

Coleta e Manutenção de *P. capitis* no Laboratório, e Proposta de Protocolo para Ensaio com Pediculicidas.

Campinas, 24 de fevereiro de 1998

Carlos Fernando S. Andrade & Luciana U. dos Santos
(Depto. de Zoologia, IB – UNICAMP)

Discute-se questões que devem ser levadas em consideração nos ensaios e apresenta-se como proposta para um protocolo de avaliação para um produto do mercado argentino.

Embora seja adotada aqui a terminologia mais aceita de *P. capitis*, para o piolho da cabeça, merece destaque o fato de ter sido publicado recentemente artigo por pesquisadores russos, consubstanciando e propondo novamente a separação dos piolhos em espécies, *P. humanus* L., 1758 e *P. corporis* De Geer, 1778. [Chirov, P.A. & Ozerova, R.A. 1997. Taxonomy of human head and body lice. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* (2):38-40].

1. COLETAS

As coletas de *P. capitis* até o momento foram realizadas em 3 escolas da cidade de Campinas e um abrigo para menores em Osasco/SP. Basicamente os piolhos foram coletados em crianças, embora poucos exemplares tenham sido retirados também de adultos que trabalhavam diretamente com essas crianças.

Sobre um avental plástico branco, as crianças eram penteadas com pente fino semelhante aos fornecidos com os produtos pediculicidas. A medida que os insetos caíam sobre o avental, eram coletados com tubos aspiradores (2 cm diâmetro). Dentro de cada aspirador foi colocado um pedaço de cerca de 1/6 de uma rede de “nylon” amarela, comumente usada para prender penteados. A medida que os insetos eram sugados para dentro dos aspiradores, já se fixavam à rede. Dos aspiradores, as redes

com os piolhos foram transferidas para placas plásticas (Corning) de 3,5cm de diâmetro e assim transportados ao laboratório.

Nas primeiras coletas foram colocados cerca de 6 piolhos/placa, mantidas em banho-maria à temperatura de 36°C. Estes piolhos foram alimentados sobre o braço de voluntários inicialmente em intervalos de 4 horas. Tentou-se também alimentá-los em intervalos de 6 e 12 horas com igual sucesso para adultos, mas com mortalidade entre as ninfas. Para isso, foram substituídas as tampas das placas por outras com tela tipo organza, para evitar a condensação da umidade da pele dentro das placas e conseqüentemente acúmulo de suor sobre os piolhos. Para a fixação das placas foi adaptado um sistema com velcro ou fita crepe, de forma a manter a base telada das placas presas aos braços.

Esse sistema de coleta foi pensado no sentido de se reduzir ao máximo um possível estresse sobre os insetos. Não há nesse caso o contato com pinças, pincéis ou palitos. Os piolhos saem dos cabelos removidos pelos pentes e por aspiração vão para os fios de nylon. Conforme vão sendo aspirados, podem ser contados e pode-se separar ninfas de adultos. Essas unidades de transporte e manutenção serão as mesmas utilizadas nos ensaios.

As ninfas de piolhos mantidos na forma descrita acima completaram seu ciclo e os adultos puderam se reproduzir, embora em pequena quantidade. Alguns indivíduos foram mantidos assim por 45 dias. Os ovos foram fixados aos fios de nylon e de alguns não eclodiram ninfas. Salienta-se que alguns piolhos adultos apresentaram a típica cor avermelhada, resultado da ruptura do intestino médio e extravasamento de conteúdo alimentar para a hemolinfa. Esse fenômeno de alguma forma indica um estresse e tem sido também associado à resposta imune do hospedeiro e à infecção por rickettsia.

Quando solicitado a colaborar, um abrigo para menores carentes realizou uma coleta em cerca de 7 crianças. Para isso, as crianças tiveram seus cabelos umedecidos e impregnados por um shampoo piolhícida puro (a base de Deltametrina), que segundo a monitora estaria sendo utilizado para facilitar a penteação. Foram obtidos 37 piolhos. Estes indivíduos foram levados ao laboratório e colocados para se alimentar sobre

ratos. Mantiveram-se vivos e ativos ainda por mais de 5 horas, superando o efeito knock-down e morte (resistência).

