

## ATIVIDADE DO FIPRONIL EM TESTE DE IMERSÃO COM LARVAS E NINFAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

<sup>1</sup>MOTTA, Manuela Pimentel da; <sup>1</sup>MARTINS, Lumara Vidal; <sup>1</sup>GAVA, Brena Guimarães; <sup>1</sup>SILVA, Ygor Henrique da; <sup>1</sup>AVELAR, Barbara Rauta de; <sup>1</sup>SCOTT, Fábio Barbour.

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Instituto de Veterinária/Departamento de Parasitologia Animal, Rodovia BR 465, Km 07 - Zona Rural - 23890-000 - Seropédica - RJ, Brasil, [motttamanuela@gmail.com](mailto:motttamanuela@gmail.com), [lumaravm18@gmail.com](mailto:lumaravm18@gmail.com), [brenergava@hotmail.com](mailto:brenergava@hotmail.com), [ygorhenrique97@hotmail.com](mailto:ygorhenrique97@hotmail.com), [barbararauta@gmail.com](mailto:barbararauta@gmail.com), [scott.fabio@gmail.com](mailto:scott.fabio@gmail.com).

### Resumo

Com objetivo de avaliar atividade do fipronil em teste *in vitro* de imersão com larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato foram obtidas soluções com as seguintes concentrações 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,156, 0,781, 0,390, 0,195 e 0,0975 µg/ml de fipronil, nas quais às fases alimentadas foram imersas por cinco minutos. E após 21 dias foi avaliada a mortalidade das larvas e ninfas ingurgitadas, considerando mortos os carrapatos que não completaram o processo de ecdise. Os dados de mortalidade foram analisados via probit e foram determinadas as concentrações letais 50 (CL<sub>50</sub>) de 21,39 µg/ml para larvas ingurgitadas e 50,89 µg/ml para ninfas ingurgitadas. Na maior concentração (50 µg/ml) as mortalidades obtidas foram de 95% e 80% para larvas e ninfas ingurgitadas, respectivamente. Conclui-se que metodologia de imersão proposta pode ser utilizada para avaliar a ação de compostos sobre as fases imaturas de carrapato. E que com este ensaio foi possível determinar a CL<sub>50</sub> do fipronil frente a larvas e ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l.

**Palavras-chave:** Carrapato. Controle. Metodologia *in vitro*.

**Área do conhecimento:** Ciências da saúde; Medicina veterinária.

### Introdução

*Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodida) (Latreille, 1906), conhecido popularmente como "carrapato vermelho do cão", é um ixodídeo de distribuição cosmopolita, sendo considerada a espécie de maior distribuição global (Dantas-Torres, 2009). Este artrópode é responsável por causar efeitos debilitantes a saúde dos cães, seu hospedeiro preferencial (Dantas-Torres, 2010), devido a perda sanguínea e a transmissão de patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* (Rotondano *et al.*, 2015).

Sua ampla distribuição é em grande parte devido ao seu ciclo trioxeno, que envolve a realização de todas as mudanças de fases de desenvolvimento (larva, ninfa e adultos) no ambiente. Ou seja, após as fases parasitárias realizarem o repasto sanguíneo, com completo ingurgitamento se desprendem do hospedeiro e vão ao ambiente onde realizam a ecdise que dura aproximadamente 21 dias pra cada fase (Monteiro, 2017). Portanto, o controle desses ixodídeos é desafiador, uma vez que eles passam mais de dois terços de sua vida no ambiente (Suzin, 2018)

Normalmente, as infestações por carrapatos são controladas com o uso acaricidas sintéticos direcionados ao sistema nervoso destes artrópodes, e que podem ser aplicados sistemicamente ou por contato direto. Como, por exemplo o fipronil pertencente à classe dos fenilpirazóis é amplamente utilizado na medicina veterinária para o controle de *R. sanguineus* s.l., atua bloqueando a transmissão de sinais através do antagonismo dos receptores γ-aminobutíricos (GABA) levando à neuroexcitação (Santos *et al.*, 2022). No entanto o uso errôneo e descontrolado levou ao relato de populações resistentes (Eiden *et al.* 2015; Dantas-Torres, 2018; Becker *et al.*, 2019). Conhecer suscetibilidade *in vitro* de diferentes fases evolutivas de *R. sanguineus* s.l. ao fipronil é importante para auxiliar nos diagnósticos de populações resistentes.

