



**Protocolos
sobre bioensaios
para diagnóstico
da resistência de
*Rhipicephalus
microplus* aos
acaricidas**

*Marcos Valério Garcia
Leandro de Oliveira Souza Higa
Jacqueline Cavalcante Barros
Renato Andreotti*



INTRODUÇÃO

Mundialmente presente nos rebanhos bovinos, o carrapato-do-boi (*Rhipicephalus microplus*) detém grande importância para a pecuária nacional e também mundial. No presente capítulo, teve-se como objetivo principal mostrar os protocolos laboratoriais utilizados para diagnosticar a resistência deste carrapato aos acaricidas de contato.

O carrapato *R. microplus* se destaca como um dos principais ectoparasitas causadores de perdas significativas na pecuária nacional e de muitos outros países. Existe uma estimativa de cálculo no Brasil onde os danos econômicos, tanto de forma direta quanto indiretamente relacionados ao parasitismo pelo carrapato-do-boi, somam um prejuízo no entorno de 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014).

Sabidamente este parasita necessita de apenas um hospedeiro para realizar seu ciclo de vida parasitária (monoxeno), sendo este hospedeiro preferencialmente o gado bovino (ROCHA, 1984). Por meio do processo de hematofagia podem inocular, por processo natural, juntamente com a sua saliva, diferentes patógenos causadores de doenças aos bovinos. Um exemplo clássico disso é a infecção por bactérias *Babesia bovis*, *B. bigemina* e pelo protozoário *Anaplasma marginale*, que são os agentes responsáveis pela enfermidade denominada Tristeza Parasitária Bovina (IPB) (GUGLIELMONE et al., 2006). Estas enfermidades já são bem definidas e descritas, sendo de fácil tratamento quando a doença é diagnosticada logo no início.

Neste contexto, Labruna et al. (2005) relatam que esses carrapatos também podem acometer diversos outros hospedeiros, seja acidental ou até naturalmente. Dentre eles podem ser destacados os cervídeos e os canídeos, entre outros (Figura 10.1).

Em se tratando do Brasil, sabe-se (dados não publicados) que cervídeos, quando em cativeiro, são bons hospedeiros, capazes de manter uma população deste carrapato. Tal situação também ocorre quando cervídeos de vida livre convivem com bovinos na mesma área de pastagem, sofrendo também com infestações de *R. microplus*.

FIGURA 10.1. Cervo em cativeiro com infestação de *Rhipicephalus microplus* (Foto cedida por Matias Pablo Juan Szabó e José Mauricio Duarte Barbante).



Outros animais que podem ser parasitados pelo carrapato-do-boi são os ovinos deslanados. Um estudo conduzido por Garcia et al. (2015), com ovinos deslanados, demonstrou a capacidade dos mesmos em manter pelo menos três gerações dos carrapatos na pastagem, apresentando, porém, declínio gradativo do número de indivíduos. É necessário, no entanto, mais estudos nessa área, pois existe um questionamento sobre a capacidade dessas espécies de hospedeiros secundários ou acidentais serem mantenedores de uma população do carrapato *R. microplus* em condições naturais no Brasil (Figura 10.2).

O que se pode afirmar categoricamente é que este ectoparasita é de grande interesse para a cadeia produtiva bovina e o mesmo representa, conforme colocado anteriormente, uma grande preocupação, pois os gastos relacionados com o controle e tratamentos de doenças por eles transmitidos são elevados.

A problemática maior é que atualmente, no Brasil, não existe uma política pública específica para o controle e venda de produtos acaricidas. Praticamente tudo o que se faz nessa área é movido, na maioria das vezes, somente por interesse comercial, acarretando uma sequência de erros e fracassos na tentativa de se controlar esses carrapatos.