Os resultados obtidos indicam que ao se obter material de escolas ou entidades de crianças, é necessário estabelecer um procedimento padronizado, que obviamente não passa pela aplicação de produto algum. Por um pequeno período de tempo, entre 2 a 5 dias, seria praticável a manutenção de piolhos no sentido de se ter um número suficiente para ensaios.

2. PROTOCOLO DE EXPERIMENTOS (para adultos e ninfas).

2.1. Introdução. O estabelecimento de um protocolo padrão para ensaios com piolhos estará sempre sujeito a uma série de contingências. No sentido de se obter resultados de alguma forma comparáveis, ao menos o governo americano e o francês adotam e recomendam metodologias relativamente fixas. Tal é o caso nos EUA dos protocolos E 938-83 e E 1517-93 da ASTM, respectivamente para adultos e ovos, e o protocolo francês SSP, L.658-11, para produtos pediculicidas.

Com relação ao protocolo americano, os testes com adultos de *P. humanus* não estabelecem as condições dos insetos quanto à alimentação e o número de repetições por tratamento, embora seja recomendado 25 adultos (machos e fêmeas misturados) por placa de petri. Considerando-se tratar de uma linhagem de laboratório, muito isogênica quando comparada com insetos obtidos no campo, supõe-se que ao menos uma repetição seria conveniente. Ao utilizar no entanto o mesmo tipo de piolho (*P. h. humanus* alimentado em coelhos), Muncuoglu realiza três réplicas com 50 insetos cada (10 machos, 10 fêmeas e 30 ninfas), alimentados 24 h antes.

Considerando-se a variedade de cremes, loções e shampoos candidatos ao mercado, não deveria haver nesses protocolos um padrão de concentrações a serem empregadas e nem tampouco do tempo de exposição, embora o protocolo americano indique tempo de exposição de 1, 4 ou 10 min.

Diversos autores têm empregado soluções entre 2 e 8% quando avaliam shampoos, no entanto algumas formulações gel, líquidas ou cremes devem ser avaliadas pouco diluídas ou praticamente puras.

Uma outra crítica que pode ser feita ao protocolo oficial americano para ensaios com adultos é a de se considerar a mortalidade em dois momentos: 1 hora após, e 24 horas após. Essas avaliações obviamente deveriam estar relacionadas aos diferentes modos de ação das moléculas ou produtos a serem testadas. Assim, ao se avaliar produtos como piretróides ou organofosforados, após 4 horas todo seu efeito letal já se realizou. Caso sejam avaliadas formulações desses princípios com um pressuposto de ação residual, ou outras moléculas como as dos reguladores de crescimento, observações acima de 24 horas da aplicação poderiam ser necessárias.

Uma recente crítica do Dr. I. Burgess quanto aos protocolos oficiais indica que também não levam em consideração variações no solvente usado como veículo, a ação surfactante e suas características quanto à evaporação. Sua conclusão é de que a única maneira eficiente de se avaliar *in vitro* produtos formulados é a de se imitar a maneira pela qual o consumidor deverá fazer uso do produto, e portanto, as recomendações do fabricante aos consumidores devem ser sempre tomadas como base dos protocolos.

Nossa proposta é que as avaliações sejam comparativas entre concentrações ou formulações, de preferência para uma mesma coorte de piolhos obtidos sob condições de campo. Alternativamente, piolhos coletados em diferentes locais, e em quantidades semelhantes, poderiam compor uma mistura de populações. Em qualquer caso, torna-se imperativo um inquérito sobre o histórico de utilização de produtos na comunidade de origem dos piolhos.

2.2. Exemplo de Protocolo.

-**Produto:** PIGMAL[®] Champu+Enjuague Antipiojos Natural.

-**Origem:** Argentina.

-**Fórmula Farmacológica:** Glicerina 3,0g; Carboximetilcelulose 1,0g; Cocoamidobetaína 40,0g; Silicone 3,0g; Cloreto de acetilamoníaco 3,0g; Poliestireno 1,0g; Ácido Pirolenoso purificado 5,0g; Essência 0,7g; Amarelo ocaso 0,00002g; Azul brilhante 0,00001g; Imidureia 0,37g; Água purificada c.s.p. 100 ml.

