

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

THAYLON FERNANDO BONATTI FIGUEIREDO

**TÉCNICA DE OZONIZAÇÃO: EFEITOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS E
ANÁLISE LIPÍDICA DO CORPO GORDUROSO DE *Rhipicephalus B. microplus***

TESE DE DOUTORADO

DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, 06/2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

THAYLON FERNANDO BONATTI FIGUEIREDO

TÉCNICA DE OZONIZAÇÃO: EFEITOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS E ANÁLISE LIPÍDICA DO CORPO GORDUROSO DE *Rhipicephalus B. microplus*

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador(a): Prof.(a) Dra. Lívia Helena Moreira da Silva Mélo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos José de Lima

São José dos Campos, 06/2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

THAYLON FERNANDO BONATTI FIGUEIREDO

TÉCNICA DE OZONIZAÇÃO: EFEITOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS E ANÁLISE LIPÍDICA DO CORPO GORDUROSO DE *Rhipicephalus B. microplus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Livia Helena Moreira da Silva Mélo
Orientadora de Doutorado em Engenharia Biomédica
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Fabrício Nascimento Gaudêncio (externo)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. André Luiz da Silva Mendes (externo)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carlos José de Lima (interno)
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Adriana Barrinha Fernandes Moretti (interno)
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Henrique Cunha Carvalho (suplente)
Centro de Inovação, Tecnologia e Educação

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (suplente)
Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, 06/2022

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

THAYLON FERNANDO BONATTI FIGUEIREDO

Graduado em Biomedicina (2013) pelo Centro Universitário Unirondon. Mestre em Bioengenharia (2015) pela Universidade Brasil. Especialista em Farmacologia e interações medicamentosas (2016) pelo Centro Universitário Uninter. Atualmente acadêmico do curso de Medicina do Centro Universitário Uninorte.

Ficha Catalográfica

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F498t	<p>Figueiredo, Thaylon Fernando Bonatti Técnica de ozonização: efeitos sobre os parâmetros biológicos e análise lipídica do corpo gorduroso de <i>Rhipicephalus B. microplus</i> / Thaylon Fernando Bonatti Figueiredo – 2022. 54f.: 30 cm.</p> <p>Orientador: Livia Helena Moreira da Silva Melo. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2023. Bibliografia: f. 46-54.</p> <p>1. Engenharia Biomédica. 2. Ozônio. 3. Controle Biológico. 4. Carrapato. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDDD 610.28</p>
-------	---

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por todas as conquistas e por mais um sonho realizado.

A minha orientadora Prof. Dra. Livia Helena Moreira da Silva Mélo, por todos ensinamentos e disponibilidade. Serei eternamente grato pela paciência e persistência durante todos esses anos. Além da gratidão por toda dedicação e confiança depositadas a mim. Além de um orientando, você ganhou um grande amigo.

A minha família, Paulo Edir Milhomem Figueiredo, Vania Aparecida Bonatti Figueiredo e Marlon Bruno Bonatti Figueiredo por todo incentivo, ensinamentos e encorajamento. Tenho muito orgulho de tê-los como pais e irmão. Obrigado por tudo, amo muito vocês.

Ao amigo Joelton Rezende Gomes pelo apoio e incentivo durante toda a caminhada.

A todos os companheiros de caminhada do programa de pós-graduação pela amizade adquirida, em especial a Silvia Móbille Awoyama que muito além de bons momentos e conselhos adotou uma postura de bússola em meio ao meu caos.

Aos funcionários da Instituição de Ensino Superior de Cacoal – Fanorte, em especial ao Diretor Prof. Ronaldo Pereira Silva, Prof. Helem Mitissi Nascimento Gutierrez e demais docentes e alunos do curso de Biomedicina, pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos amigos do curso de Medicina em especial, Luana Brasileiro, Luana Figueredo e Vanessa Barbosa pelos conselhos e incentivo durante o retorno ao processo de escrita.

Aos pesquisadores Dr. André Luiz da Silva Mendes e Dr. Fabrício Nascimento Gaudêncio pela imensa contribuição e ensinamentos teóricos e práticos durante e após os experimentos.

Aos professores Dr. Carlos José de Lima, Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti e Dr. Renato Amaro Zângaro pela amizade, compreensão e profissionalismo.

Muito obrigado a todos vocês!

"A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência, mas pela capacidade de começar de novo."

F. Scott Fitzgerald

RESUMO

O surgimento de populações multirresistentes de carrapatos a diferentes princípios ativos comercializados aliado aos gastos e prejuízos ao produtor e bovinos suscita para a necessidade da elaboração de novos métodos de controle deste artrópode. Partindo dessa premissa, o ozônio apresenta-se como uma ferramenta promissora e com resultados acaricidas já comprovados. Dessa maneira, o presente trabalho objetivou avaliar os parâmetros biológicos e o metabolismo de lipídios, Colesterol Esterificado (CHOE), Triacilglicerol (TG), Colesterol livre (CHO), Ácidos Graxos livres (AG) e Monoacilglicerol (MG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de carrapatos da espécie *R. microplus* após a exposição aos gases oxigênio e ozônio. O protocolo experimental adotou a divisão de grupos de acordo com o fluído e tempo de exposição. Para a avaliação dos parâmetros biológicos as fêmeas ingurgitadas (n=40) foram acondicionadas em placa de petri para o acompanhamento do ciclo biológico. Os corpos gordurosos (n=210) foram coletados, adicionados a placa de sílica da cromatografia em camada delgada, escaneada e submetida à análise densitométrica. Os resultados demonstraram alterações significativas nos parâmetros biológicos, com ênfase para o alto percentual de controle obtido após a exposição ao gás ozônio. As análises estatísticas não demonstraram variação significativa nos lipídios AG, CHO, CHOE e MG. Entretanto, detectou-se um acúmulo de TG no corpo gorduroso, o qual pode estar relacionado com o índice de produção de ovos obtidos nos grupos tratados com ozônio, isso porque, esse valor em porcentagem se relaciona com a conversão de energia para o processo de vitelogênese. Pela primeira vez, foi realizado um estudo abrangendo os efeitos biológicos e bioquímicos do ozônio visando um controle biológico. Além da comprovação acaricida e do grande potencial como controle biológico, novos estudos envolvendo o ozônio e suas vias metabólicas em carrapatos fazem-se necessários para o desenvolvimento de novas tecnologias.

Palavras-chave: Engenharia Biomédica, Ozônio, Controle Biológico, Carrapatos.

OZONIZATION TECHNIQUE: EFFECTS ON BIOLOGICAL PARAMETERS AND LIPID ANALYSIS OF THE FAT BODY OF *Rhipicephalus B. microplus*

ABSTRACT

The emergence of multi-resistant populations to different commercialized active ingredients combined with costs and losses to the producer and cattle raises the need for the development of new methods to control this arthropod. Based on this premise, ozone presents itself as a promising tool with already proven acaricidal results. Thus, the present study aimed to evaluate the biological parameters and metabolism of Esterified Cholesterol (CHOE), Triacylglycerol (TG), Free Cholesterol (CHO), Free Fatty Acids (AG) and Monoacylglycerol (MG) in the fat body of engorged females of ticks of the species *R. microplus* after exposure to oxygen and ozone gas. The experimental protocol adopted the division of groups according to fluid and exposure time. For the evaluation of the biological parameters the engorged females (n=40) were placed in a petri dish. The fat bodies (n=210) were collected, added to thin layer chromatography silica plate, scanned and submitted to densitometric analysis. The results showed significant changes in biological parameters, with emphasis on the high percentage of control obtained after exposure to ozone. Statistical analyzes showed no significant variation in AG, CHO, CHOE and MG lipids. However, an accumulation of TG in the fat body was detected, which may be related to the egg production index obtained in the ozone-treated groups, because this percentage value is related to the energy conversion for the vitellogenesis process. For the first time, a study covering the biological and biochemical effects of ozone was conducted. In addition to the acarid evidence and the great potential as a biological control, new studies involving ozone and its metabolic pathways in ticks are necessary for the development of new technologies.

Keywords: Biomedical Engineering, Ozone, Biological Control, Ticks.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>R. microplus</i> – Ciclo Biológico	15
2.2 Aspectos morfológicos dos carrapatos duros	16
2.3 Corpo gorduroso	17
2.4 Metabolização de carboidratos em <i>R. microplus</i>	18
2.5 Metabolização dos lipídios em <i>R. microplus</i>	19
2.6 Resistência acaricida dos carrapatos <i>R. microplus</i>	22
2.7 Gás ozônio	25
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i>	15
Figura 2. Desenho esquemático dos carrapatos ixodídeos	17
Figura 3: Representação esquemática morfológica interna de fêmea e macho do carrapato ixodídeo após a remoção do intestino.	17
Figura 4. Metabolismo de lipídeos obtidos da dieta em insetos hematófagos	21
Figura 5. Desenvolvimento embrionário do carrapato <i>R. microplus</i>	22
Figura 6. Bovinos infestados com <i>R. microplus</i>	28
Figura 7: Aparato desenvolvido para a ozonização dos carrapatos. Cilindro de oxigênio medicinal acoplado ao gerador de ozônio e a caixa de inox (Fonte: FIGUEIREDO, 2015)	30
Figura 8. Teleóginas de <i>R. microplus</i> acondicionadas no interior da caixa de inox antes do início do tratamento na aplicação do gás.	31
Figura 9. Teleóginas de <i>R. microplus</i> acondicionadas nas placas de petri para o acompanhamento dos parâmetros biológicos.	31
Figura 10. Imagem do corpo gorduroso retirado de uma fêmea teleógina de <i>R. microplus</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das médias e desvio padrão dos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* nos grupos controle e tratados durante diferentes períodos de exposição ao gás oxigênio e ozônio..... 37

Tabela 2. Valores de média \pm desvio padrão do percentual de lipídeos neutros Colesterol Esterificado (CHOE), Triacilglicerol (TG), Colesterol livre (CHO), Ácidos Graxos livres (AG) e Monoacilglicerol (MG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas ao tratamento com Oxigênio e Ozônio em diferentes tempos 38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Percentual de colesterol esterificado (CHOE) (à esquerda) e percentual de colesterol livre (CHO) (à direita) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente 39
- Gráfico 2. Percentual de triacilglicerol (TG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente 39
- Gráfico 3. Gráfico 2: Percentual de ácidos graxos (AG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente 39
- Gráfico 4. Percentual de monoacilglicerol (MG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente 40

1. INTRODUÇÃO

O carrapato dos bovinos, conhecido cientificamente como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (*R. microplus*), pode ser considerado um dos ectoparasitos de maior importância econômica na pecuária. Sendo predominante em regiões de clima tropical e subtropical, este parasita se destaca pelos danos e prejuízos causados aos rebanhos bovinos e ao produtor (JONGEJAN & UILENBERG, 2004).