Devido a essa realidade, o controle deste carrapato está cada vez mais difícil, levando em conta que não somente no Brasil, mas também no mundo, o carrapato *R. microplus* apresenta a capacidade de se tornar resistente aos acaricidas. A resistência pode ser proveniente de fatores genéticos previamente estabelecidos ou até mesmo por pressão de seleção, a qual pode ser exercida por tratamentos realizados com produtos em dosagens acima ou abaixo do recomendado pelo fabricante, sendo estes os principais fatores que contribuem para a seleção de cepas de carrapatos resistentes (FURLONG; PRATA, 2003). Uma vez resistentes estes ectoparasitas vão repassar aos seus descendentes toda carga genética relacionada à capacidade de resistência aos acaricidas que foram empregados na tentativa de controle.



FIGURA 10.2. Ovino deslanado, da raça Santa Inês, naturalmente infestado por *Rhipicephalus microplus*.
Foto: Jaqueline Matias.

Diante dessa realidade, Higa et al. (2015) relataram que a propagação de populações de carrapatos resistentes às bases químicas disponibilizadas comercialmente para o emprego do controle do *R. microplus* no Brasil, já se encontra presente em diversos estados (Figura 10.3). Ainda com relação ao mapa da figura 10.3, foi adicionado o relato de resistência à ivermectina no estado de São Paulo (CRUZ et al., 2015), cujo os autores relataram também a presença de resistência nos estados de Minas Gerais e Paraná. Também já está comprovada a triste realidade de que alguns estados apresentam populações de carrapatos multirresistentes (RECK et al., 2014).

Tal fato, realmente preocupante, faz com que exista uma maior necessidade por parte dos produtores e órgãos competentes de se criar uma política nacional de monitoramento da resistência do carrapato bovino frente aos acaricidas disponíveis no país, tornando assim uma realidade a prática do controle verdadeiramente efetivo deste carrapato. Com esse intuito é que a Embrapa Gado de Corte disponibiliza para toda a

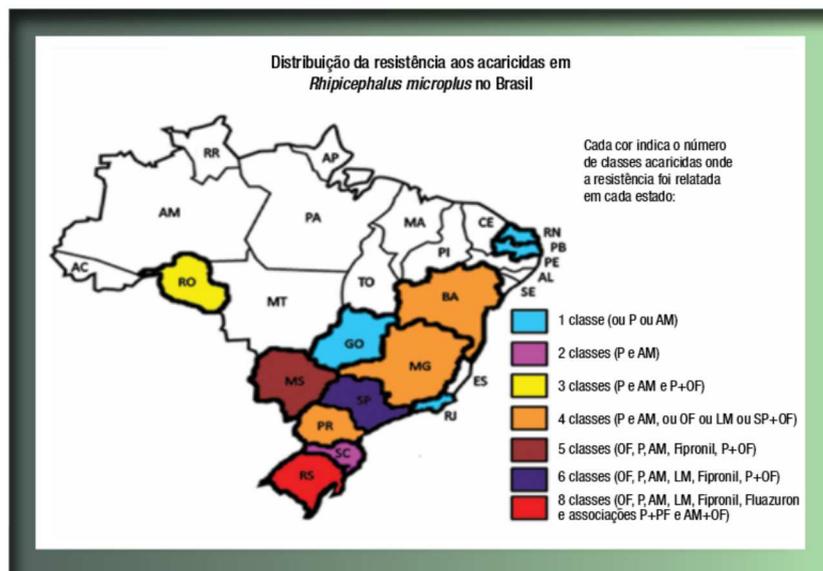


FIGURA 10.3. Mapa do Brasil no qual são indicadas as localidades aonde existem problemas com resistência do carrapato-do-boi aos acaricidas. Siglas: AM: amitraz; P: Piretroide; OF: Organofosforado; LM: Lactona Macroiclica. Modificado de Higa et al. (2015).

sociedade um serviço de monitoramento da resistência nas populações de carrapatos nas propriedades, não só do estado de Mato Grosso do Sul, mas também para interessados de qualquer outra procedência dentro do País.

