tipo Ridgелands e tipo Minas Gerais.

PATARROYO & COSTA (1980) identificaram a existência de outra raça resistente aos organofosforados no Estado de Minas Gerais: o tipo Mt. Alford. Porém, o resultado do presente trabalho mostra que a característica dos carrapatos examinados não é do tipo Minas Gerais nem Mt. Alford.

A atividade da AChE das raças Mackay e Ridgелands foi mais reduzida que a da raça susceptível, Yeerongpilly e a presença da resistência em ambas as raças resistentes foi principalmente pela detoxicação dos produtos aplicados (NOLAN & ROULSTON, 1979).

De maneira semelhante, a resistência dos carrapatos

verificada no presente trabalho, foi atribuída à detoxicação do produto quando de seu uso isolado.

Por outro lado, os carrapatos em ambas as regiões estudadas não mostraram resistência aos piretróides sintéticos, Decamethrin e Fenvalerate. Isto sugere a possibilidade de combatê-los através do método do NOLAN et al (1977); ou seja, com combinação dos piretróides e organofosforados.

REICH & ZORZÓPULOS (1978) evidenciaram que as larvas de *B. microplus*, com uma a duas semanas de idade, apresentaram maior atividade das enzimas, fosfatase alcalina e fosfatase ácida. Estas apresentaram um pico no 9º dia e voltaram ao nível inicial no 20º dia de idade. Por esta razão as larvas de uma a duas semanas de idade foram escolhidas para os bioensaios com vistas a determinação das DL 50.

TATCHEL (1971) identificou as proteínas dos ovos de *B. microplus* como sendo hemoglicoproteína e também demonstrou que as duas proteínas principais dos ovos deste carrapato foram PAS positivas, mas apenas uma delas foi corada pelo Amido Schwartz. Isto sugere tratar-se de uma mucoproteína com elevado teor de glicídeos. Ainda mais TATCHEL não conseguiu identificar estas duas proteínas com as proteínas da fêmea pela identificação imunológica.

Na comparação que fizemos entre a proteína do ovo e larva, a proteína principal do ovo (P2) mostrou ser uma lipo-glicoproteína e uma das principais proteínas da larva

(P5) também apresentou a mesma característica da proteína pelo PAS e pelo Sudan Negro B.

Ambas as proteínas, P2 e P5 foram identificadas como sendo a mesma proteína pela migração eletroforética, mas outra proteína da larva (P6) foi independente pela sua migração eletroforética e sua característica protéica.

O método SDS-PAGE mostrou as proteínas principais (P2) isoladas em 5 bandas, sendo que 3 delas foram iguais às proteínas da larva pelos critérios de identificação eletroforética e reação PAS.

Isto nos leva a concluir que a maioria das proteínas do ovo (P2) esteja sendo transformada em proteína (P5) da larva e formando uma nova proteína (P6), interpretada como os núcleos proteicos P3 e P8 no trabalho de CHINZEI (1983), e permanecendo até o estágio de ninfa.

Sabe-se que a proteína principal do ovo e da larva é vitelina, de constituição lipo-glicoprotéica. Neste trabalho, a proteína principal do ovo (P2) e uma das principais proteínas da larva (P5) apresentaram-se como lipo-glicoproteína; ou seja, P2 e P5 seriam vitelina do carrapato *B. microplus*.

CHINZEI (1984), informou que a vitelina da larva recém-nascida de *O. moubata* corresponde a 85% da vitelina do ovo e quase 70% da vitelina até ao 10º dia de idade.

BREMNER (1959), também mostrou que o consumo da hemoproteína da segunda semana de idade da larva de *B.*

microplus foi quase 30%; ou seja, mantendo 70% de sua hemoproteína inicial.

Os trabalhos de CHINZEI (1983 e 1984) mostraram que a sobrevivência da larva de *O. moubata* decorre do consumo de vitelina e do trabalho de BREMNER (1959) mostrou fato idêntico para a hamoproteína do *B. microplus*. Nosso trabalho sugere que (P5) da larva tenha papel semelhante como fonte energética.

Esta hipótese foi apoiada por CHINZEI (1984) e por BREMNER (1959) que mostraram quando *O. moubata* perde cerca de 60% da vitelina inicial, inicia-se a morte da larva e para o *B. microplus*, o mesmo ocorre com quase 50% da perda.

É muito importante pesquisar a biossíntese da vitelina cujo conteúdo influencia a mortalidade das larvas (CHINZEI, 1984). Uma hipótese da biossíntese da vitelina já foi resumida por CHINZEI (1984), onde abordou a influência do hormônio juvenil (HJ), o qual induz a síntese da vitelogenina.

PUOND & OLIVER (1979) e CHINZEI (1984) já conseguiram a indução da síntese da vitelogenina através da aplicação do HJ (I) e HJ (III) nas espécies *O. parkeri* e *O. moubata*.

OBENCHAIN (1979) resumiu a idéia de controle dos carrapatos pelo uso de produtos não acaricidas como o hormônio juvenil e repelentes.

Através do desenvolvimento da biotecnologia, este agravante problema da resistência dos carrapatos poderá ser resolvido.

V. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir:

1. As larvas de *B. microplus* de uma e duas semanas de idade, das regiões de Arujá e Pindamonhangaba foram mais resistentes aos acaricidas a base de organofosforados e piretróides sintéticos.
2. As larvas de Pindamonhangaba foram mais resistentes aos organofosforados que as larvas de Arujá; mas, não houve diferença entre as larvas provenientes das duas regiões ao Decamethrin e ao Fenvalerate.
3. Alta resistência das larvas nas duas regiões estudadas ao Malathion e Chlorfenvinphos, e a susceptibilidade ao Coumaphos, indica que a resistência do carrapato *B. microplus* em ambas, as regiões, é do tipo Mackay ou Ridgeland da Austrália.
4. O estudo bioquímico da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) demonstrou uma banda principal (P2) na extração dos ovos, identificada pelo PAS e pelo Sudan

Negro B, como lipo-glicoproteína. Sugere-se sua identidade com a vitelina (Vn) do ovo.

Na extração das larvas, duas bandas principais, P5 e P6 foram isoladas e identificadas; sendo que P5 possui glicoproteína e pouca lipoproteína, e P6 praticamente não possui glicoproteína.

5. O estudo por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), demonstrou que a proteína do ovo, P2 foi isolada em mais de 5 bandas, sendo que todas as bandas foram positivas à reação PAS; ou seja, P2 é constituída de no mínimo, 5 proteínas diferentes.

A proteína P5 da larva foi também isolada em mais de 20 bandas, sendo 3 delas positivas à reação PAS.

6. A proteína P6 mostrou-se distinta de P5 tanto na mobilidade eletroforética quanto na reação à PAS.

7. Os dados do bioensaio e do estudo eletroforético focalizaram o ponto crítico dos carrapatos, como sendo a biosíntese da vitelina.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Ent., 18: 265-267.

ABE, M.; ITO, S. & TACHIBANA, T.; 1976. Eletroforese em papel de filtro. In: Denki-Eido Jikkenho (texto em japonês), Método experimental para eletroforese. 5a. ed., p.89 Associação de Eletroforese, Tóquio, pp. 503.