Os carrapatos provocam grandes perdas, como por exemplo, retardo no crescimento e emagrecimento, diminuição na produção de leite e carne, espoliação sanguínea, prurido, anemia, redução da natalidade, transmissão de doenças causadas por protozoários, como *Babesia bovis*, *Babesia bigemia*, *Anaplasma marginale* que causam a “tristeza parasitaria bovina”, além do índice de mortalidade que atinge os rebanhos (SILVA et al., 2021).

A utilização de produtos químicos é caracterizada como a principal prática de controle dos carrapatos. Os objetivos envolvendo o uso do acaricida está relacionada com a diminuição da infestação no bovino e na pastagem, além de favorecer a estabilidade de hemoparasitoses. O aparecimento da resistência aos pesticidas pode ser caracterizado como uma resposta evolutiva do agente contra sua eliminação. O tratamento baseado na aplicação de pesticidas busca extinguir os indivíduos suscetíveis da população, e contribui para a manutenção dos carrapatos que se tornaram resistentes. Assim, quanto maior o número das aplicações de drogas, maior a seleção de carrapatos resistentes, contribuindo para a diminuição da eficácia dos pesticidas. Isto posto, a superdose, o excesso, e a administração incorreta dos carrapaticidas, provocam a resistência às drogas disponíveis atualmente no mercado (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; TORRES-SANTOS et al., 2021).

Além dos prejuízos aos pecuaristas causado pelo carrapato-do-boi, ainda existe o risco de contaminação do ambiente em decorrência do uso inadequado dos produtos químicos aplicados pelos produtores no combate deste ectoparasita (ANDREOTTI, GARCIA, KOLLER, 2019).

Com a utilização de vacinas e rotatividade de acaricidas, o manejo integrado tem reduzido a seleção de carrapatos resistentes aos diferentes princípios ativos visando maior eficiência na utilização de moléculas presentes no metabolismo do parasita em diferentes fases do ciclo biológico (JONGEJAN & UILENBERG, 2004).

A utilização do ozônio apresenta um futuro promissor como acaricida. Amplamente aplicado como agente antimicrobiano, estudos tem comprovado que o seu uso apresenta efeitos sobre as células acarinas (FIGUEIREDO et al., 2018). Devido ao seu alto teor oxidante, o ozônio pode ser produzido no local por meio de uma descarga elétrica que produzirá a dissociação da molécula de oxigênio, que recombinará com outras moléculas de oxigênio (BOCCI, 2010).

O ozônio apresenta vantagens em sua utilização se comparado ao manejo convencional com produtos sintéticos, pois quando aplicado corretamente é inócuo ao homem, não fornece resíduos ao ambiente e aos animais, além de não propiciar o desenvolvimento da resistência, visto que rapidamente a molécula de O_3 se decompõe retomando a forma inicial de O_2 (BOCCI, 2010).

Acredita-se, portanto, que o ozônio tenha a capacidade de reagir com o metabolismo do carrapato em suas diferentes formas de aplicação, permitindo alterações fisiológicas e bioquímicas, podendo assim interromper e/ou comprometer o seu ciclo biológico (MOREIRA et al., 2018, FIGUEIREDO, et al., 2018).

Uma via de avaliação de novos métodos de controle e já empregado em estudos, refere-se ao estudo do corpo gorduroso de carrapatos. O corpo gorduroso apresenta a função de reserva energética, durante longos períodos de não-alimentação possuindo a capacidade de estocar nutrientes. Alterações metabólicas decorrentes de agentes químicos e tratamentos acaricidas podem influenciar diretamente no perfil lipídico bioquímico dos carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2013).

O presente estudo teve o objetivo de avaliar os perfis metabólicos de lipídios através da análise do corpo gorduroso, de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* quando expostos aos fluídos: oxigênio e ozônio associado aos parâmetros biológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Rhipicephalus microplus* – Ciclo Biológico

Após estudos de filogenia, foi proposto uma reclassificação para o gênero *Rhipicephalus*, e o termo *Boophilus* foi mantido como subgênero, passando então a ser denominado como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURRELL; BARKER, 2003).

R. microplus é um ectoparasita hematófago, também conhecido como carrapato do boi. O seu ciclo biológico é caracterizado como monóxeno, vivendo em um único hospedeiro durante a fase parasitária do seu ciclo biológico. O ciclo está dividido em duas fases: parasitária, e não parasitária (fase vida livre) como representado na Figura 1.

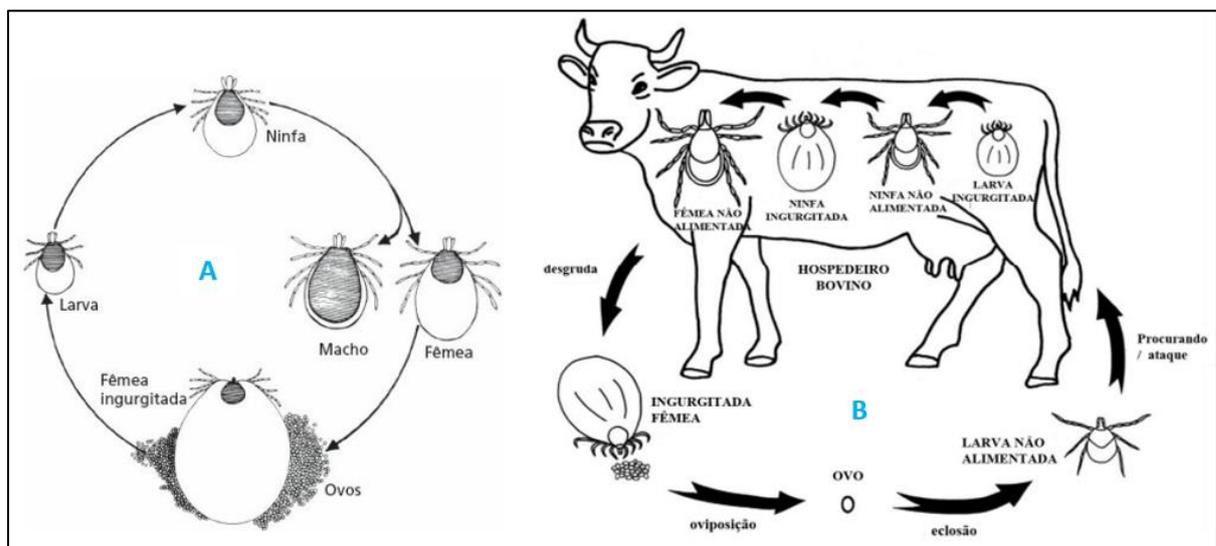


Figura 1. Representação esquemática do ciclo biológico do *R. microplus*. A= todas as fases do ciclo biológico de um carrapato ixodídeo; B= desenvolvimento dividido em fase não parasitária e fase parasitária no hospedeiro bovino (Fonte: Adaptado de SONENSHINE & ROE, 2013; TAYLOR 2017).

A fase não parasitária inicia-se com a queda da fêmea ingurgitada, também chamada de teleógina, que ocorre geralmente no início da manhã e ou final da tarde correspondendo aos horários mais frescos do dia. As teleóginas, também chamadas de fêmeas ingurgitadas, procuram um local úmido e sem a incidência de raios solares para realizarem a postura. O início da postura pode acontecer a partir do 3º a 4º dia após a queda, onde passa por mudanças fisiológicas para a produção dos ovos. Ao término da postura, a fêmea morre (quenógena), completando o seu ciclo biológico

(GONZÁLES, 1974; FURLONG & PRATA 2005; CAMPOS, et. al., 2008; SCHRODER & REILLY, 2013).

Após o período de incubação dos ovos, ocorrerá a eclosão das larvas. Essas apresentarão três pares de patas (hexápodes) e coloração quase translúcida. Após exposição ao ar passa adquirir uma tonalidade avermelhada. Passado o período de quiescência, as larvas buscam alcançar as pontas das folhas do capim, à espera do hospedeiro. Elas podem permanecer na pastagem por mais de oitenta dias. O término da fase não parasitária acontece quando as larvas se fixam em um hospedeiro, ou quando morrem (GONZÁLES, 1974; GAUSS & FURLON, 2002).

Na fase parasitária o *R. microplus* apresenta três estágios morfológicos: larva, ninfa e adultos. Inicia-se com a fixação da larva no hospedeiro, a qual após o repasto sanguíneo com intervalo de 4 a 7 dias ocorrerá a primeira ecdise, mudando para o estágio de ninfa já possuindo quatro pares de patas e espiráculo respiratório. Após o período de 9 a 16 dias a mesma sofrerá uma nova ecdise transformando-se em adulto com o desenvolvimento dos aparelhos reprodutivos e abertura do forame genital. Por volta do 18º ao 35º dia após a fixação, e logo após a cópula, as fêmeas desprenderão do hospedeiro indo ao solo para a fase não parasitária, finalizando o seu ciclo biológico. Diferentemente das teleóginas, os machos permanecerão no hospedeiro em busca de novas fêmeas para cópula. Mesmo com o intervalo de tempo (entre 18 e 35 dias) descritos na literatura, a fase parasitária do *R. microplus* dura em média 21 dias (GONZÁLES, 1974).

Durante a fase parasitária, cada teleógina ingere em torno de 3 ml de sangue e transforma 60% de sua massa corporal em ovos. Após atingir seu tamanho máximo no processo de ingurgitamento, uma fêmea de *R. microplus* aumenta em até 100 vezes o seu próprio peso inicial (SONENSHINE, 1991). Um grupo que contenha entre oito a 10 teleóginas chega a produzir em torno de 1,8 gramas de ovos. Em média, um grama de ovos produz em torno de 20.000 larvas (GONZÁLES, 1974).

2.2. Aspectos morfológicos dos carrapatos duros

Possuindo o corpo achatado, os carrapatos pertencentes a família Ixodidae podem variar de 2 a 20 mm. Seu corpo, diferente dos insetos, é dividido em cefalotórax (capitulum ou gnatosoma) e abdômen (idiossoma) com placas específicas de acordo com a localização conforme apresentadas na Figura 2.