De forma prática, rápida e gratuita, são realizados testes (biocarrapaticidogramas, toxicológicos, ou bioensaios) que visam diagnosticar a resistência dos carrapatos às diversas bases acaricidas existentes. Os resultados obtidos por estes testes permitem ao produtor maior segurança sobre qual acaricida deve ser adquirido para alcançar um controle com maior eficiência do carrapato-do-boi.

Neste documento são relatadas algumas técnicas já padronizadas e reconhecidas pela FAO (DRUMMOND et al., 1973), comumente utilizadas (protocolos) para o emprego do reconhecimento da resistência do carrapato frente aos acaricidas.

No site da Embrapa Gado de Corte (<https://www.embrapa.br/gado-de-corte>) encontram-se disponíveis as Informações necessárias para a coleta e envio de carrapatos, bem como o questionário a ser preenchido com informações da área de coleta e sobre os animais nos quais os carrapatos foram colhidos. Além disso, no mesmo acesso acima mencionado, é possível visitar o Museu Virtual do Carrapato, com imagens e informações sobre as espécies presentes em Mato Grosso do Sul e, também, em outros estados brasileiros.

CICLO DE VIDA DO CARRAPATO-DO-BOI

Como já foi anteriormente mencionado, este carrapato apresenta ciclo de vida monoxeno, ou seja, precisa somente de um hospedeiro para cumprir seu ciclo de vida parasitária (Figura 10.4). É importante conhecer o ciclo de vida do carrapato *R. microplus* para podermos entender as estratégias de controle. O primeiro passo nesse processo de tomada de decisão para o controle deve levar em conta a sazonalidade de ocorrência e outros detalhes sobre a biologia da espécie em questão, e se existem ou não relatos na região sobre populações de carrapatos resistentes aos acaricidas de contato.

Os adultos, machos e fêmeas, acasalam sobre o bovino, e as fêmeas (teleóginas) começam então o processo de alimentação e ingurgitamento com sangue.

As teleóginas, ao ingerir sangue, armazenam alimento adequado e suficiente para a produção dos ovos. Uma vez repletas, tendo aumentado cerca de duzentas vezes o seu peso, se desprendem do animal. Isso ocorre, de preferência, nas primeiras horas da manhã.

A partir daí inicia-se a fase de vida livre do carrapato que é chamada de “fase não parasitária”, uma vez que a mesma se desenvolve fora do bovino. No chão, a teleógina procura um lugar úmido e abrigado do sol. Ali ela começa a fazer a digestão dos componentes do sangue ingerido, no intuito de obter matéria-prima (energia) para a formação dos ovos.

Cada fêmea, em condições normais, transforma 52% do seu peso em ovos, o que equivale a aproximadamente 3.000 ovos. Esses ovos, por sua vez, se desenvolvem e originam larvas, popularmente conhecidas como “micuins”.

As larvas, logo após a eclosão, ficam no chão, próximas às cascas dos ovos, por um período de dois a três dias, aguardando o endurecimento da sua cutícula ou carapaça. Depois, mantendo-se agrupadas, sobem no primeiro talo de planta que encontram, permanecendo juntas e formando “bolinhos”, à espera da passagem de seus hospedeiros.