ARAMAN, S.F., 1979. Protein digestion and synthesis in ixodid females. In: Recent Advances in Acarology, vol.1, Academic Press Inc., New York.

AZIZ, S.A. & KNOWLES, C.O., 1973. Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide Chlordimeform and related compounds. Nature, 242: 417-418.

BECK, A.A.H., 1979. Carrapato dos bovinos Boophilus microplus. In: Anais do 1º seminário nacional sobre

parasitose dos bovinos. Campo Grande - MS, p. 191-205.

BENNETT, F.G., 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, t.XVI, fasc. I, 52-61.

BOCTOR, F.N. & KAMEL, M.Y., 1976. Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick, *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem.*, 6: 233-240.

BREMNER, K.C., 1959. Studies on "HAEMIXODOVIN", the pigment in the eggs of the cattle ticks, *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Aust. J. Biol. Sci.*, 12: 263-273.

CHINZEI, Y., 1983. Quantitative changes of vitellogenin and vitellin in adult female ticks, *Ornithodoros moubata*, during vitellogenesis. *Mie Medical J.*, XXXII(3): 117-127.

CHINZEI, Y., 1984. An approach for elucidating the mode of action of Juvenile Hormone. *Shokubutsu Boeki* (em japonês), 38(2): 51-57.

CHINZEI, Y.; CHINO; H. & TAKAHASHI, K., 1983. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Comp. Physiol.*, 152: 13-21.

- DAVIS, B.J., 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Ann. NY Acad. Sci., 121: 301-355.
- DIEHL, P.A., 1970. Zur oogenese bei *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea: Argasidae) unter besonderer berücksichtigung der vitellogenese. Acta. Tropica, XXVII(4): 301-355.
- FINNEY, D.J., 1971. Probit analysis. 3^a ed., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 331.
- HARRIS, E.G., 1977. Report to FAO on the assessment of an acaricide resistance test method and the assembly and distribution of prototype test kits. In: Second FAO expert consultation on research on tick-borne diseases and their vectors. FAO, Rome, pp. 21.
- HITCHCOCK, L.F. 1953. Resistance of cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) to benzene hexachloride. Aust. J. Agr. Res., 4: 360-364.
- HOLDEN, J.S. & HADFIELD, J.D., 1975. Chlorodimeform and its effect on monoamine oxidase activity in the cattle tick, *Boophilus microplus*. Specialia, 15(9): 1015-1017.

- HORIO, T. & YAMASHITA, J., 1981. Experiência básica sobre proteína e enzima (texto em japonês). Nankodo, Tóquio, pp. 450.
- KITAOKA, S. & YAJIMA, A., 1961. Comparison of effectiveness between pesticides against *Boophilus microplus* by topical application and spraying. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1(1): 41-52.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- MCCOSKER, P.J., 1979. Global aspects of the management and control of ticks of veterinary importance. In: Recent Advances in Acarology, vol. II., Academic Press, New York, pp. 569.
- MIYAZAKI, K. & HAGIWARA, H., 1981. "A variação de eletroforese em gel de poliacrilamida" (texto em japonês). In: Experiência básica sobre proteína e enzima (texto em japonês). Nankodo, Tóquio, pp. 269-301.
- NOLAN, J. 1981. Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. In: Tick Biology and Control. Proceeding of an International Conference in

- Rhodes University - Grahamstown, South Africa, pp. 109-114.
- NOLAN, J. & ROULSTON, W.J., 1979. Acaricide resistance as a factor in the management of acari of medical and veterinary importance. In: Recent Advances in Acarology, Vol. II, Academic Press, New York, pp. 3-13.
- NOLAN, J.; ROULSTON, W.J. & WHARTON, R.H., 1977. Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT-resistant strain of *Boophilus microplus*. Pestic. Sci., 8: 484-486.
- NOLAN, J. & SCHNITZERLING, H.J., 1975. Characterization of acetylcholinesterases of acaricide-resistance and susceptible strain of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) I. Extraction of the critical component and comparison with enzyme from other sources. Pestic. Biochem. & Physiol., 5: 178-188.
- NOLAN, J. & SCHNITZERLING; H.J., 1976. Characterization of acetylcholinesterases of acaricide-resistant and susceptible strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). II. The substrate specificity and catalytic efficiency of the critical enzyme component. Pestic. Biochem. & Physiol., 6: 142-147.
- NOLAN, J.; SCHNITZERLING, H.J. & SCHUNTNER, C.A., 1972.

- Multiple forms of acetylcholinesterase from resistant and susceptible strains of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Can.). Pestic. Biochem. & Physiol., 2(1): 85-84.
- OBENCHAIN, F.D., 1979. Non-acaricidal chemicals for the management of acari of medical and veterinary importance. In: Recent Advances in Acarology, vol II., Academic Press, New York, pp. 35-43.
- OBENCHAIN, F.D.; DHADIALLA, T.S.; AHMAD, Z. & OJOWA, R., 1979. The processing of lipovitellins in the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. ICIPE Annual Report 1978, Nairobi, pp. 42-43.
- OBENCHAIN, F.D. & OLIVER, J.H., Jr., 1973. A qualitative analysis of the form, function and interrelationship of fat body and associated tissues in adult ticks (Acari - Ixodoidea). J. Exp. Zool., 186: 217-236.
- PATARROYO, J.H. & COSTA, J.O., 1980. Susceptibility of brazilian samples of *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. Trop. Anim. Hlth. Prod., 12: 6-10.
- POUND, J.M. & OLIVER, J.H., Jr., 1979. Juvenile Hormone: Evidence of its role in the reproduction of ticks. Science,

206: 355-357.

POWELL, R.T., 1977. Project tick control. Advisory Leaflet N° 856, Queensland, Australia, pp. 35.

REICH, C.I. & ZORZÓPULOS, J., 1978. *Boophilus microplus*: Characterization of larval proteases. Experimental Parasitology, 44: 1-6.

ROULSTON, W.J.; SCHNITZERLING, H.J. & SCHUNTNER, C.A., 1968. Acetylcholinesterase insensitivity in the Biarra strain of the cattle tick *Boophilus microplus* as a cause of resistance to organophosphorus and carbamate acaricides. Aust. J. Biol. Sci., 21: 759-767.

ROULSTON, W.J.; SCHUNTNER, C.A.; SCHNITZERLING, H.J. & WILSON; J.T., 1969. Detoxication as a resistance mechanism in a strain of *Boophilus microplus* resistant to organophosphorus and carbamate compounds. Aust. J. Biol. Sci., 22: 1585-1589

SCHUNTNER, C.A., 1971. Metabolism of chlorphenamide in larvae of the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. J. Biol. Sci., 24: 1301-1308.