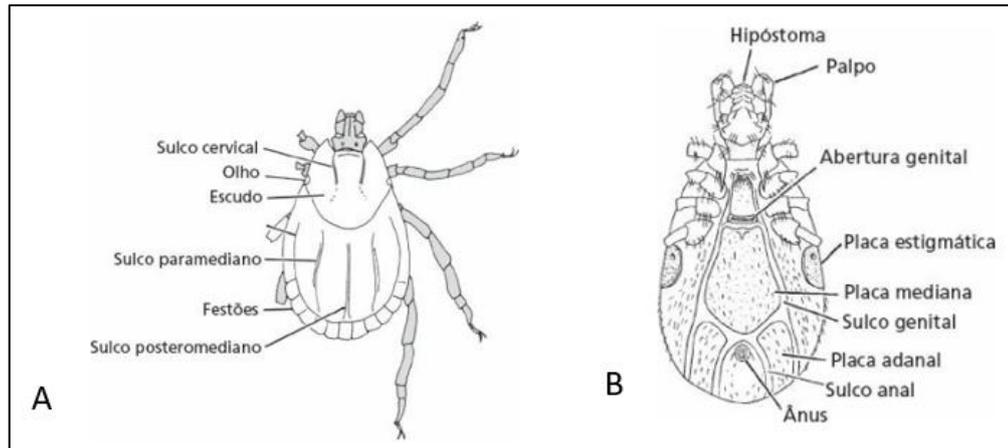


Figura 2. Desenho esquemático dos carrapatos ixodídeos. A=Vista dorsal de uma fêmea ixodídeo; B=Vista ventral de um carrapato macho ixodídeo com as placas no abdômen (Fonte: TAYLOR, 2017).

Estudos caracterizando os aspectos morfológicos internos de carrapatos ixodídeos em fêmeas e machos estão demonstrados na figura 3 (A e B) (SONENSHINE; ROE, 2013).

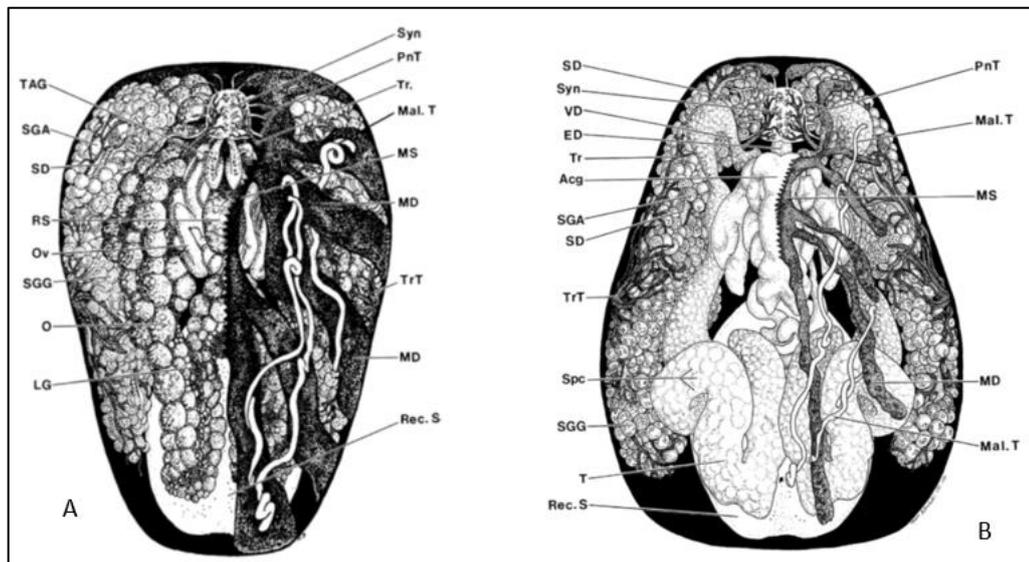


Figura 3. Representação esquemática morfológica interna de fêmea e macho do carrapato ixodídeo após a remoção do intestino. A= Representação dos órgãos internos em fêmea de carrapato; B= representação dos órgãos internos em macho de carrapato. Legenda: LG (sulco longitudinal do ovário); MD (diverticulum); MS (estômago -ventriculus); Mal. T (túbulo de malpíngie); O (ovário); Ov (oviducto); PnT (nervo periférico); Rec.S (saco retal); SGA (glândula salivar- zona agranular acino tipo I); SGG (glândula salivar – zona granular acino tipos II e III); SD (ducto salivar); Syn (singanglio); TAG (glândula acessória tubular); TrT (traqueíolas); Tr (traqueia); AcG (glândula acessória); ED (ducto ejaculador); Spc (espermátocitos); T (testículos); V.D. (vaso deferente) (Fonte: SONENSHINE; ROE, 2013).

2.3 Corpo Gorduroso

Nos artrópodes o corpo gorduroso é o órgão responsável pelo armazenamento de reservas nutricionais, pela metabolização de hormônios além de detoxificar

resíduos e compostos nocivos (SONENSHINE, 1991). O corpo gorduroso apresenta uma significância equivalente ao fígado nos vertebrados, já que ambos armazenam os nutrientes em excesso, realizam a desintoxicação e agem como fontes biossintéticas (KILBY, 1963; PRICE, 1973)

O corpo gorduroso dos artrópodes apresenta como principal função a reserva energética, principalmente lipídeos e glicídios, estando em maior abundância os triacilglicerídeos, em carrapatos e insetos. Ele é um órgão importante para as vias metabólica e reprodutiva (ANGELO et al., 2013; ARRESE & SOULAGES, 2010), estocagem de aminoácidos, síntese de proteínas presentes na hemolinfa, produção de peptídeos antimicrobianos, vitelogenina e detoxificação de metabólitos de nitrogênio (COHEN, 2009; LIPOVSEK et al., 2011).

O único tipo celular presente neste órgão são os trofócitos, que estão presentes em formas arredondadas e cúbicas. Nos cordões celulares são possíveis encontrar a forma cúbica, e acima desses cordões de forma isolada estariam a forma arredondada. Apesar da variação na sua configuração ainda não existe variação funcional entre essas células na literatura (DENARDI et al., 2008; SONESHINE, 2013; ROE et al., 2013).

Em insetos, a reserva de nutrientes presentes no corpo gorduroso auxilia na modulação de desenvolvimento dos ovos, voos e processos de metamorfose (ROE et al., 2013). O corpo gorduroso é mais evoluído se comparado ao dos carrapatos. As funções metabólicas são reduzidas e não totalmente definidas, quando comparado a estocagem lipídica, tornando-se mais ativo após o período de alimentação. Nos insetos, as porções parietal e perivisceral não possuem diferenças celulares como descritas em carrapatos (DENARDI et al., 2008; SONESHINE, 2013; ROE et al., 2013).

Nos carrapatos o corpo gorduroso se encontra revestindo internamente o idiossoma, interligado as traqueíolas (estrutura do sistema respiratório), e próximo ao sistema digestivo e reprodutor. O corpo gorduroso pode ser classificado em parietal (disperso junto ao tegumento), ou perivisceral (ao redor dos órgãos) (DENARDI et al., 2008; ROE et al., 2013).

2.4 Metabolismo energético em carrapatos

Para executar suas atividades, o *R. microplus* ingerem o sangue de seu hospedeiro e utiliza-o como fonte de nutrientes e substratos energéticos, como por

exemplo, carboidratos, lipídios e proteínas (NELSON; COX, 2008; GUIZZO et al., 2012). Na hemolinfa dos carrapatos o carboidrato mais encontrado é a glicose (DEL PINO et al., 1989; SONESHINE, 1991). O sistema circulatório aberto dos carrapatos distribui os nutrientes através da hemolinfa, garantindo assim os nutrientes celulares e o desempenho de suas funções (SONESHINE, 1991).

Diferentes vias e substratos metabólicos são direcionados durante o desenvolvimento do carrapato com o objetivo de atender à demandas energéticas desde a embriogênese até a fase adulta (CAMPOS et al., 2006; SEIXAS et al., 2012). Por exemplo, na fase da embriogênese é possível verificar um aumento do conteúdo de glicose e glicogênio presente nos ovos de *R. microplus*, em decorrência da elevação na atividade enzimática relacionada a gliconeogênese e a via glicolítica (MORAES, 2007).

Para a formação do embrião, a reserva materna de glicogênio presente nos oócitos é metabolizada pela glicólise, posteriormente, a glicose será obtida por meio da gliconeogênese pelo próprio embrião. Durante a segmentação até a eclosão das larvas, o embrião obtém o aporte energético para o seu metabolismo através da gliconeogênese. Logo, as vias glicolítica e gliconeogênica fornecem glicose para o desenvolvimento do embrião. Durante o desenvolvimento embrionário, sugere-se que a via de sinalização por insulina regule os níveis de glicose no *R. microplus*, assim como acontece em outros organismos, impedindo a gliconeogênese e glicogenólise pela inibição enzimática e expressão gênica (GUIZZO et al., 2012).

Sendo assim, para atender as demandas energéticas desde a embriogênese até a fase adulta, substratos e vias metabólicas diferentes são mobilizadas. Logo, a interferência na disponibilização de glicose por exemplo, poderá ser letal ao desenvolvimento do *R. microplus* (GUIZZO et al., 2012).

2.5 Metabolização dos lipídios em *R. microplus*

Os lipídeos podem ser caracterizados por apresentarem alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Dispostos como biomoléculas são encontrados em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura. O metabolismo dos lipídeos nos invertebrados é menos complexo quando comparados aos vertebrados. Entretanto, sabe-se que ambos estão presentes em estruturas celulares, atuam no armazenamento de energia, produção

de ovos, metamorfose e são precursores hormonais (CANAVOSO et al., 2001; VANCE; VANCE, 2002).

Nos carrapatos, o metabolismo de lipídeos ainda é pouco conhecido, bem como seus outros aspectos fisiológicos. Os estudos de metabolismo lipídico em carrapatos são baseados no conhecimento em insetos (XAVIER, 2019).