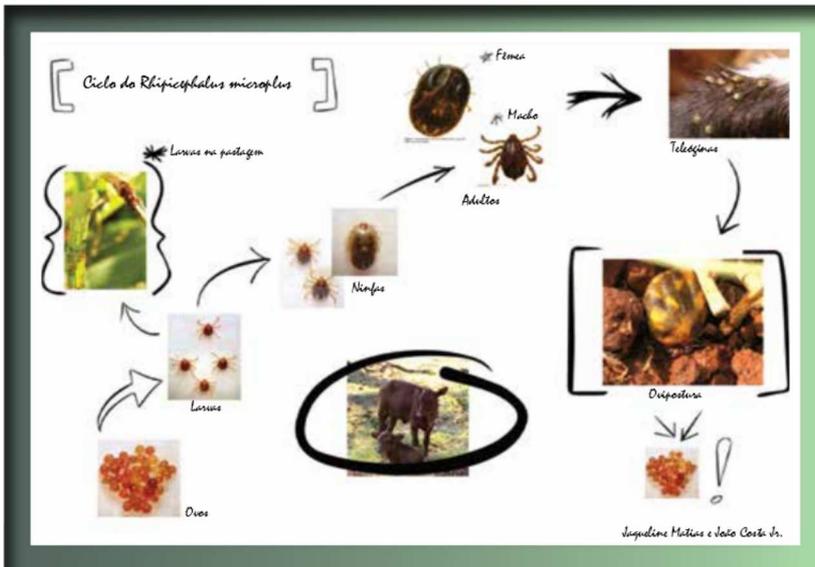


FIGURA 10.4. Ciclo de vida do carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*.

Atraídas pelo gás carbônico da respiração dos animais ou pelo deslocamento do ar, percebem a aproximação de hospedeiros, preferencialmente bovinos, nos quais tratam de subir e fixar-se. Começa aí, então, a chamada “fase parasitária” do ciclo de vida do carrapato.

Uma vez no hospedeiro as larvas procuram se aderir ao mesmo pela introdução de seu aparelho fixador. Ao se alimentarem passam a crescer, e em um período aproximado de 5 a 7 dias realizam a muda de larva para ninfa, a qual, após 10 a 15 dias, vai passar à fase adulta sexuada.

A partir do 18º dia as primeiras fêmeas, fecundadas e ingurgitadas, começam a desprender-se do hospedeiro. A maioria delas tende a cair durante o 22º dia de parasitismo, podendo esse período estender-se até o 25º dia.

O TRATAMENTO CARRAPATICIDA

O tratamento carrapaticida necessita de procedimentos básicos na sua ação técnica, tais como:

- Usar somente produtos que realmente são carrapaticidas e aprovados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA);

- Sempre utilizar a dose recomendada pelo fabricante;
- Toda extensão corporal do bovino deve ficar molhada com a calda (solução que contém o carrapaticida);
- Usar sempre equipamentos de proteção individual (EPIs) quando for pulverizar os animais, para evitar intoxicação.

Mesmo assim, não é possível confiar no sucesso do tratamento com determinado acaricida caso não se conheça o grau de resistência dos carrapatos, para ter certeza da eficácia do produto que se for usar.

O CONTROLE ESTRATÉGICO

Além do uso de produtos químicos, neste caso carrapaticidas adequados ao controle de carrapatos, é fundamental a sua aplicação de forma estratégica para obter êxito no controle. Para estabelecer o controle estratégico do carrapato-do-boi é importante considerar os pontos a seguir:

- Recomenda-se uma série de cinco ou seis tratamentos com intervalos de 21 dias, no final do período seco do ano;
- Escolher o carrapaticida mais eficiente para combater os carrapatos da propriedade (teste carrapaticida);
- Um tratamento é bem feito, quando o produto é utilizado na dose recomendada, bem misturado, e molhando todo o corpo do animal.

Considerar a avaliação dos carrapaticidas disponíveis no comércio frente a uma determinada população de carrapatos é importante, e saber como realizar os testes é o que será mostrado a seguir.

PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS PARA TESTES DE SENSIBILIDADE DOS CARRAPATOS AOS CARRAPATICIDAS

A escolha de um carrapaticida que realmente combata os carrapatos nos bovinos é a principal preocupação dos produtores. Esta escolha deve ser feita por meio de testes específicos, uma vez que, embora os carrapatos sejam da mesma espécie, cada propriedade possui uma população diferente de carrapatos, selecionada de acordo com os produtos químicos com os quais já teve contato.