As avaliações *in vitro* sobre diferentes fases de desenvolvimento dos carrapatos também são importantes para auxiliar nos diagnósticos de populações resistentes a outras bases químicas e na prospecção de novos compostos com atividade acaricida. Dessa forma este estudo tem objetivo de avaliar um ensaio *in vitro* de imersão para larvas e ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. e determinar a concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) do fipronil frente estas fases evolutivas.

## Metodologia

Para os testes inicialmente foi preparada uma solução mãe a 2% de fipronil a partir de 0,100 mg do princípio ativo diluído 40% de DMSO, 12,5% de acetona, 2% de Triton X-100 e N-metilpirrolidona em quantidade suficiente para (qsp) completar 100%. E a partir de 0,05ml da solução mãe diluída em água destilada qsp 5ml obteve-se uma solução estoque a 0,002% de fipronil a partir da qual foram obtidas de forma seriada as soluções diluídas em água destilada com as seguintes concentrações: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,156, 0,781, 0,390, 0,195 e 0,0975 µg/ml utilizadas nos ensaios. Como controle negativo utilizou os diluentes nas seguintes proporções 1% de DMSO; 0,03125% de acetona; 0,005 de Triton X-100; 0,2% de N-metilpirrolidona e água destilada qsp 100%.

Os exemplares de *R. sanguineus* s.l. usadas no estudo foram obtidos da colônia laboratorial de carrapatos do Laboratório de Quimioterapia Experimental de Parasitologia Animal (LQEPV) aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob o número 9812271021. Os ensaios de imersão das larvas e ninfas foram realizados em triplicata, a metodologia usada foi adaptada de Drummond *et al.* (1973), na qual 30 exemplares larvas ou ninfas alimentadas foram imersas por 5 minutos em microtubos de 2ml (Eppendorf®) contendo 0,5 ml de solução com as concentrações em teste. Em seguida, os microtubos foram vertidos em papel absorvente e os carrapatos que permaneceram dentro do recipiente foram cuidadosamente removidos com um pincel nº00. Após a completa secagem em papel absorvente os carrapatos foram acondicionados em seringas de 3 ml adaptadas, previamente identificadas, e foram incubados em câmaras climáticas a 27 ± 1°C e 80 ± 10 por 21 dias para completa ecdise, quando foi avaliada a mortalidade. Foram considerados mortos os carrapatos que não completaram o processo de ecdise. O percentual de mortalidade foi calculado com base na fórmula descrita por Abbott (1925): Mortalidade (%) = (mortalidade do grupo tratado – mortalidade do grupo controle) / (100 – mortalidade do grupo controle) × 100.

A análise estatística dos dados foi feita via probit com a determinação das concentrações letais 50 (CL<sub>50</sub>) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) no programa Polo Plus.

## Resultado

Os resultados obtidos sobre a ação do fipronil frente a larvas e ninfas alimentadas de *R. sanguineus* s.l. encontra-se na tabela 1. Os maiores percentuais de mortalidade/inibição da ecdise foram observados na última concentração (50 µg/ml) com aproximadamente 95% para larvas e 80% para ninfas. As CL<sub>50</sub> com seus IC95% para ambas as fases foram de 21,39 µg/ml (13,24-27,39) para larvas e de 50,89 µg/ml (40,27-72,66) para ninfas (Tabela 2), e observando os slopes e o gráfico (Figura 1) com concentrações versus porcentagens de mortalidade nota-se que para larvas são necessárias menores concentrações para atingir percentuais de mortalidade maiores. Com resultados obtidos observou-se que metodologia de imersão empregada foi capaz de permitir a avaliação da ação do fipronil sobre larvas e ninfas alimentadas, utilizando baixos volumes de solução e número de indivíduos.

Tabela 1: Percentual de Mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato imersas em diferentes concentrações de fipronil.

Concentração (µg/ml)	Porcentagem de Mortalidade	
	Larvas ingurgitadas	Ninfas ingurgitadas
3.125	3.96	2.35
6.25	25.43	6.92
12.5	12.46	27.81
25	72.46	44.71
50	95.70	79.07

Tabela 2: Resultados da análise de probit de larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato imersas em diferentes concentrações de fipronil.