Através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD, do Inglês *Thin Liquid Chromatograph*, TLC) vários autores caracterizaram as diversas classes de lipídeos neutros em ovos, hemolinfa e corpo gorduroso em fêmeas de diversas espécies de carrapatos (IWUALA et al., 1979; ANGELO et al., 2010; ANGELO et al., 2013). Caracterizado pelas propriedades hidrofóbicas e pela ampla diversidade molecular, os lipídios atuam como importantes substratos energéticos, e nos carrapatos são os mesmos lipídios presentes em outros animais, como por exemplo, fosfolipídios (FL), esteróis, acilgliceróis, colesterol livre (CHO), colesterol esterificado (CHOE) e ácidos graxos livres (AG) (SONENSHINE, 1991; MARECHAL et al., 2011; NELSON; COX, 2011). Atuando no sistema imune (CABRAL, 2005) e na regulação da temperatura corporal (DAVIS, 1974), os lipídios estão presentes em diversos processos biológicos já descritos em insetos (DAVIS, 1974; CABRAL, 2005).

O metabolismo dos lipídeos já é muito conhecido nos mamíferos, entretanto, nos invertebrados as informações ainda são escassas. Sabe-se que nos insetos, complexos lipídicos provenientes da alimentação são hidrolisados durante a digestão e transformados em lipídeos mais simples que serão absorvidos no epitélio intestinal. Nessas células epiteliais ocorre ainda a produção de substratos lipídicos mais complexos, dentre eles, FL, DAG e TG. Logo, através da hemolinfa os lipídeos serão transferidos para todo organismo (TURUNEN; CRAILSHEIM 1996; CANAVOSO et al., 2001).

Kluck et al., (2018), observaram que, ao utilizar o ácido palmítico radiomarcado, tornou-se possível detectar a presença do composto em diferentes órgãos, dentre eles, corpo gorduroso, intestino, ovários e órgão de Gené. Além disso, constatou-se a conversão do ácido palmítico em 352 lipídeos mais complexos.

Nos insetos hematófagos a digestão dos TG presentes no sangue acontece no lúmen intestinal. Nos enterócitos os AGs são absorvidos e empregados na síntese de TAG, DAG e FL. Posteriormente os lipídeos são exportados para lipoforinas (Lp) e transportados para o corpo gorduroso e ovário. A Lp é a principal lipoproteína transportadora de lipídeos nos insetos. No corpo gorduroso os lipídeos são

armazenados como TG e nos ovários vitelogênicos, dependendo da espécie do inseto, são distribuídos com ou sem a internalização das Lp. O corpo gorduroso pode transferir os lipídeos armazenados para as Lp circulantes, que transportarão para os ovários ou intestino, a depender da condição fisiológica do organismo (Figura 4) (CHINO et al., 1981; GONDIM, et al., 2018; XAVIER, 2019).

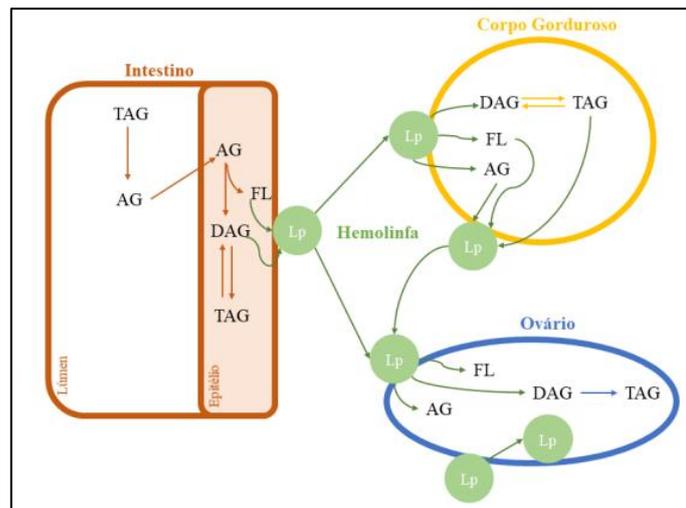


Figura 4. Metabolismo de lipídeos obtidos da dieta em insetos hematófagos. TAG: Triacilgliceróis; AG: Ácidos graxos; FL: Fosfolipídeos; DG: Diacilgliceróis; Lp: Lipoforinas (XAVIER, 2019).

Durante a fase de alimentação o conteúdo lipídico presente nas fêmeas aumenta de 22 para 63 microgramas (SONENSHINE, 1991). De acordo com Cherry (1976), existe uma relação diretamente proporcional entre o peso da fêmea ingurgitada e o teor de colesterol presente em seus ovos, ou seja, quanto maior o peso da teleógina no momento da oviposição, maior será a quantidade de colesterol em seus ovos.

Em condições controladas de temperatura (28° C) e umidade (80%) a eclosão dos ovos ocorrerá 21 dias após a postura. No início dessa embriogênese acontece a mobilização de componentes energéticos e o embrião unicelular torna-se polinuclear, passando a ser caracterizado como blastoderma sincicial. Até o quarto dia a principal fonte energética é o glicogênio materno. Entre o quarto e o sexto dia ocorre proliferação celular e a transformação para blastoderma celular. Posteriormente, pela ativação da expressão zigótica dá-se o aumento do conteúdo de RNA total. A partir do sétimo dia o embrião encontra-se segmentado e com intensa gliconeogênese (Figura 5) (CAMPOS et al., 2006; GUIZZO et al., 2012).

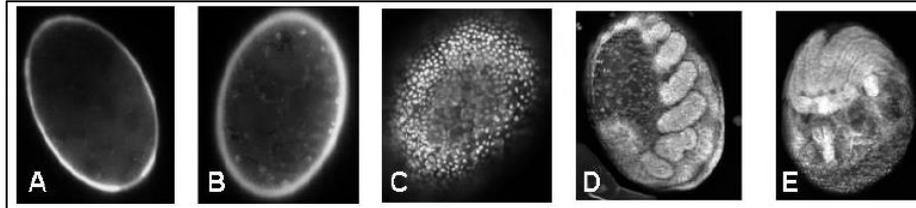


Figura 5. Desenvolvimento embrionário do carrapato *R. microplus*. A- 1 dia, B- 3 dias (blastoderma sincicial), C- 5 dias (blastoderma celular), D- 7 dias (embrião segmentado), E- 12 dias (CAMPOS et al., 2006).

As taxas de ésteres de colesterol, DAG) e TAG são as que mais decaem com a evolução da oviposição na fêmea (IWUALA et al., 1979). Sob a forma de TAG, e estocados no corpo gorduroso dos insetos, estes lipídios são armazenados para uma posterior utilização (PONTES et al., 2008). Os substratos de lipídeos não são consumidos em sua totalidade durante a embriogênese, sugere-se, portanto, que eles sejam utilizados para a obtenção de energia durante a vida larval do carrapato até o encontro do seu hospedeiro, e início da alimentação (CAMPOS et al., 2006).

Pela sua importante função estrutural nas membranas biológicas, ao sofrer modificação no número ou composição, os lipídeos tendem a apresentar alterações metabólicas como resposta a fatores de estresse (STUART et al., 1998).

Isto posto, após a utilização de reservas de carboidratos, os lipídeos são consumidos com maior frequência, apresentando assim alterações qualitativas e quantitativas nas mais variáveis classes desse substrato (BANDSTRA et al., 2006; MULLER et al., 2000).

Além de serem utilizados como fonte de energia e atuarem na biogênese de membranas, os lipídeos participam na sinalização da resposta imune, entretanto, a origem da sinalização na mobilização dos lipídeos bem como seu destino não está totalmente elucidados (ARRESE; SOULAGES, 2010).

Ainda são escassos estudos sobre enzimas envolvidas na hidrólise e no transporte dos lipídeos nos carrapatos. Logo, a identificação da disponibilização desse substrato nas diferentes etapas de vida do *R. microplus* auxiliaria na compreensão do metabolismo lipídico e na elaboração de novos métodos de controle do carrapato (GUIZZO et al., 2012).

2.6 Resistência acaricida dos carrapatos *R. microplus*

Os carrapatos são responsáveis por gerarem perdas econômicas em decorrência da diminuição nos índices de ganho de peso, produção de leite, danos na

pele, taxa de natalidade, dentre outros (POLANCO-ECHEVERRY; RÍOS-OSORIO, 2016). No Brasil, os gastos envolvendo os problemas causados pelo *R. microplus* somam prejuízos anuais em torno de US\$ 3,24 bilhões (GRISI et al., 2014). Além disso, entre os anos de 2008 e 2013 foi possível observar que a venda de medicamentos antiparasitários aumentou 28,3%, refletindo um aumento do uso dessas drogas no rebanho nacional (SINDAN, 2014).

O método acaricida é o mais utilizado no controle de carrapatos em bovinos, favorecendo assim, o surgimento progressivo de populações resistentes destes parasitas a vários princípios ativos que estão sendo comercializados. Além disso, mesmo se caracterizando a maneira mais eficaz no controle de infestações parasitárias, os carrapaticidas disponíveis no mercado têm se tornado gradativamente menos eficientes devido ao seu uso excessivo e sem estratégias de controle (ANDREOTTI, 2010; GOMES et al., 2011; SILVEIRA NETO et al., 2017).

De maneira geral, os artrópodes possuem um intervalo pequeno entre as gerações, favorecendo assim o surgimento de diferentes populações com perfis genotípicos diferenciados conforme a pressão seletiva que são submetidos. As mutações genéticas associadas aos mecanismos de resistência tornam os pesticidas ineficazes rapidamente, estimulando assim o aumento da sua concentração e mudança do princípio ativo (SUTHERST, et al., 1983).

A resistência a acaricidas está associada a uma queda na susceptibilidade do parasita perante a ação de uma droga (DEVANEY, 2013). Fatores biológicos, operacionais e genéticos são caracterizados como os principais fatores ligados ao surgimento da resistência parasitária (ABBAS et al., 2014). A partir do momento em que a resistência se torna presente em uma determinada população de carrapatos perante a um princípio ativo, tal resistência também se tornará instalada para drogas pertencentes à mesma família ou grupo químico, tornando-se assim, inviável a sua utilização para as gerações futuras (FURLONG & PRATA, 2005; FURLONG, PRATA & MARTINS, 2007).