Procedimentos necessários para coleta e envio dos carrapatos

- Separar do rebanho no mínimo um animal e deixa-lo sem tratar com carrapaticida por aproximadamente 25 dias, caso o produto usado nos bovinos no último tratamento tenha sido de contato (banho ou aspersão). Caso o carrapaticida em uso for sistêmico, do tipo “pour on” ou injetável, os animais devem ficar sem novo tratamento por 35 dias, e em casos como o fluazuron, esperar acima de 40 dias, conforme indicação dos fabricantes. Este cuidado é necessário para que os carrapatos que forem colhidos para o teste não contenham resíduo de carrapaticidas;
- Coletar uma quantidade razoável de fêmeas de carrapato (200 ou mais), bem grandes (repletas de sangue/ingurgitadas), conhecidas popularmente como “mamonas” ou “jabuticabas”. A melhor hora para coleta é no período da manhã, ocasião na qual

os animais possuem a maior infestação por este tipo de carrapato, e há menor estresse (quando há maior umidade e a temperatura está mais amena);

- Acondicionar os carrapatos em potes de plástico ou caixinhas de papelão com tampa, fazendo orifícios pequeninos que permitam a entrada de ar. Tomar cuidado com o tamanho dos orifícios para evitar a fuga dos carrapatos;
- Identificar o material, informando nome do proprietário, propriedade, município da propriedade, endereço e telefone para envio dos resultados e, se possível, endereço eletrônico;
- É muito importante que os carrapatos coletados sejam enviados no mesmo dia da coleta, de preferência no início da semana (segunda à quarta). Quando isso não for possível, pode ser feito no dia seguinte, mantendo os carrapatos, até serem enviados, devidamente acondicionados na parte inferior da geladeira. Se as teleóginas chegarem com início da postura é possível realizar apenas o teste com as larvas posteriormente, e não mais com as próprias teleóginas (para avaliar efeito sobre a postura);
- O resultado parcial do melhor carrapaticida a utilizar pode ser conhecido depois de decorridos 10 dias após o teste. O resultado final será entregue entre 35 a 40 dias e estes resultados são válidos apenas para as amostras de carrapato da propriedade onde foi realizada a coleta;
- O ideal é que o teste seja realizado anualmente, de preferência antes da época da implantação de um controle estratégico, para se conhecer o melhor produto a ser utilizado;
- Os três procedimentos básicos para manter os carrapatos sob controle, reduzindo os prejuízos causados por estes parasitas são: o conhecimento prévio do carrapaticida mais adequado para uma determinada população de carrapatos, a melhor época para se combater o carrapato, e como preparar e aplicar o carrapaticida de forma correta.

Recebimento e preparo das amostras (laboratório)

Ao chegarem ao laboratório, os carrapatos são banhados com água corrente para retirar resíduos e/ou sujeiras. Em seguida, as teleóginas são secas sobre bandejas cobertas de papel absorvente. Ali se inicia a escolha dos indivíduos maiores, em melhor estado de integridade física, que demonstram maior capacidade de mobilidade e coloração característica, ou seja, os carrapatos mais saudáveis.

Para cada princípio ativo a ser testado, utiliza-se um grupo de contendo 10 teleóginas, acondicionadas em placas de Petri. Sempre os testes são acompanhados de um grupo controle (com dez teleóginas), que servirá como referência quando comparado aos grupos tratados, ou seja, se o produto testado é eficaz ou não. Todos os grupos são pesados em balança analítica para efeito de homogeneidade no peso entre os tratamentos. Isso constitui fato importante, pois o peso das fêmeas está diretamente relacionado à produção de ovos e, conseqüentemente, ao número potencial de larvas (que irá depender, também, do índice de eclodibilidade).

Produtos (bases químicas) utilizados

As bases químicas a serem utilizadas nos testes aqui apresentados referem-se a produtos que agem por contato, e incluem piretróides, organofosforados, amidínicos e as-

sociações entre piretroides e organofosforados. Todos os produtos que contém as bases citadas encontram-se disponíveis no mercado com diferentes nomes comerciais.