Fase	Concentração Letal 50 (CL <sub>50</sub> ) (µg/ml)	Slope	Heterogeneidade
Larvas ingurgitadas	21.39 (13.24 - 27.39)	5.111 ± 0.808	3.05
Ninfas ingurgitadas	50.89 (40.27 - 72.66)	2.098 ± 0.354	0.55

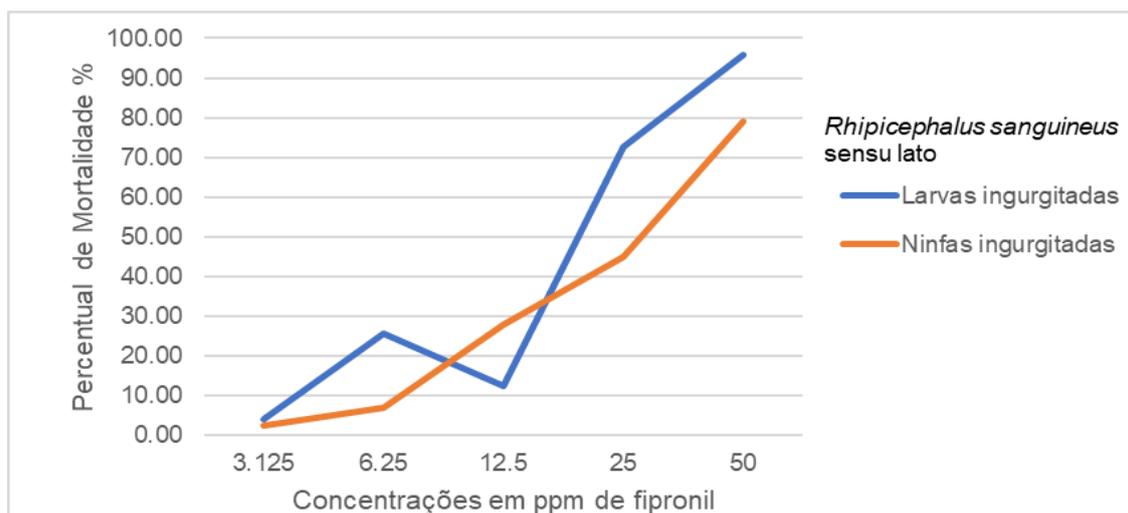


Figura 1. Gráfico com concentrações versus porcentagens de mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato imersas em diferentes concentrações de fipronil.

## Discussão

Na literatura é mais comum em ensaios *in vitro* o uso de larvas e ninfas não alimentadas, tanto para avaliar a resistência a acaricidas quanto para avaliar o potencial acaricidas de novos compostos (FAO, 2004; Eiden *et al.* 2015; Becker *et al.*, 2019; Coelho *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2024), porém é importante verificar e determinar a suscetibilidade de todas as fases evolutivas dos parasitos. Daemon *et al.* (2009) sugerem que as fases de larvas e ninfas alimentadas são mais suscetíveis a ação de acaricidas, pois é possível que a extensão da cutícula, promovida pelo ingurgitamento, eleve sua permeabilidade, criando condições favoráveis para a ação do produto. Podemos observar este fato quando comparamos as CL<sub>50</sub> obtidas neste estudo com as descritas por Miranda *et al.* (2024) para larvas e ninfas não alimentadas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao fipronil. Miranda *et al.* (2024) estimaram CL<sub>50</sub> de 118.99 µg/ml e de 174.04 µg/ml para larvas e ninfas não alimentadas, respectivamente, enquanto estimamos para larvas alimentadas CL<sub>50</sub> de 21.39 µg/ml e para ninfas alimentadas CL<sub>50</sub> de 50.89 µg/ml.

A mesma dinâmica metodológica no que diz respeito a suscetibilidade evidenciada por Daemon *et al.* (2009) é descrita no trabalho de Mendes *et al.* (2011), que analisou a atividade de timol sobre as ninfas e larvas de *Amblyomma cajennense* e concluíram que as fases alimentadas necessitam de uma menor concentração de acaricida quando comparado com as não fases alimentadas, reforçando que há uma maior sensibilidade dos instares ingurgitados, dessa forma a efetividade atrelada a alimentação é semelhante em espécies distintas de carrapato.

Tendo em vista os relatos de resistência desta espécie de carrapato ao fipronil (Eiden *et al.*, 2015; Becker *et al.*, 2019), a metodologia utilizada neste estudo seria uma alternativa para avaliar a suscetibilidade de populações de *R. sanguineus* s.l. .Pois, as fases de larvas e ninfas poderiam ser recuperadas diretamente dos hospedeiros (cães), com o auxílio de pentes, quando estiverem próximas de completar o processo de alimentação e se desprenderem naturalmente para realizar a ecdise no ambiente, reduzindo assim o tempo para que se obtenha resultados e não seja necessário esperar seis semanas, período necessário para que as fêmeas ingurgitadas realizem posturas e as larvas eclodidas destas posturas estejam aptas para realizar o teste de pacote de larvas (TPL) descrito por Stone e

Haydock (1962), metodologia empregada por Eiden *et al.* (2015) e Becker *et al.* (2019) quando descreveram o relatos de populações de *R. sanguineus* s.l. resistentes ao fipronil em caninos nativos do Estados Unidos e em cães domiciliados do município de Ponta Grossa, no Rio Grande do Sul, respectivamente.