O principal local de ação dos compostos químicos presentes nos acaricidas atuam em sítios específicos do sistema nervoso dos parasitas, promovendo alterações dos processos fisiológicos vitais (ETO, 1990). As drogas piretróides sintéticos, organofosforados (MENDES et al., 2013), lactonas macrocíclicas (KLAFKE et al., 2012), amitraz (LOVIS et al., 2013), fipronil (CASTRO-JANER et al., 2010) e

fluazoron (RECK et al., 2014), pertencem às classes de carrapaticidas que já apresentaram resistência nas populações de carrapatos.

O surgimento da resistência aos pesticidas pode ser caracterizado como uma resposta evolutiva do agente contra sua eliminação. Dessa forma, o tratamento baseado na aplicação de pesticidas busca extinguir os indivíduos suscetíveis da população, e contribui para a manutenção dos indivíduos que se tornaram resistentes ao produto sintético. Sendo assim, quanto maior o número das aplicações de drogas, maior a seleção de carrapatos resistentes, contribuindo assim na diminuição da eficácia dos produtos. Portanto, a superdose, o excesso, e a administração incorreta dos carrapaticidas provocam a resistência às drogas disponíveis no mercado (LE GALL et al., 2018).

De acordo com Cutullé et al. (2009), em Queensland, Austrália, foi possível observar que 80% dos carrapatos são resistentes à drogas organofosforados, 50% aos piretróides sintéticos e amitraz em torno de 12%. Esse acontecimento pode ser classificado como um tipo de resistência múltipla, e uma grande ameaça para a bovinocultura, visto que a difusão das cepas de carrapatos leva informações de mutações e o trânsito destes bovinos infestados contribuem para a resistência das mais variadas bases químicas presentes nos acaricidas (FURLONG, MARTINS & PRATA, 2007).

Estudos demonstraram que o avanço da nanotecnologia promoveria um aspecto modernizador e satisfatório na saúde animal. A utilização das nanopartículas por intermédio de metais sintetizados apresentou amplo espectro de ação nos parasitas e vetores, porém, tornaram-se também tóxicas para os animais não-alvos. Dessa maneira, visando reduzir o impacto ambiental e econômico dos produtos sintéticos, o emprego de produtos de origem vegetal contendo compostos acaricidas tornaram-se ferramentas úteis para controle dos ectoparasitas, porém, com potencial duvidoso para controle in vivo (PAVELA et al., BENELLI & LUKEHART, 2017).

Em virtude das desvantagens relacionadas ao emprego dos acaricidas e visando zelar pela saúde animal e consequentemente do homem de forma indireta, além da preservação do meio ambiente e oferecer ao consumidor produtos de boa qualidade, torna-se necessário a utilização de um método de controle que não possua esses produtos químicos. A proliferação exponencial desses artrópodes em decorrência da ampla adaptação aos diferentes ambientes, provoca a necessidade de

buscar estratégias de controle, que além de eficientes sejam sustentáveis (MENDES et al., 2019).

Dentre esses possíveis métodos de controle encontra-se o gás Ozônio (O_3) já utilizado como acaricida em carrapatos *R. microplus*, *R. sanguineus* s.l. e *Dermanyssus gallinae* (MOREIRA et al., 2018, FIGUEIREDO et al., 2018; BANADAKEI et al., 2018; ABREU et al., 2021).

2.7 Gás ozônio

Em condições ambientais, o gás ozônio (O_3) apresenta elevado poder de oxidação e odor característico, o que permite que o mesmo possa ser detectado por uma pessoa em concentrações da ordem de 0,1 por partes por milhão (ppm). O ozônio é um gás bastante reativo e altamente instável, ou seja, logo se recompõe a oxigênio (O_2) (BOCCI, 1999).

O mecanismo de ação do ozônio pode variar de acordo com o ambiente e a finalidade em que será aplicado. Temperatura, oxigenação e umidade, exercem importante efeito sobre a sua ação. Em bactérias, por exemplo, supõe-se que o ataque primário do ozônio aconteça na parede celular e, posterior no interior da célula, onde oxida aminoácidos e ácidos nucléicos, consequentemente não induzir a resistência nos microrganismos, não deixar resíduos no meio ambiente e atua como potente agente antimicrobiano (PASSOS et al. 2014; FONSECA et al. 2015, NAGAYOSHI, et al., 2004; BOCCI, 2010).

A utilização do ozônio para o controle de artrópodes considerados pragas em grãos e frutas já tem sido uma prática bem difundida (ROZADO et al. 2008; BONJOUR et al. 2011) e a sua aplicação em carrapatos vem sendo gradualmente explorada.

Garcia et al. (2004) em seu estudo constatou que o borbulhamento com o gás ozônio reduziu as médias das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos presentes na microbiota bacteriana do idiossoma de *R. microplus*. Szabó et al. (2009) em carrapatos *R. sanguineus* s.l. não identificaram efeitos carrapaticidas nas doses testadas. Oliveira et al. (2014) em relato de caso utilizando óleo de girassol ozonizado para tratamento tópico de cão infestado por carrapatos desta mesma espécie observaram de um efeito acaricida com a ausência do parasitismo e recuperação das lesões de pele após a aplicação da solução.

Moreira et al. (2018) identificaram o efeito acaricida e ação oxidativa do ozônio na cutícula e espiráculo respiratório de *R. sanguineus* s.l. e as alterações nos aspectos

morfofuncionais do aparelho reprodutivo de teleóginas de *R. microplus* durante o período de pré-postura foram estudadas por Figueiredo (2015), que identificou dosagens acaricidas da mistura gasosa, e que apesar dos aspectos morfofuncionais do sistema reprodutor terem obedecido aos padrões morfológicos gerais encontrados na literatura, as variações morfológicas apresentadas mostraram a necessidade da realização de novos estudos.

Recentemente, estudos utilizando protocolo de exposição com água ozonizada (ABREU et al., 2020; ABREU et al., 2021) identificaram efeitos tóxicos em carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l.. Além de utilizarem técnicas histológicas e microscopia de luz para a avaliação das alterações morfofisiológicas, o estudo reafirma a importância de pesquisas abrangendo o efeito da exposição do ozônio em carrapatos.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar possíveis alterações no metabolismo de lipídeos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* através do corpo gorduroso evidenciando alterações no parâmetro biológico após a aplicação dos gases oxigênio e ozônio.

Objetivos específicos

- Avaliar possíveis alterações no parâmetro biológico das fêmeas ingurgitadas *R. microplus* em diferentes dosagens dos gases O₂ e O₃.
- Analisar o perfil lipídico do corpo gorduroso determinando os valores de CHO, CHOE, TAG, AG, MG nas fêmeas ingurgitadas *R. microplus* em diferentes dosagens dos gases O₂ e O₃.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Local

Esta pesquisa foi realizada entre os meses de julho a outubro de 2017 nas instalações do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes (LCM), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), no Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica - RJ, (latitude: 22° 44' 38" S; longitude: 43° 42' 27" W e altitude: 26m).

Comitê de Ética e Uso Animal

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) da UFRRJ com o Processo nº 23083.009241/2011-16/aprovação 154/2011 e pelo CEUA da UAM sob Processo nº 04003 /2019.

Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

Para a obtenção das fêmeas ingurgitadas após 21 dias da infestação artificial, as teleóginas foram retiradas dos bovinos manualmente que permaneciam alojados nas baias durante todo o período experimental (Figura 6).



Figura 6. Bezerros infestados artificialmente com *R. microplus*, nota-se a presença das teleóginas ingurgitadas fixadas nos hospedeiros.

Após a remoção das fêmeas ingurgitadas, as mesmas foram enviadas ao laboratório onde foram lavadas em água corrente e higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,05% por 1 minuto para a assepsia externa da cutícula e secas em papel toalha. Em seguida, foram pesadas e distribuídas de forma homogênea em

5 grupos contendo dez fêmeas cada. Cada teleóquina foi individualmente identificada, pesada e numerada para a realização dos experimentos do parâmetro biológico.

Formação dos grupos experimentais

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (n=250) foram divididas de acordo com o tempo de exposição aos gases oxigênio e ozônio e subdivididas em grupos para as análises do corpo gorduroso em função do tempo de após a exposição dos gases:

1. Grupo Controle (GC) (Sem tratamento);
 - 1.1. Grupo Controle momento zero;
 - 1.2. Grupo controle momento 24h após a retirada do animal;
 - 1.3. Grupo controle momento 72h após a retirada do animal.

2. Grupo Gás Oxigênio (O₂) aplicado por 5 minutos (O₂5')
 - 2.1. Grupo O₂ momento 24h após a exposição do gás (O₂ 24h 5');
 - 2.2. Grupo O₂ momento 72h após a exposição do gás (O₂ 72h 5');

3. Grupo Gás Oxigênio (O₂) aplicado por 30 minutos (O₂30')
 - 3.1. Grupo O₂ momento 24h após a exposição do gás (O₂ 24h 30');
 - 3.2. Grupo O₂ momento 72h após a exposição do gás (O₂ 72h 30');

4. Grupo Gás Ozônio (O₃) aplicado por 5 minutos (O₃5');
 - 4.1. Grupo O₃ momento 24h após a aplicação do gás (O₃ 24h 5');
 - 4.2. Grupo O₃ momento 72h após a aplicação do gás (O₃ 72h 5');

5. Grupo Gás Ozônio (O₃) aplicado por 15 minutos (O₃15') *;
*Este grupo foi testado apenas para o parâmetro biológico.

6. Grupo Gás Ozônio (O₃) aplicado por 30 minutos (O₃30').
 - 6.1. Grupo O₃ momento 24h após a aplicação do gás (O₃ 24h 30')
 - 6.2. Grupo O₃ momento 72h após a aplicação do gás (O₃ 72h 30');

Protocolo de aplicação dos gases oxigênio medicinal e mistura gasosa oxigênio+ozônio

O equipamento utilizado para a geração da mistura gasosa oxigênio+ozônio foi da marca Ozone & Life®, modelo O & L 1.5M com regulagem na concentração em 62 mg/L acoplado a um cilindro de oxigênio medicinal de 1,5 m³ utilizando a vazão de 1/8 L/minuto de oxigênio medicinal (Figura 7).