Escolha do teste a ser realizado com as amostras

Normalmente, costuma-se adotar no laboratório dois principais testes de sensibilidade dos carrapatos aos carrapaticidas. Estes testes são conhecidos como Teste de Imersão de Adultos (TIA) e Teste de Pacote de Larvas (T'PL). No entanto, existem outros testes que podem ser realizados, os quais serão abordados mais adiante.

TESTE DE IMERSÃO DE ADULTOS (TIA)

Para uso neste teste, para cada produto a ser testado, são preparadas 200 mL de solução em frascos (Figura 10.5) contendo o acaricida, na diluição recomendada pelo fabricante. Cada grupo de teleóginas é submerso nas respectivas diluições por cinco minutos.

Posteriormente, as teleóginas são retiradas da solução e o excesso de líquido é retirado com o auxílio de papel filtro. Em seguida as mesmas são acondicionadas em placas de Petri, fixadas dorsalmente em fita dupla face e mantidas por 14 dias à estufa (tipo BOD) em temperatura de 28°C e com umidade relativa de 80% (UR) (DRUMMOND et al., 1973).

Encerrada a oviposição, as massas de ovos são transferidas para seringas vedadas com algodão ("cotton plug"), e mantidas em BOD, nas mesmas condições acima descritas, por mais 10 dias. Os parâmetros reprodutivos (peso das fêmeas ingurgitadas, peso da massa de ovos e a taxa de eclodibilidade são analisados segundo a "Eficiência Acaricida" (EA) descrita por Drummond et al. (1973). O produto acaricida é considerado eficiente quando $EA \geq 95\%$.



FIGURA 10.5. Teste Biocarrapaticidograma – Teste de Imersão de Adultos (TIA).
Foto: Leandro de Oliveira Souza Higa.

ER – Eficiência Reprodutiva;
PMO – Peso da massa de ovos;
PF1 – Peso da fêmea ingurgitada;
Eclo – Eclodibilidade.

$$ER = (PMO/PF1) \times \%Eclo \times 20.000^*$$

*Um grama de ovos de *R. microplus* corresponde a 20.000 larvas.

TESTE DE PACOTE DE LARVAS (TPL)

O teste TPL é executado de acordo com o protocolo proposto pela FAO (2004), conforme descrito por Stone; Haydock (1962). Papéis filtro recortados em formato de quadrado são impregnados com 700 μ L da respectiva diluição comercial de cada produto a ser testado (Figura 10.6).

Após a impregnação, os papéis são secos em temperatura ambiente por 24 horas. Decorrido esse período, aproximadamente 100 larvas de *R. microplus* são liberadas, com o auxílio de um pincel, nos pacotes montados com o papel impregnado pelas diluições a serem testadas e, então, fechados com presilhas (Figura 10.7) e acondicionados em estufa tipo BOD. Após 24 horas determina-se o percentual de mortalidade com base na relação entre larvas vivas e mortas, cujo resultado compõe um dos itens considerados no cálculo da eficácia do respectivo produto, que é obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade corrigida (\%)} = \frac{(\% \text{ mortalidade tratamento} - \% \text{ mortalidade controle})}{100 - \% \text{ mortalidade controle}} \times 100$$

FIGURA 10.6. Impregnação dos papéis, com os diferentes acaricidas para o Teste de Pacote de Larvas (TPL).
Foto: Vinicius da Silva Rodrigues.





FIGURA 10.7. Pacote impregnado com acaricida contendo as larvas aprisionadas em seu interior.

Foto: Marcos Valério Garcia.