SCHUNTNER, C.A. & THOMPSON, P.G., 1976. Inhibition of a carbaryl oxidising enzyme as the primary lesion in the

- lethal action of formamidines in *Boophilus microplus*. J. Aust. Ent. Soc., 15: 388.
- SCHUNTNER, C.A. & THOMPSON, P.G., 1978. Mechanism of resistance to bromophos-ethyl in two strain of the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. J. Biol. Sci., 31(4): 317-325.
- SHAW, R.D., 1966. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. Commonwealth Agricultural Bureaux, pp. 389-405.
- SMALLMAN, B.N. & RIDDLES, P.W., 1977. Choline acetyltransferase in organophosphorus-resistant and susceptible strains of the cattle tick, *Boophilus microplus* Pestic. Biochem. & Physiol., 7(4): 355-359.
- STONE, B.F. & HAYDOCK, K.P., 1962. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Bull. Entomol. Res., 53: 563-578.
- STONE, B.F.; WILSON, J.T. & YOULTON, N.J., 1976. Linkage and dominance characteristics of genes for resistance to organophosphorus acaricides and allelic inheritance of decreased brain cholinesterase activity in three strains of

- the cattle tick, *Boophilus microplus*. Aust. J. Biol. Sci., 29: 251-263.
- STONE, B.F. & WEBBER, G., 1960. Cattle ticks, *Boophilus microplus*, resistant to DDT, BHC, and Dieldrin. Aust. J. Agr. Res., 11: 105-119.
- TATCHELL, R.J., 1971. Electrophoretic studies on the proteins of the haemolymph, saliva, and eggs of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochem., 1: 47-55.
- WEBER, K. & OSBORN, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244(16): 4406-4412.
- WHARTON, R.H. & NORRIS, K.R., 1980. Control of parasitic arthropods. Veterinary Parasitology, 6: 135-164.
- WHARTON, R.H. & ROULSTON, W.J. 1970. Resistance of ticks to chemicals. Ann. Rev. Entomol., 15: 381-404.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1943. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. Proc. Royal Soc. London. (Biol.), 131: 313-339.
- ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H. & WOODLOCK, J.J.,

1968. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 73: 148-152.

VII. A P Ê N D I C E

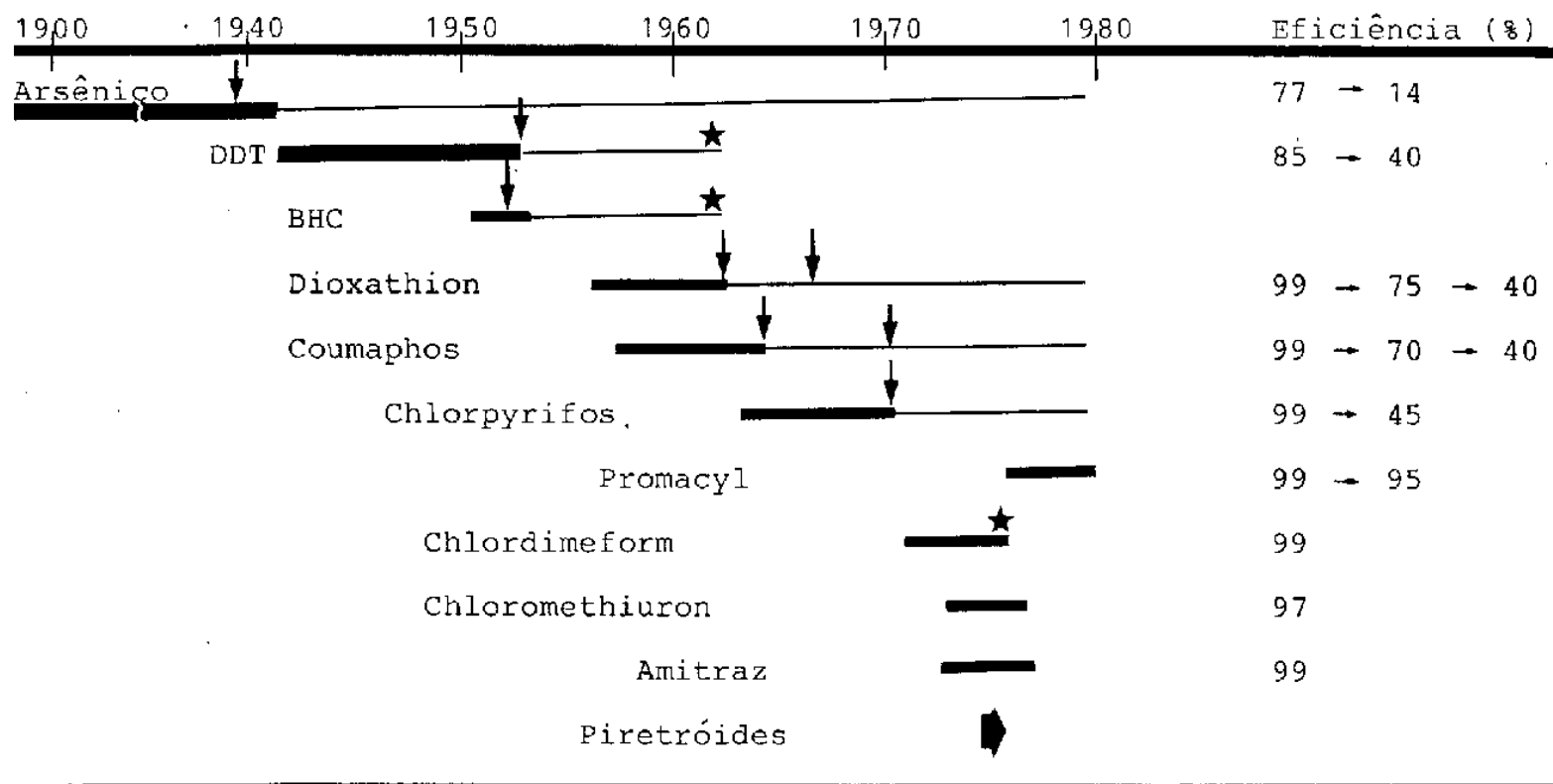


Figura 1. Desenvolvimento seqüencial da resistência na espécie *Boophilus microplus* na Austrália e a redução da eficiência dos acaricidas. (WHARTON & NORRIS, 1980)

- █ : Tempo de uso do produto
- ▬ : Uso limitado a poucas regiões
- ★ : Retirados do mercado ou uso proibido
- ↓ : Resistência reconhecida
- ➡ : Examinados no campo

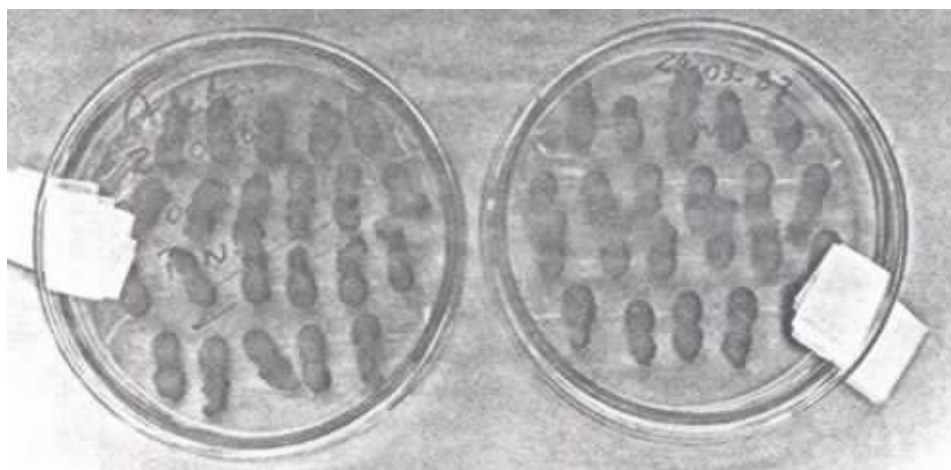


Figura 2. Ovopostura de *B. microplus* no 4° a 6° dia após a coleta.