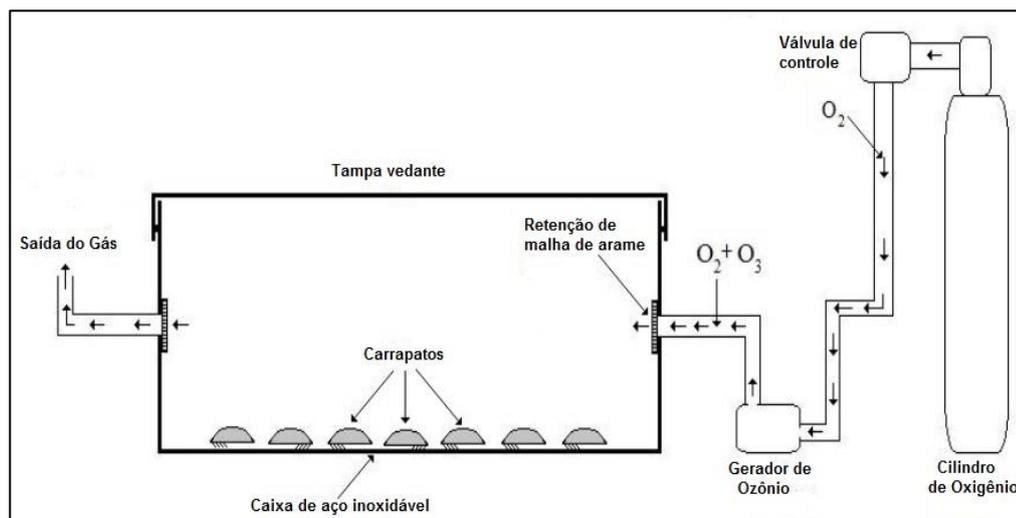


Figura 7. Aparato desenvolvido para a ozonização dos carrapatos. Cilindro de oxigênio medicinal acoplado ao gerador de ozônio e a caixa de inox (Fonte: FIGUEIREDO, 2015).

As teleóginas foram acondicionadas dentro de uma caixa de inox medindo 10x20x5 cm, a qual possuía uma entrada para acoplar a saída do gerador com a mistura gasosa $O_2 + O_3$, na outra extremidade oposta havia um segundo orifício para a saída do gás (Figura 8), que foi direcionado para o ambiente externo do laboratório seguindo um protocolo de biossegurança frente ao gás ozônio.

Conforme a análise volumétrica do recipiente verificou-se que o tempo de homogeneização da caixa de inox pelos gases foi de cinco minutos, estando esta tampada e vedada.



Figura 8. Teleóginas de *R. microplus* acondicionadas no interior da caixa de inox antes do início do tratamento na aplicação do gás. Legenda: A=entrada dos gases testados no experimento; B= saída dos gases testados no experimento.

Avaliação dos Parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

Para a avaliação dos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas (n=40) foram subdivididas, então dez fêmeas ingurgitadas provenientes de cada grupo experimental (controle e tratado com os gases (O_2 e O_3) foram pesadas individualmente e acondicionadas em placas de Petri, fixadas em posição dorsal com auxílio de fita adesiva (Figura 9) e mantidas em estufa do tipo BOD, na temperatura de $27 \pm 1^\circ C$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 5\%$ para acompanhamento diário da postura (até que fosse observada a ausência de postura da fêmea).



Figura 9. Teleóginas de *R. microplus* acondicionadas nas placas de Petri para o acompanhamento dos parâmetros biológicos.

Inicialmente pesou-se as fêmeas obtendo-se o seu peso inicial e após 72 horas realizou-se a primeira pesagem. As pesagens seguintes obedeceram ao intervalo a

cada 3 dias, até cessar a postura, totalizando quatro pesagens. Três dias após o término da postura das fêmeas teleóginas obteve-se o peso da fêmea quenógena (denominação da fêmea após o término da ovoposição).

Os parâmetros biológicos das teleóginas de *R. microplus* avaliados foram (Anexo A):

- 1) Índice de produção de ovos (I.P.O.);
- 2) Peso Total da Massa de Ovos (P.T.M.O.);
- 3) Índice de Produção de Ovos (I.P.O.);
- 4) Percentual de Eclosão das Larvas (P.E.L.);
- 5) Índice Nutricional (I.N.).

Para a determinação da eficácia do tratamento *in vitro* foram calculados também a Eficiência Reprodutiva (E.R.) e o Percentual de Controle (% Controle) baseados nas fórmulas de Drummond et al. (1971), e orientado por escala semelhante à elaborada por Fernandes (2007) para o percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus*, a eficácia do tratamento *in vitro* foi classificada como baixa (0 - 25%), intermediária (26-50%) e alta (51 – 100%) em função dos percentuais de controle observados para os respectivos tratamentos.

Obtenção dos corpos gordurosos

Os corpos gordurosos (n=210) das teleóginas (controle e tratados O₂ e O₃) foram coletados e separados em cada subgrupo testados em três alíquotas com cinco amostras em cada grupo, foram acondicionados em solução tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) a 4 °C. Para esta etapa, a porção anterior da fêmea ingurgitada foi removida com uma lâmina de bisturi e todo o conteúdo interno foi removido após uma leve pressão em meio contendo tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 a 4 °C. Realizou-se a ablação longitudinal lateral na cutícula das fêmeas para que se pudesse em seguida, realizar a coleta do corpo gorduroso parietal.

Os corpos gordurosos foram removidos dos carrapatos com o auxílio de uma pinça e microscópio estereoscópico (Figura 10), em seguida foram lavados e armazenados em microtubos a -80° C até a realização das análises.

Para a realização das análises bioquímicas, os corpos gordurosos foram homogeneizados em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) a 4 °C usando um

homogeneizador Potter-Elvehjem com pistilos de plástico acoplados, de acordo com Angelo et al. (2013).



Figura 10. Imagem do corpo gorduroso retirado de uma fêmea teleógena de *R. microplus*.

Perfil de Lipídeos

Para a realização do perfil de lipídeos, os corpos gordurosos de cada grupo foram homogeneizados com pistilo de plástico estéril e em seguida o volume completado com água destilada estéril para aproximadamente 1mL. Esse homogenato foi submetido ao vórtex e em seguida realizada a dosagem de proteínas e extração de lipídeos.

Extração de Lipídeos

A extração dos lipídeos associados ao corpo gorduroso foi realizada com clorofórmio: metanol: água (1: 2: 0,8) (v/v) de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959). Para tal extração, o volume de cada amostra correspondente a 1000 µg de proteína total foi colocado em um tubo de extração e adicionado água destilada até completar o volume de 800 µL. Em seguida, foi adicionado 2 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vortex, de cinco em cinco minutos, durante 1 h. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min (centrífuga clínica). O sobrenadante foi transferido para outro tubo de extração, no qual foi adicionado 1 mL de água e 1 mL de clorofórmio. Os tubos foram novamente centrifugados (3000 rpm/10 min) e a fase orgânica (parte inferior do tubo) retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para outro tubo de extração. A fase orgânica foi seca por arraste de nitrogênio e armazenada a -20°C para posterior análise.

Análise dos Lipídeos

Os lipídeos extraídos das amostras do corpo gorduroso foram analisados por CDC unidimensional em placas de sílica gel (Merck®). Os lipídeos foram reconstituídos em 60 µL de clorofórmio para aplicação das amostras nas placas de sílica. Os lipídeos neutros foram separados após a corrida das placas de sílica gel em mistura de hexano: éter etílico: ácido acético (60:40:1, v/v) (KAWOOWA; LAW, 1988). Após a evaporação dos solventes, as placas de cromatografia foram pulverizadas com a solução de Cherring constituída de sulfato de cobre 10% (p/v) e ácido fosfórico 8% (v/v) e queimadas em forno Pasteur a 170°C por 5-10 min (RUIZ; OCHOA, 1997). As imagens foram submetidas à densitometria através do programa Image Master Total Lab versão 1.11 (GE Healthcare® - Brazil Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil).

Análise estatística do parâmetro biológico

A estatística dos ensaios biológicos foi realizada a partir do programa BioEstat 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá/Tefé/AM), sendo os dados paramétricos avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (comparação entre as médias) e não paramétricos pelo teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) (comparação entre as ordenações médias) com nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

Análise estatística do perfil lipídico

O percentual de bandas dos lipídeos neutros foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros biológicos

Após os experimentos foram encontrados os seguintes resultados para os parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* no período de pré-postura expostas aos gases O₂ e O₃, dados apresentados na Tabela 1.

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao peso inicial das fêmeas ingurgitadas ($p > 0,05$). Fazendo uma relação entre o peso inicial da fêmea (P.I.F.) e o peso total das massas dos ovos (P.T.M.O.) com o tempo de exposição aos grupos tratados com O₃, houve uma relação de três vezes menos massa de ovos no grupo tratado com O₃ por 15' em relação ao grupo tratado com O₃ por 5', assim como, índice nutricional (IN) ficou quase três vezes menor no grupo tratado com O₃ por 15' em relação ao grupo tratado com O₃ por 5'.

Aos grupos que receberam tratamento somente do gás oxigênio medicinal, o percentual de eclosão (P.E.) manteve-se alto (86 e 93%) semelhante ao grupo controle (99,44%). Entretanto, ao utilizar o gás ozônio detectou-se uma diminuição do P.E., ao aplicá-lo por 30 minutos não houve a eclosão dos ovos e à medida que se diminuiu o tempo de exposição do gás O₃, aumentou-se o P.E., assim, em 15 minutos de aplicação do tratamento o resultado foi de 16% e por 5 minutos obteve-se 61%.

O índice de produção dos ovos (I.P.O.), baseia-se na metodologia de Bennett (1974) utilizando-se os valores de P.I.F. e P.T.M.O. Esse valor (em porcentagem) está relacionado ao fato da fêmea ingurgitada converter a energia metabólica necessária para o processo de vitelogênese. Os resultados demonstraram que o gás oxigênio não interferiu significativamente no I.P.O., enquanto nos grupos expostos ao gás O₃ obteve-se 24,0% (O₃ - 5') e 7,90% (O₃ - 15') no índice quando comparado com o grupo controle (59,60%).

O Peso final da quenógena (P.F.Q.) foi utilizado para a obtenção do índice nutricional (I.N.). O cálculo do índice nutricional baseia-se na divisão do P.T.M.O. pelo resultado entre a subtração do P.I.F. pelo P.F.Q. multiplicando-se o resultado por 100.

A eficiência reprodutiva (E.R) é obtida através da divisão entre o P.T.M.O. pelo P.I.F., multiplicando o resultado pelo P.E. O resultado demonstrou que o ozônio reduziu significativamente os níveis da E.R. em relação aos outros grupos.