TESTE DE IMERSÃO DE LARVAS (TIL)

Outro teste que pode ser utilizado para monitorar a eficácia dos carrapaticidas em larvas é o Teste de Imersão de Larvas, desenvolvido por Shaw (1966). Segundo Sabatini et al. (2001), as soluções dos produtos a serem testados são preparadas de acordo com as recomendações do fabricante e, com o auxílio de um pincel, aproximadamente 100 larvas são imersas nessas soluções por um período de 10 minutos. Em seguida são retiradas, secas em papel filtro e depositadas em um pacote semelhante ao apresentado pelo protocolo do teste IPL. Após 24 horas os pacotes são abertos e realiza-se a contagem de larvas vivas e mortas.

TESTE DE PACOTE DE NINFAS

Esse teste foi realizado com ninfas do carrapato *Amblyomma sculptum*. Esta espécie de carrapato acomete equídeos e animais silvestres, mas pode também vir a se tornar um problema na pecuária. Esta preocupação procede em função de relatos do que vem ocorrendo em outros países, que mencionam infestações mistas entre *R. microplus* e carrapatos do gênero *Amblyomma*. Considerando-se que carrapatos do gênero *Amblyomma* e o carrapato-do-boi apresentam ciclos de vida distintos, caso isso também aconteça no Brasil, o combate a estes parasitas se tornaria mais difícil e oneroso do que é neste momento. Inclusive, não há como prever os efeitos e possíveis necessidades de ajustes no controle estratégico atualmente preconizado.

Diante disso, existe uma real preocupação em também monitorar a resistência desses ectoparasitas frente a determinados acaricidas. Para tanto, fez-se a adaptação da metodologia do Teste de Pacote de Larvas (IPL), mudando somente o número de carrapatos (ninfas) a serem desafiados aos acaricidas.

OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA

Além do método de detecção fenotípico (HIA e TPL), a resistência dos carrapatos aos acaricidas pode ser diagnosticada também por métodos bioquímicos e moleculares. Em relação às demais bases químicas, os organofosforados e piretroides possuem uma maior resolução quanto ao entendimento do funcionamento de seus mecanismos de ação (ABBAS et al., 2014; GUERRERO et al., 2012).

O mecanismo de ação da classe dos organofosforados está correlacionado ao aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE), pois Baxter; Barker (1998) observaram um aumento na atividade desta enzima em carrapatos resistentes ao acaricida. Pruetz; Pound (2006) aperfeiçoaram o método de extração da AChE, sendo a enzima obtida do singânglio de machos e fêmeas por meio de sonicação. Essa metodologia permite a reprodução dos procedimentos por outros pesquisadores para o diagnóstico da resistência aos fosforados e constitui também uma técnica mais refinada com resultados mais seguros.

A técnica consiste em três passos: Extração do Singânglio; Protocolo Padrão de Acetilcolina; Inibição da Atividade Esterásica.

Extração do singânglio

- Retirar o singânglio de carrapatos adultos (machos e fêmeas) por meio de dissecação;
- Alocar o material em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 100 µl de tampão de extração (10 mM de fosfato de sódio, pH 6,5, 1 mM EDTA e 0,5% Triton X-100);
- Os singânglios são rompidos por maceração com auxílio de cadinho e pistilo;
- A amostra extraída descansa uma hora à temperatura de 4°C;
- Sobrenadante contendo a acetilcolina extraída é coletado e em seguida centrifugado (14.400 rpm × g durante 15 minutos);
- A sonicação do singânglio é realizada com o aparelho sonicador (aparelho que causa o rompimento das células ou a homogeneização de líquidos não compatíveis), utilizando uma sonda microtip 2 milímetros;
- O tempo de sonicação ótima é de 4 ciclos com pulsos de 3 segundos e um intervalo de 5 segundos entre os pulsos (PRUETT; POUND, 2006);
- Após o processo de sonicação, a amostra é centrifugada por uma hora a 4°C.

Protocolo para dosar acetilcolina (AChE)

O protocolo para avaliação de atividade esterásica foi descrito por Ellman et al. (1961), sendo utilizado com modificações (substrato: acetilcolina iodada) no estudo de Pruetz; Pound (2006):

- Utilizar o substrato acetilcolina iodada em microplacas. A solução do substrato (0,12 mM) deve ser preparada em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, contendo 0,32 mM de reagente “Ellman’s”, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico).