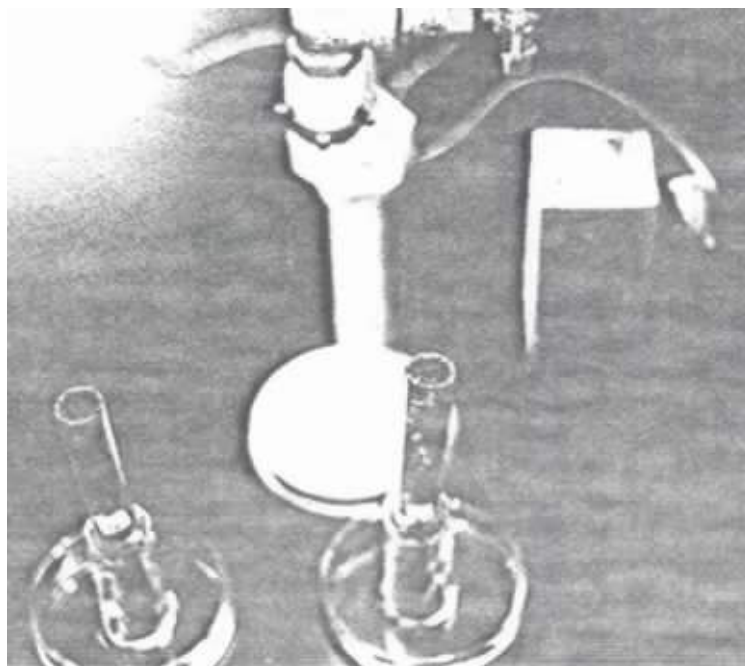


Figura 3. Larvas de *B. microplus* de duas semanas de idade.

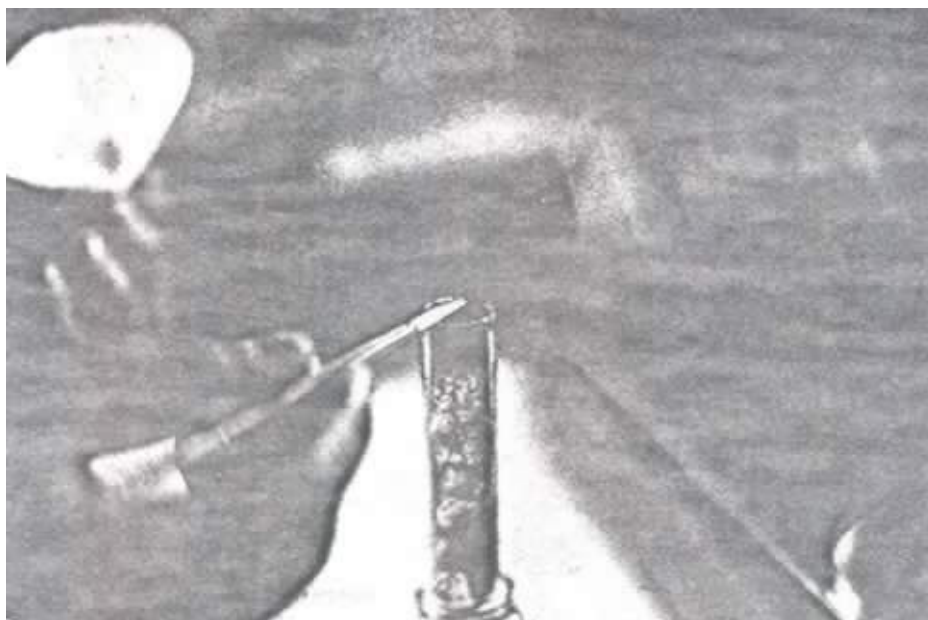


Figura 4. Coleta das larvas de *B. microplus* no tubo de ensaio com um pincel n° 1.



Figura 5. Transferência das larvas de *B. microplus* para um funil de papel de filtro.

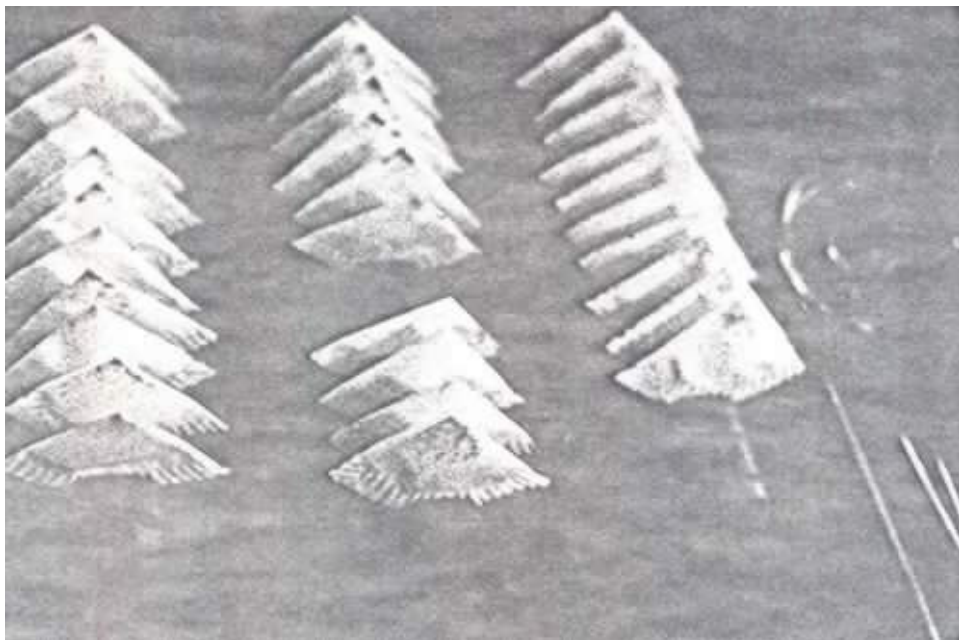


Figura 6. Funis contendo as larvas de *B. microplus* com sua base lacrada.