O percentual de controle (P.C.) apresentou-se baixo nos grupos tratados com o gás oxigênio e no grupo controle, pois tais grupos não se verificaram uma eficácia

no controle deste parasita. Nos grupos submetidos ao tratamento de ozônio o P.C. foi classificado como alto em todos os intervalos de tempo (5, 15 e 30 minutos) com 66,09%, 97,59% e 100% de eficácia.

Tabela 1. Resultados das médias e desvio padrão dos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* nos grupos controle e tratados durante diferentes períodos de exposição ao gás oxigênio e ozônio.

Grupo	P.I.F. (g)	P.T.M.O. (g)	P.E. (%)	P.F.Q	I.P.O.	I.N.	E.R	P.C. (%)
GC	0,2600 ± 0,06	0,1549 ± 0,04	89,44 ± 8,85	0,0675 ± 0,02	59,6028 ± 2,98	72,2125 ± 24,75	53,3763 ± 6,43	—
O ₂ 5'	0,2467 ± 0,0436	0,1415 ± 0,0253	86,8 ± 21,21	0,0718 ± 0,0122	57,4131 ± 1,6306	81,0824 ± 2,2229	49,6268 ± 11,9959	7,02
O ₂ 30'	0,2607 ± 0,0578	0,1405 ± 0,0445	93,9 ± 12,04	0,0799 ± 0,0372	53,5557 ± 13,0434	75,7106 ± 14,0091	49,8671 ± 13,0787	6,57
O ₃ 5'	0,3044 ± 0,0322	0,0707 ± 0,0571	61,1 ± 32,0397	0,0675 ± 0,0218	24,0059 ± 19,6081	30,6142 ± 26,1367	18,0995 ± 16,3323	66,09
O ₃ 15'	0,1724 ± 0,0332	0,0118 ± 0,0135	16,0 ± 26,7187	0,0646 ± 0,0246	7,9098 ± 8,7273	11,0782 ± 11,5222	2,0078 ± 2,8461	97,59
O ₃ 30'	0,2557 ± 0,0562	—	—	—	—	—	—	100

Legenda: GC: Grupo controle; O₂5': Grupo Gás Oxigênio aplicado por 5 minutos; O₂30': Grupo Gás Oxigênio aplicado por 30 minutos; O₃5': Grupo Gás Ozônio aplicado por 5 minutos; O₃15': Grupo Gás Ozônio aplicado por 15 minutos; O₃30': Grupo Gás Ozônio aplicado por 30 minutos; "—": Não se aplica; P.I.F.: Peso Inicial da Fêmea; P.T.M.O.: Peso Total da Massa de Ovos; P.E.: Percentual de Eclosão; P.F.Q.: Peso final da Quenógena; I.P.O.: Índice de Produção de Ovos; I.N.: Índice Nutricional; E.R.: Eficiência reprodutiva; P.C. (%): Percentual de Controle.

5.2 Perfil de Lipídios

O percentual de cada classe de lipídeo neutro (CHOE, TG, AG, CHO e MG) foi calculado a partir dos dados de volume obtidos pela densitometria usando o Software Image Total Lab®, e não foram observadas diferenças significativas quando o percentual de CHOE ($p=0.6310$), AG ($p=0.1841$), CHO ($p=0.4151$) e MG ($p=0.1269$) foram comparados entre si. No entanto, foi observada a redução significativa no TG quando o grupo Controle no tempo 0 foi comparado com o Controle 72h ($p=0.0006$) e quando o grupo Controle 0 foi comparado com o O₂ tempo 72h com 5' de exposição ($p=0.0438$), conforme apresentado na Tabela 2. Ademais, nas amostras que receberam o oxigênio, foi possível conferir uma manutenção dos valores bioquímicos.

Tabela 2. Valores de média \pm desvio padrão do percentual de lipídeos neutros Colesterol Esterificado (CHOE), Triacilglicerol (TG), Colesterol livre (CHO), Ácidos Graxos livres (AG) e Monoacilglicerol (MG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas ao tratamento com Oxigênio e Ozônio em diferentes tempos.

GRUPOS	CHOE	CHO	TG	AG	MG
Ctr 0h	21.45 \pm 10.4a	35.25 \pm 8.22a	18.79 \pm 4.68	20.73 \pm 5.00a	5.55 \pm 4.99a
Ctr 24h	20.83 \pm 6.37a	46.91 \pm 4.74a	9.99 \pm 1.05	17.16 \pm 5.21a	5.11 \pm 1.51a
Ctr 72h	24.87 \pm 4.85a	43.87 \pm 8.11a	6.29 \pm 1.47	18.77 \pm 4.77a	6.20 \pm 1.07a
O₂ 24h 5'	22.09 \pm 5.74a	45.90 \pm 10.08a	7.76 \pm 1.74	13.71 \pm 3.47a	10.53 \pm 8.23a
O₂ 24h30'	21.37 \pm 7.87a	49.38 \pm 7.10a	10.50 \pm 4.26	12.68 \pm 3.34a	6.08 \pm 2.75a
O₂ 72h 5'	25.48 \pm 3.90a	42.41 \pm 15.04a	12.09 \pm 8.53	15.83 \pm 4.83a	4.18 \pm 1.44a
O₂72h30'	31.14 \pm 10.51a	35.80 \pm 5.71a	7.28 \pm 1.76	22.32 \pm 11.32a	3.43 \pm 1.11a
O₃ 24h 5'	19.34 \pm 6.62a	43.87 \pm 9.95a	10.54 \pm 2.85	20.56 \pm 2.54a	5.69 \pm 0.59a
O₃ 24h30'	21.50 \pm 7.46a	43.75 \pm 6.43a	14.47 \pm 4.33	16.09 \pm 3.18a	4.19 \pm 0.75a
O₃ 72h 5'	27.64 \pm 6.65a	32.51 \pm 0.12a	9.81 \pm 3.05	16.42 \pm 4.95a	6.31 \pm 4.49a
O₃72h 30'	34.73 \pm 3.06a	31.27 \pm 0.71a	12.84 \pm 0.19	18.30 \pm 2.17a	2.85 \pm 0.01a

Legenda: Letras minúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo Student-Newman-Keuls ($p \geq 0.05$).

A representação da análise bioquímica do corpo gorduroso pode ser observada nos gráficos 1,2,3 e 4. Percebe-se que os valores médios de CHOE, CHO, AG e MG não diferiram significativamente pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo Student-Newman-Keuls ($p \geq 0.05$).

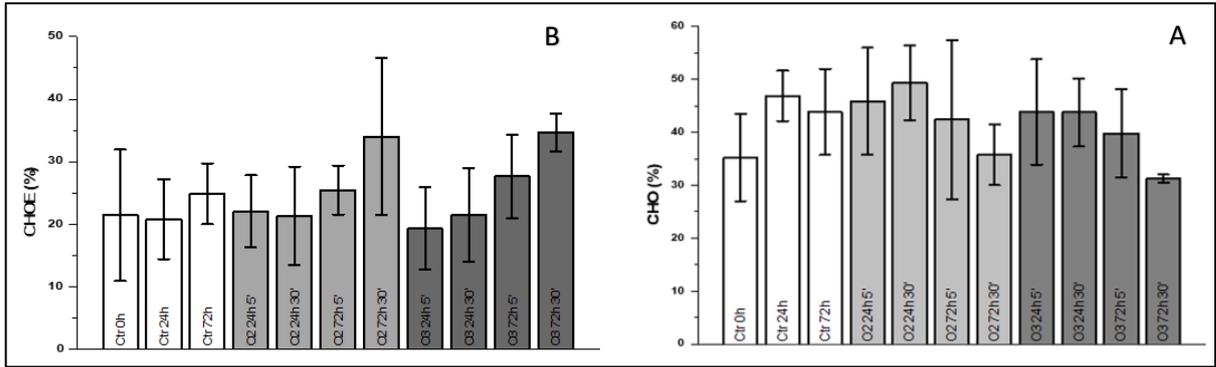


Gráfico 1: Percentual de colesterol esterificado (CHOE) (B) e percentual de colesterol livre (CHO) (A) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente.

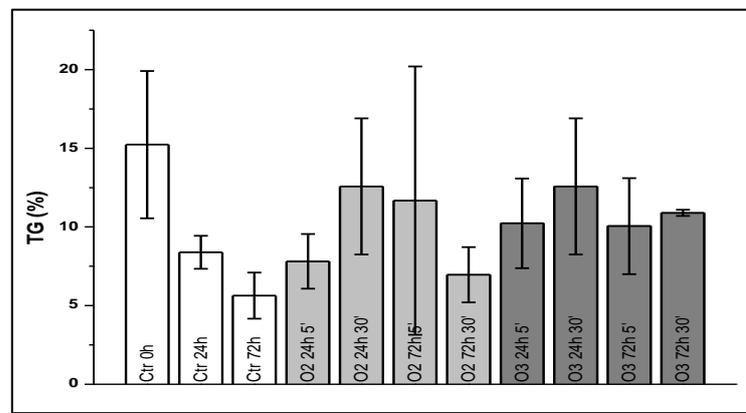


Gráfico 2: Percentual de triacilglicerol (TG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente.

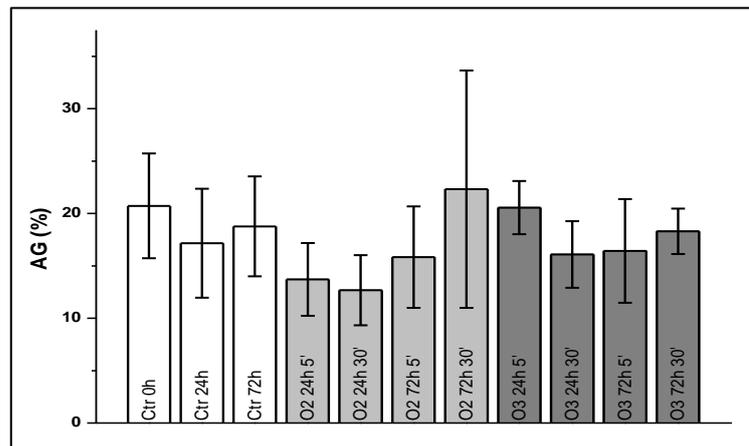


Gráfico 3: Percentual de ácidos graxos (AG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente.