O ensaio padrão para a atividade da AChE é composto por 20 µl de extrato de AChE e de 180 µl de solução de substrato. A taxa de reação é monitorada a 30 °C durante uma hora, medindo a absorbância a 405 nm a intervalos de 10 minutos, seguido de 5 segundos em agitador. A atividade da AChE é apresentada na forma de declínio da taxa de reação criada pelo aumento da absorbância ao longo do tempo.

A análise da distribuição normal dos dados para *R. microplus* pode ser alcançada com análise de variância unilateral (ANOVA) e o teste comparativo pode ser feito por meio do teste Tukey.

Protocolo para dosar inibição de atividade de AChE em amostras de *R. microplus*

As formas de oxon do parathion, coumaphós, e diazinon (paraoxon, coroxon e diazoxon, respectivamente) $2,5 \times 10^{-5}$ M foram usados em experimentos de inibição de organofosforados (OF).

Pode ser utilizado singânglio único de diferentes cepas para extrair AChE. O extrato do AChE é colocado em placas de microtitulação. Os inibidores respectivos dos OF são adicionados em concentrações conhecidas e em igual volume, e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, o período de incubação, 180 µl de substrato padrão para AChE é adicionado nos poços e a reação é monitorada nas mesmas condições que é feita para dosar a atividade de AChE. Ao controle de AChE sem os inibidores, é adicionado 25 µl de 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5. O efeito de inibição é expresso em porcentagem (%) de atividade de AChE no tempo de 30 minutos para leitura [$(\Delta$ absorbância da reação de inibição/ Δ absorbância da reação de não inibição) x 100].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, v. 203, n. 1-2, p. 6-20, 2014.
- BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 28, n. 8, p. 581-589, 1998.
- CRUZ, B. C.; LOPES, W. D. Z.; MACIEL, W. G.; FELIPELLI, G.; FÁVERO, F. C.; TEIXEIRA, W. F. P.; CARVALHO, R. S.; RUIVO, M. A.; COLLI, M. H. A.; SAKAMOTO, C. A. M.; COSTA, A. J.; OLIVEIRA, G. P. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 207, n. 3-4, p. 309-317, 2015.
- DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- FAO. *Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention*. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, p. 25-77, 2004.
- FURLONG, J.; PRATA, J. R. S. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Embrapa Gado de Leite, 2000, 2p. (Sustentabilidade da Atividade Leiteira, 34).
- GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. A. R.; BARROS, J. C.; MATIAS, J.; KOLLER, W. W. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 515, 2014.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; DE LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

- GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PEÑA, A. **Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal.** In: BARROS-BATTESTI, D. M. B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Eds.). Carrapatos de importância médica veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo/BR, p. 115-138, 2006.
- HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 7, p. 326-333, 2015.
- LABRUNA, M. B., R. S.; JORGE, D. A.; SANA, A. T.; JACOMO, C. K.; KASHIVAKURA, M. M.; FURTADO, C.; FERRO, S. A.; PEREZ, L.; SILVEIRA, T. S.; SANTOS JR, T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H.; GOMES, A. A.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F.; MORATO, R. L.; ALHO, C. J.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Experimental Applied Acarology**, 36, n. 1-2, p. 149-163, 2005.
- PRUETT, J. H.; POUND, J. M. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetyl cholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 355-363, 2006.
- RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'ANGOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. First report of fluzaron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-36, 2014.
- ROCHA, U.F. **Biologia e controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini)**. Jaboticabal: UNESP, 1984. 35p. (Boletim Técnico UNESP, 3).
- SABATINI, G. A.; KEMP, D. H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 53-62, 2001.
- SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 398-405, 1966.
- STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 3, p. 563-578, 1962.