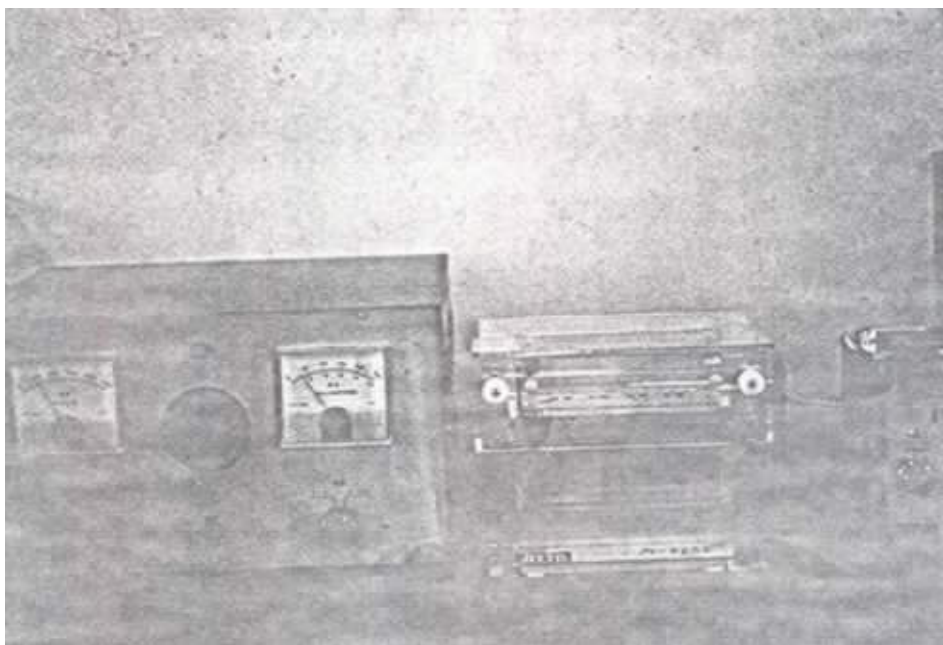


Figura 7. Sistema de "Slab" eletroforese em gel de poliacrilamida com ou sem dodecil sulfato de sódio.

Nome do produto	Idade das larvas	DL 50 (%)	Limite da confiança (95%)	Regressão linear
COUMAPHOS	1ª semana	0,024549	0,000002	$Y = 5,994 + 7,190(X - 2,537)$
	2ª semana	0,020760	0,000028	$Y = 6,014 + 7,383(X - 2,463)$
	3ª semana	0,020121	0,000002	$Y = 6,090 + 8,612(X - 2,439)$
	4ª semana	0,020712	0,000005	$Y = 5,574 + 12,993(X - 2,369)$
	5ª semana	0,011488	0,000003	$Y = 5,627 + 8,347(X - 2,144)$
DECAMETHRIN	1ª semana	0,000795	0,000029	$Y = 5,730 + 3,824(X - 1,098)$
	2ª semana	0,001712	0,000032	$Y = 5,369 + 3,400(X - 1,349)$
	3ª semana	0,000837	0,000004	$Y = 5,667 + 4,777(X - 1,069)$
	4ª semana	0,000552	0,000019	$Y = 5,687 + 3,453(X - 0,947)$

Tabela 1. Susceptibilidade de cada período de idade das larvas, *Boophilus microplus* em Pindamonhangaba.

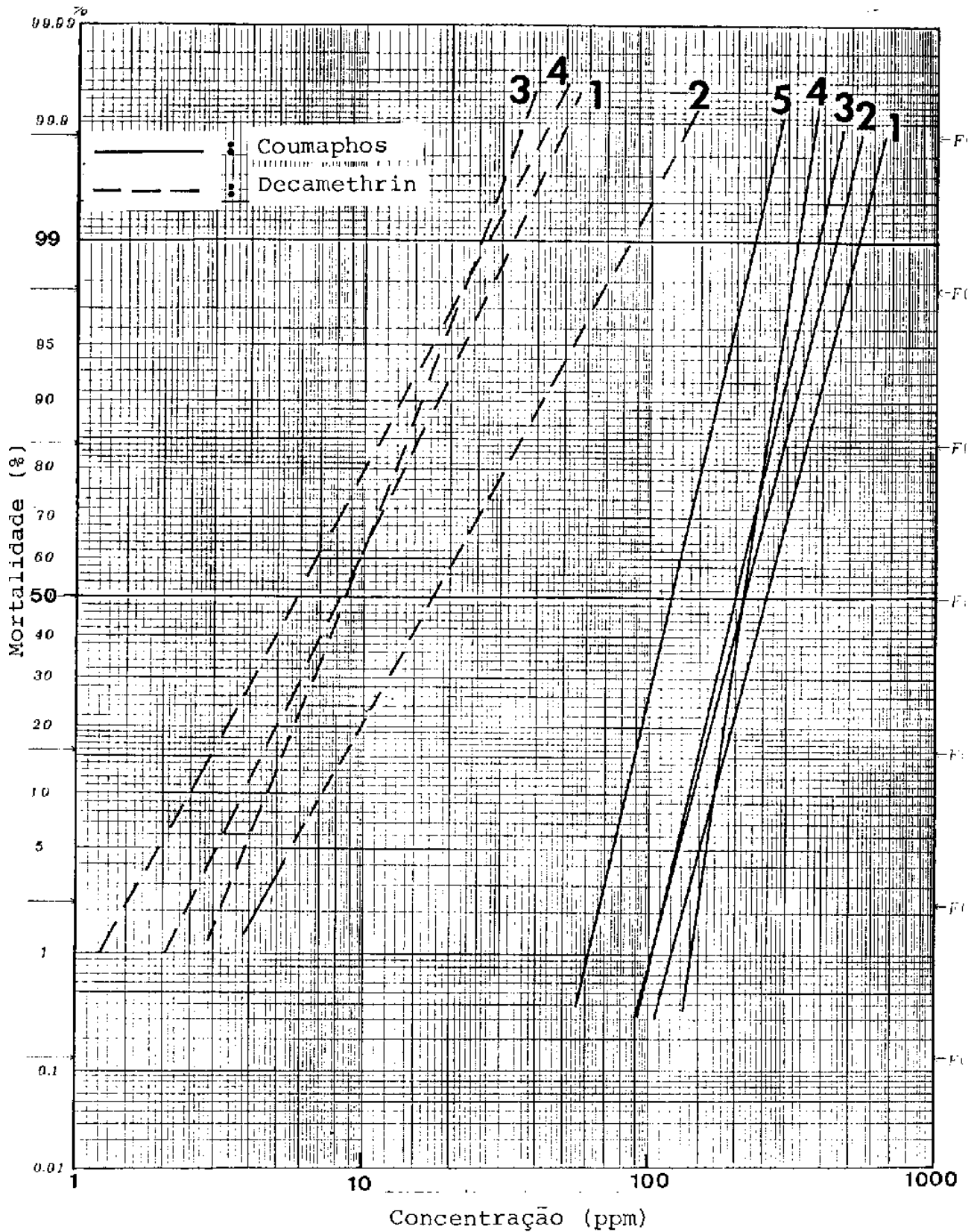


Figura 8. Comparação da susceptibilidade das larvas de *B. microplus* em diferentes idades, provenientes de Pindamonhangaba aos acaricidas, Coumaphos e Decamethrin.