A imersão de larvas e ninfas ingurgitadas também poderia ser uma alternativa de teste mais rápida para obtenção de resultados do que o teste imersão de adultos ingurgitados (fêmeas) (TIA), descrita inicialmente por Drummond *et al.* (1973), também muito utilizada na prospecção de novos compostos para o controle de carrapatos (Olivo *et al.*, 2013) e para o diagnóstico de populações resistentes (FAO, 2004), necessita de 42 dias para que todas as etapas do ensaio sejam realizadas, contra 21 dias da avaliação proposta neste trabalho. TIA é o teste de eleição para avaliar a ação de disruptores de crescimento sobre carrapatos, como por exemplo o fluazuron (FAO, 2004; Reck *et al.*, 2014), a imersão de larvas e ninfas ingurgitadas além de apresentar resultados mais rápidos, poder gerar informações complementares ao TIA sobre a ação destes compostos, principalmente frente a carrapatos trioxenos. Como por exemplo o trabalho realizado por Silva (2024) que avaliou a ação dos seguintes disruptores de crescimento: fluazuron, novaluron, teflubenzuron e triflumuron sobre larvas e fêmeas alimentadas de *R. sanguineus* s.l. e observou que as larvas são mais sensíveis que as fêmeas ingurgitadas, talvez pelo modo de ação desse composto que age inibindo a síntese de quitina, interferindo diretamente na ecdise dos carrapatos.

## Conclusão

O estudo determinou a CL<sub>50</sub> do fipronil *in vitro* frente a fêmeas e ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l., auxiliando na monitorização da suscetibilidade das populações de carrapatos a esse composto. E a metodologia de imersão das fases imaturas, mostrou-se como uma alternativa aos ensaios com fipronil *in vitro* mais utilizados e que demandam mais tempo para obtenção de resultados. A metodologia proposta também pode ser aplicada na avaliação de outros acaricidas, auxiliando na detecção precoce de resistência ou na compreensão de como potenciais compostos com atividade acaricida podem agir sobre os carrapatos.

## Referência

BECKER, Simone *et al.* Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, Latreille (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 5, p. 1046-1050, 2019.

COELHO, Leticia *et al.* Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. **Veterinary parasitology**, v. 277, p. 108989, 2020.

DAEMON, Erik *et al.* Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 105, p. 495-497, 2009.

DANTAS-TORRES, Filipe *et al.* Biological compatibility between two temperate lineages of brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-10, 2018.

DANTAS-TORRES, Filipe. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & vectors**, v. 3, p. 1-11, 2010.

DANTAS-TORRES, Filipe *et al.* ***Rhipicephalus sanguineus* e a epidemiologia daishmaniose visceral canina no estado de Pernambuco**. 2009. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

DRUMMOND, R.O. *et al.* *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of economic entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

EIDEN, Amanda L. *et al.* Detection of permethrin resistance and fipronil tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 429-436, 2015.

FAO. Module 1. Ticks: acaricide resistance: diagnosis management and prevention. In: Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. **Animal Production and Health Division**, 2004, 25-77.

MENDES, Andressa da Silva *et al.* Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 136-139, 2011.

MIRANDA, Fernando Rocha *et al.* Do combinations of fipronil, eugenol and carvacrol have synergistic effects against *Rhipicephalus sanguineus*?. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 48, 2024.

MONTEIRO, S. G. *et al.* **Parasitologia na medicina veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: 2017. 350p.

OLIVO, Clair Jorge *et al.* Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) no controle do carrapato bovino. **Ciência Rural**, v. 43, p. 331-337, 2013.

RECK, José *et al.* First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

ROTONDANO, Tereza Emmanuelle de Farias *et al.* Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 52-58, 2015.

SANTOS, Gabriela Carmelinda Martins dos *et al.* Oral pharmacokinetic profile of fipronil and efficacy against flea and tick in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 1, p. 23-33, 2022.

SILVA, Ygor Henrique da. **Ação de Diferentes Benzoilfenilureias sobre Larvas e Fêmeas Alimentadas de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*** 2024. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2024.

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.

SUZIN, Adriane. 2018. **Aspectos ecológicos de carrapatos (Acari: Ixodidae) no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil**. Dissertação de mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. UFU. Uberlândia, MG. 114p.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ (FAPUR), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da (CAPES)