-**Recomendação de uso expressa no rótulo:** Lavar a cabeça com o shampoo deixando atuar por alguns minutos. Enxaguar com água morna e voltar a colocar uma porção do shampoo. Com o shampoo aplicado pentear o cabelo e logo a seguir passar um pente fino da base à extremidade do fio e vice-versa. Enxaguar bem.

-**Pressuposto:** ação tóxica aguda.

-Material e equipamentos:

Unidades de ensaio: 6 placas de petri de plástico (Corning) com 3,5 cm de diâmetro, contendo dentro rede de nylon amarela (1/6 das redes utilizadas para fixar penteados). As placas são mantidas fechadas por presilha plástica e permitem a livre passagem de líquido.

Beckers de 500 e 100 ml, respectivamente para o preparo da solução estoque e para o tratamento. Beckers de 1 litro para enxague.

Pinças, peneiras de malha fina e água corrente.

Placas de petri de 13 cm diâmetro com papel de filtro para absorver o excesso de líquido.

Placas de petri pequenas aonde serão mantidos os insetos pós-tratamento.

-Procedimento.

Separar 40 piolhos (machos, fêmeas e ninfas) em cada unidade de ensaio (placas pequenas), em um total de 6 (3 tratamentos e 3 testemunhas).

Preparar 1 litro de solução estoque de shampoo a 6,6% (1:15) em um becker, manter a 32°C. Distribuir em três beckers de 100 ml cada. Preparar três beckers com 100 ml de água de torneira cada, a 32°C para a testemunha.

1º Tratamento: submergir as placas de petri com os piolhos nos 6 beckers, por 3 minutos, com agitação manual suave e constante.

1º Enxágüe: retirar as placas tratamento e testemunha dos beckers de 100 ml e colocar em dois beckers com 1 litro de água de torneira, por um minuto, com uma troca de água e agitação manual constante.

2º Tratamento: submergir novamente as placas em nova solução de shampoo (tratamento) e água (testemunha) por 5 minutos, com agitação manual leve e constante.

2º Enxague: retirar as placas e submergi-las por 1 min em beckers de 1 litro com água limpa, com duas trocas.

Abrir as placas, retirar com pinça as redes de fixação dos piolhos, manter sob água corrente leve por um minuto. Recuperar piolhos que ficarem nas placas e piolhos que se desprenderam das redes de fixação. Colocar a rede e os piolhos recuperados em

placa de petri (13 cm), forradas com papel de filtro, aonde será feita a seleção. Observar sob lupa estereoscópica, anotar o número de insetos Ativos e Inativos. Colocar os inativos em placas separadas dos ativos. Serão considerados piolhos Inativos os piolhos que não reagem de qualquer forma à estímulos de toque. Esses piolhos serão observados em avaliações seguintes quando da alimentação dos Ativos e testemunha. Serão considerados piolhos Ativos os que de alguma forma reagem à estímulo de toque.

Observar Ativos e Inativos a partir de uma hora da aplicação, em intervalos de 4 em quatro horas (quando da alimentação), até a estabilização da mortalidade, mortalidade total, ou até que haja elevada mortalidade entre as placas testemunha.

A mortalidade será transformada em porcentagem e corrigida pela fórmula de Abbot (1925), caso seja na testemunha acima de cerca de 5% e cerca de 12%.

As placas de plástico serão descartadas ao final de cada ensaio. Os piolhos sobreviventes aos tratamentos serão também descartados e os utilizados como testemunha servirão para tentativas de alimentação em hospedeiros alternativos ou *in vitro*.

Pequenas alterações deverão ser feitas em função de eventos durante o ensaio. Assim, por exemplo, pretende-se inicialmente o registro de mortalidade pela falta total de atividade (letalidade por intoxicação aguda), mas se forem notados sinais nítidos de intoxicação crônica, serão anotados paralelamente.