Nome do Produto	Local	DL 50 (%)	Limite de Confiança (95%)	Regressão Linear	Razão de Resistência Pindaba/Arujá
Malathion	Arujá	0,055858	0,000003	$Y=5,556 + 4,679(X-2,910)$	1,41
	Pindaba	0,078801	0,000014	$Y=5,502 + 5,007(X-3,033)$	
Cl-fenvinphos	Arujá	0,021294	0,000004	$Y=5,824 + 5,959(X-2,505)$	1,69
	Pindaba	0,036032	0,000002	$Y=5,729 + 9,253(X-2,679)$	
Coumaphos	Arujá	0,010373	0,000003	$Y=5,807 + 5,877(X-2,162)$	1,49
	Pindaba	0,015422	0,000005	$Y=5,947 + 6,712(X-2,338)$	
Fenvalerate	Arujá	0,006397	0,000004	$Y=5,496 + 5,919(X-1,926)$	0,94
	Pindaba	0,006008	0,000004	$Y=5,514 + 4,799(X-1,922)$	
Decamethrin	Arujá	0,000715	0,000006	$Y=5,696 + 3,993(X-1,035)$	1,10
	Pindaba	0,000783	0,000006	$Y=5,621 + 3,862(X-1,061)$	

Tabela 2. Comparação da susceptibilidade das larvas de *B. microplus* de duas semanas de idade, provenientes de Arujá e Pindamonhangaba no Estado de São Paulo.
 * Pindaba : Pindamonhangaba; Cl - fenvinphos : Chlorfenvinphos

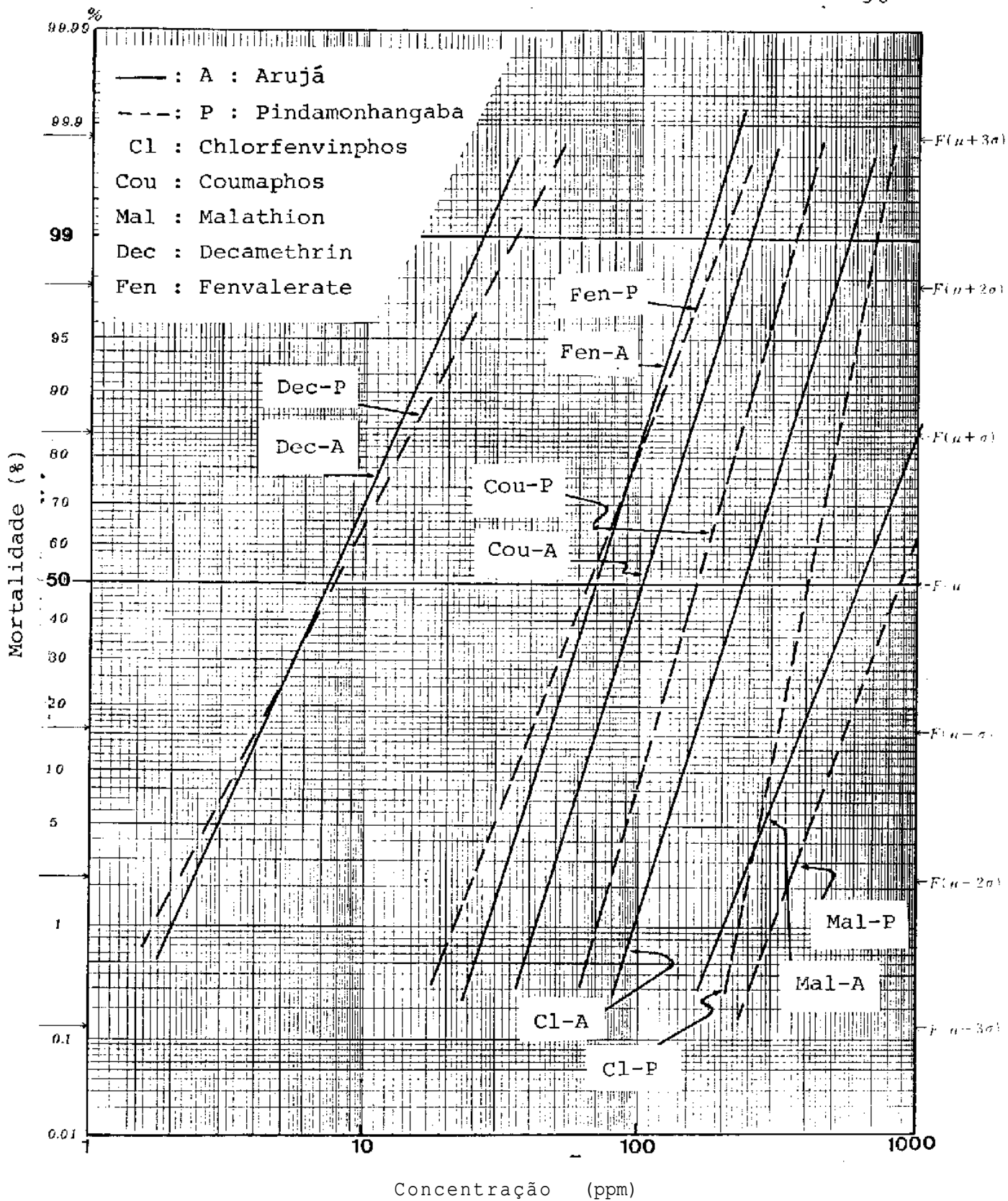


Figura 9. Susceptibilidade das larvas de *B. microplus* provenientes de Arujá e Pindamonhangaba a 5 acaricidas.

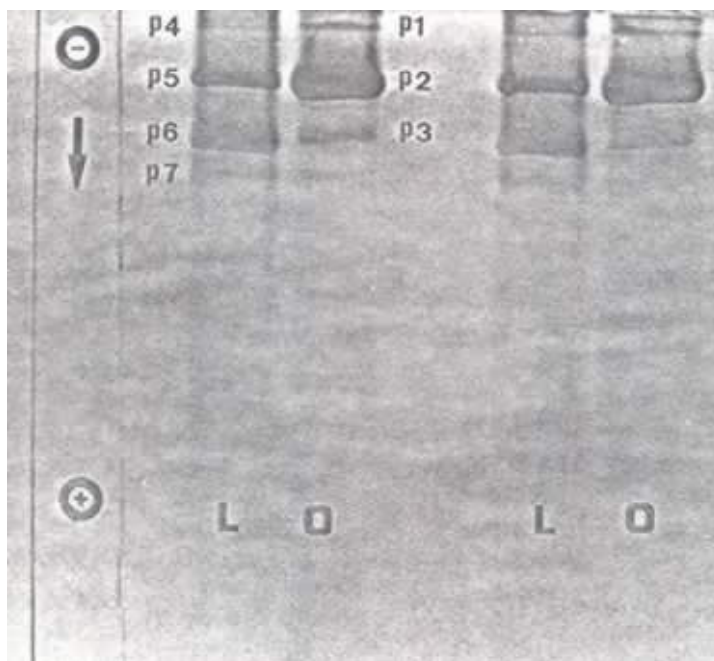


Figura 10. "slab" eletroforese em gel de poliacrilamida: as proteínas dos ovos (O) e das larvas (L).

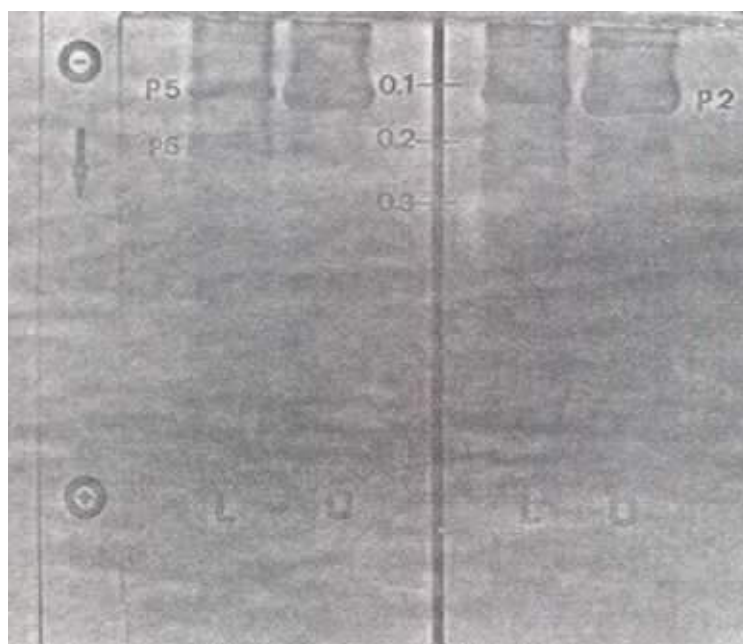


Figura 11. Cálculo da migração eletroforética das proteínas dos ovs (O) e das larvas (L).

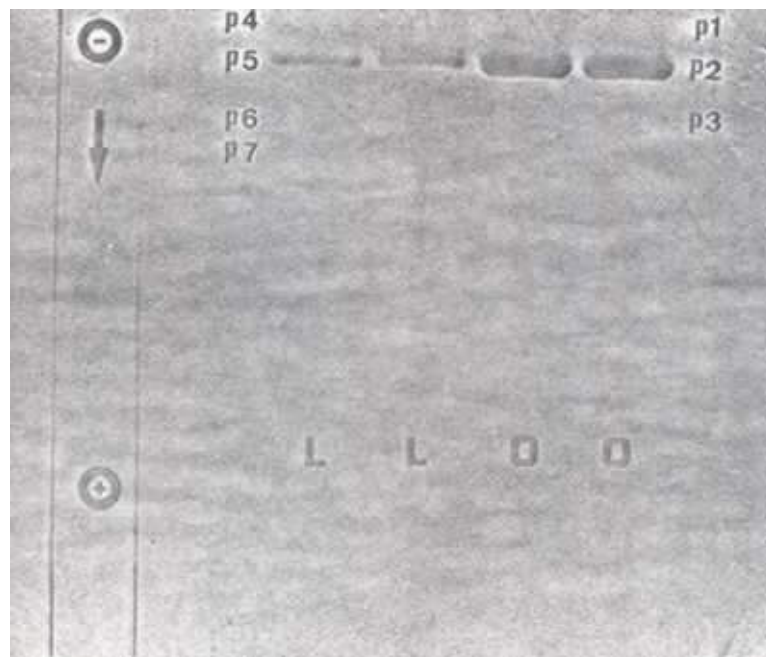


Figura 12. Identificação da glicoproteína dos ovos (O) e das larvas (L) pela relação PAS.

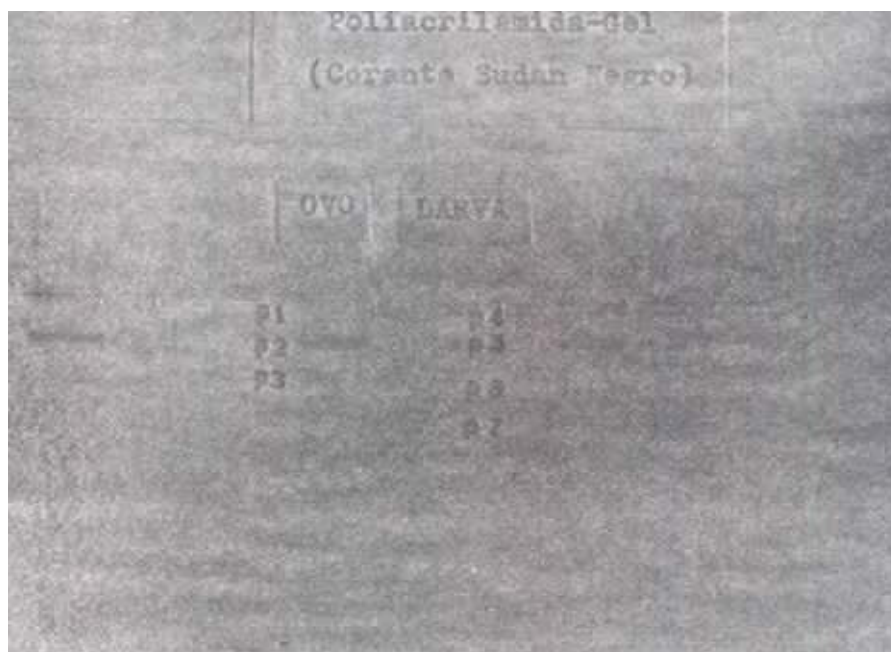


Figura 13. Identificação da lipoproteína dos ovos e das larvas pelo corante Sudan Negro B.

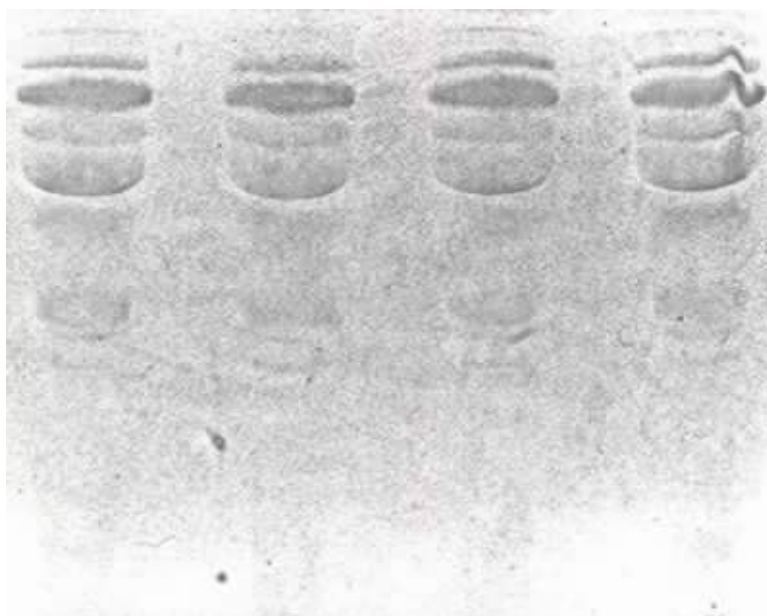


Figura 14. "Slab" - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE): as proteínas dos ovos foram desnaturadas com 2% de SDS e 5% de 2-mercaptoetanol em 100°C durante 2 minutos e aplicadas com 0,1% de SDS.

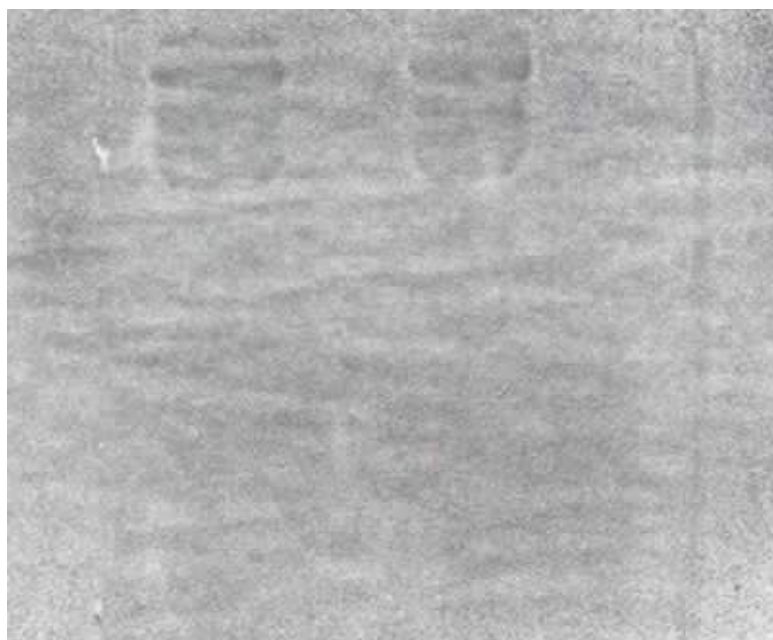


Figura 15. Identificação das glicoproteínas dos ovos pela PAS em SDS - PAGE.

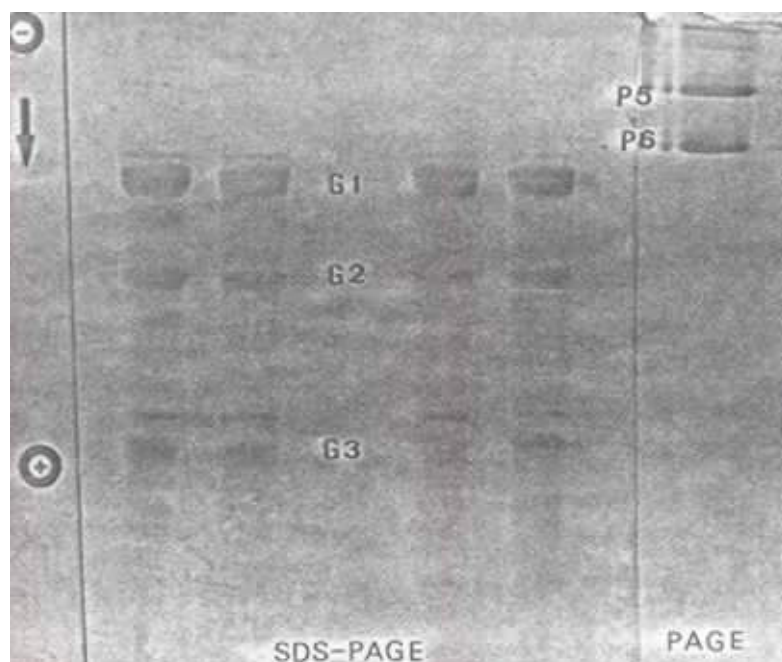


Figura 16. Comparação das proteínas das larvas entre PAGE e em SDS - PAGE.

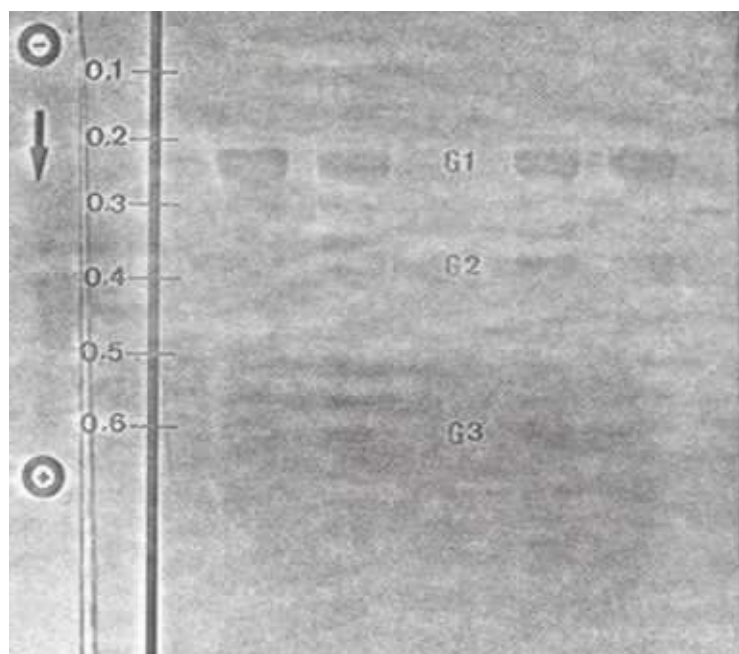


Figura 17. Migração eletroforética das proteínas das larvas em SDS - PAGE.

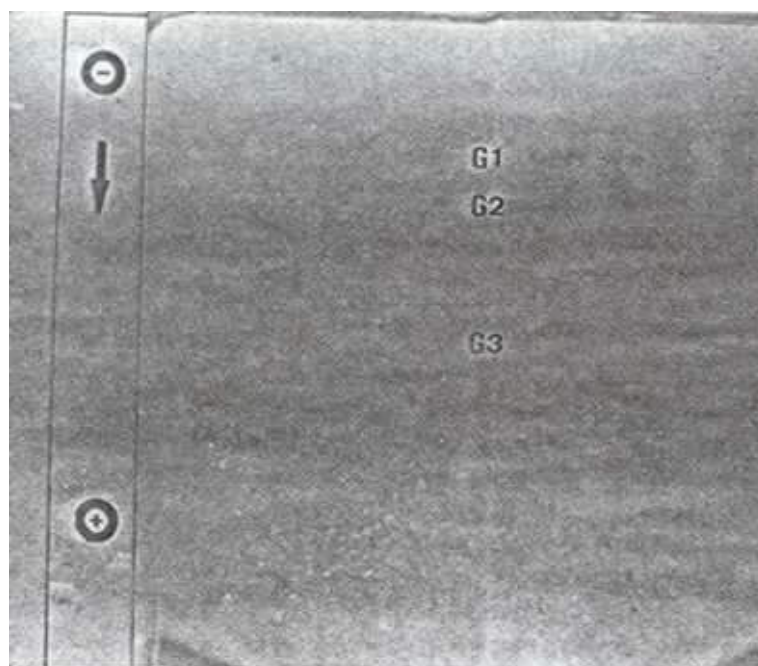


Figura 18. Identificação das glicoproteínas das larvas pela reação PAS em SDS - PAGE.