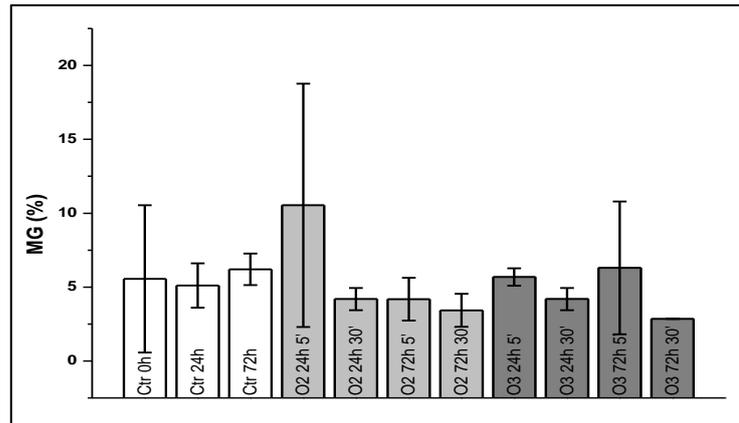


Gráfico 4: Percentual de monoacilglicerol (MG) no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de acordo com o grupo pertencente.

6. DISCUSSÃO

A presença de populações de carrapatos multirresistentes a princípios ativos despertam para a necessidade de novos métodos de controle. Dessa maneira, o gás ozônio que possui um potencial acaricida sobre a espécie de carrapato bovino (Figueiredo et al., 2018), torna-se uma importante linha de pesquisa para o controle deste parasita à resistência aos acaricidas disponíveis.

No presente estudo, foi possível identificar alterações no ciclo biológico das teleóginas, em função do decréscimo do I.N., I.P.O. e E.R. e um elevado percentual de controle em todos os intervalos de tempos. O decréscimo do I.N. pode ser decorrente ao fato de que a exposição ao ozônio possivelmente proporcionou um estresse metabólico na fêmea ingurgitada, mobilizando suas reservas energéticas para processos fisiológicos que não envolvam a postura, assim os menores índices foram observados nos grupos que receberam a exposição do gás O₃. Por conseguinte, essas variações atribuídas à ação do O₃, sugerem a sua utilização para controle biológico e ambiental para carrapatos. Szabó et al. (2009) observaram que o tratamento dos carrapatos com a mistura de oxigênio/ozônio na concentração 0,00023 g/minuto, nos períodos de 15, 30 e 45 minutos, não interferiu nos parâmetros biológicos da espécie *R. sanguineus* s.l. Entretanto, Figueiredo et al. (2018) detectaram que em doses superiores de ozônio (1550 e 3410 mg/L.min) o efeito acaricida ocorreu antes mesmo do período de pré-postura.

Ao realizar estudos com os ácaros da espécie *Dermanyssus gallinae*, Banadakei et al. (2018) observaram que a utilização de água ozonizada na

concentração de O₃ de 10 ppm proporcionou uma taxa de mortalidade de 63,99%, apresentando um potencial acaricida dose-dependente.

Abreu et al. (2020) observaram que a água ozonizada nas concentrações entre 0,75 mg/L e 3,0 mg/L promoveram alterações morfofisiológicas das glândulas salivares em fêmeas de *R. sanguineus* s.l. Além das mudanças nos ácinos glandulares, o ozônio promoveu alterações no citoplasma e núcleos das células, culminando na perda da função secretora e morte celular, possivelmente em decorrência da sobrecarga de íons gerados pelos radicais de hidroxila.

Em insetos, o mecanismo de ação do gás ozônio também não está totalmente elucidado. Para isso, uma das hipóteses atribui que a alteração na troca gasosa e conseqüentemente uma diminuição no metabolismo, favorece a morte dos insetos. Portanto, o espiráculo e o sistema respiratório é um dos sítios de ação do O₃ (BOOPATHY, RAJAN & RADHAKRISHNAN, 2022). Essa hipótese de ação acaricida corrobora com o estudo de Moreira et al. (2018) que após a exposição do gás O₃ na concentração de 62 mg/L, e posterior análise das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do espiráculo respiratório de fêmeas de *R. sanguineus* s.l., detectaram o desaparecimento dos sulcos alinhados, formação de crateras e oxidação da cutícula, indicando assim os danos criados pelo ozônio ao sistema respiratório em carrapatos.

Outra hipótese levantada acerca dos efeitos acaricidas do ozônio, baseia-se em suas propriedades oxidativas. Além dos danos a componentes essenciais, como por exemplo, à membrana celular, o ozônio pode ainda promover quebras em fitas de DNA (BALLINGER et al., 2004; HOLMSTRUP, et al., 2011).

Wolf et al. (2018) demonstraram que o ozônio empregado em águas residuais promoveu a inativação genômica de diversas espécies de enterovírus. Além disso, estudos identificaram que o ozônio apresenta potencial genotoxicidade em espécies de fungos, propiciando além das alterações na regulação da expressão gênica, a transferência de informação genética (GEWEELY, 2006; ZARGARAN et al., 2017; GRZYMSKAA et al., 2019). A exposição de peixes ao ozônio também gerou efeitos genotóxicos a nível cromossomal através da oxidação de bases pirimídicas do DNA nas células (GUILHERME et al., 2019).

Dong et al. (2022) sugerem que a expressão gênica e os danos ao DNA não ocorram imediatamente após a exposição de O₃, e sim no período pós-exposição. Logo, ao analisar o presente estudo foi possível verificar que a diminuição do

percentual de eclosão nos grupos que receberam a mistura gasosa oxigênio+ozônio estejam também relacionadas à toxicidade retardada do O₃, haja visto que o estresse provocado pelo gás pode ter alterado o processo da embriogênese. Além de sugerir novos caminhos para estudos envolvendo os efeitos genotóxicos também em carrapatos.

Elenca-se, portanto, que a vitelogênese e o processo de maturação dos oócitos podem servir também como alvo para novas aplicações biotecnológicas envolvendo o controle e manejo integrado dos carrapatos (MITCHELL, SONENSHINE & PÉREZ DE LEÓN, 2019).

Dentre os carrapaticidas empregados no mercado veterinário, encontram-se as benzoilfeniluréias que apresentam como mecanismo de ação a inibição da síntese de quitina nos artrópodes. Em vista disso, durante o ciclo de vida do carrapato, a síntese de quitina possui grande importância, principalmente para a eclosão das larvas (VASUKI & RAJAVEL, 1992). Tendo o fluazuron como o principal representante da classe de benzoilfeniluréias, espera-se a ocorrência de alterações nos parâmetros biológicos e ciclo de vida dos carrapatos após a exposição ao composto (WHO, 1998).

Gaudêncio et al. (2016) observaram que a exposição ao fluazuron promoveu alterações no metabolismo de carboidratos em teleóginas de *R. microplus*. Logo, o aumento na concentração de glicose na hemolinfa detectada caracterizou-se como um efeito não-alvo da substância química empregada.

De acordo com Da Glória et al. (1993) acontece uma lipólise precedente à postura, liberando ácidos graxos e glicerol como resultado, e conseqüentemente uma diminuição na concentração de TGs, também observados nos resultados do grupo controle desta pesquisa que seguiram o ciclo biológico normal.

Esse processo de lipólise faz parte do período de postura favorecendo a mobilização energética (ANGELO et al., 2013). Além disso, uma inadequada mobilização de lipídios para a produção de oócitos, pode prejudicar a formação de ovos viáveis (ZIEGLER, VAN ANTWERPEN, 2006), revalidando os resultados dos parâmetros biológicos obtidos em nosso estudo, haja visto que o ozônio promoveu alterações no percentual de eclosão em todos os grupos tratados com a mistura gasosa oxigênio+ozônio. Para tanto, supõe-se que o carrapato tenha armazenado grande quantidade de TG como combustível energético em decorrência ao estresse oxidativo propiciado pelo ozônio.

Além de não ocorrer a eclosão dos ovos no grupo tratado por 30 minutos, a utilização da mistura gasosa oxigênio+ozônio promoveu uma diminuição do percentual de eclosão nos grupos com aplicação durante 5 (61%) e 15 minutos (16%). Cherry (1976) destacou que modificações na proteção lipídica que recobrem os ovos, poderão promover o ressecamento e a desidratação, inviabilizando assim a eclosão em alguns casos, bem como observado em nosso trabalho, já que houve uma diminuição de 73,4% na eclodibilidade ao compararmos o grupo controle com o grupo que recebeu O₃ por 15 minutos.

Em relação ao metabolismo lipídico ao analisarmos os resultados obtidos, revelou-se que a concentração CHOE, CHO, AG e MG no corpo gorduroso das teleóginas não apresentaram diferenças significativas que denotem tendências ao efeito resultante nos tratamentos dos grupos. Anteriormente, além do corpo gorduroso, Gaudêncio (2016) não encontrou alteração no perfil dos lipídios neutros na cutícula e ovos expostos ao fluazuron. Diferente do observado por Marchesini et al., (2021) que ao empregarem óleos essenciais botânicos detectaram que além do potencial acaricida, os compostos alteraram o metabolismo lipídico de *R. microplus*.

Entretanto, no presente estudo foi possível observar um aumento nos níveis de TG se comparado aos grupos controles de mesmo intervalo de tempo, e tratamento apenas com oxigênio. Espera-se que os níveis de TG apresentem decréscimos à medida que progride a oviposição (IWUALA et al., 1979). O resultado do presente estudo demonstrou que o ozônio reduziu significativamente os níveis da eficiência reprodutiva em relação aos outros grupos. Desse modo, a não utilização de TG como fonte de energia para o processo de postura promoveu o seu acúmulo no corpo gorduroso. Esses resultados assemelham-se com os obtidos por Angelo et al. (2013) ao observamos que a infecção fúngica nos carrapatos também promoveu um acúmulo de TG neste tecido.

O oxigênio possui propriedade de formar espécies altamente reativas (ROS), isso porque, apresenta alta eletronegatividade. Um aumento na produção, ou uma diminuição na capacidade de eliminar ROS pode instabilizar o sistema, e ocasionar danos às biomoléculas, gerando assim, estresse oxidativo (SEN, 2001; ARUOMA et al., 2006). Os lipídios estão mais susceptíveis à oxidação. Além das alterações na membrana plasmática, as alterações funcionais das proteínas e do DNA podem justificar os danos oxidativos e a morte celular (TRACHOOTHAM et al., 2008). Sendo assim, tais características conferem ao O₃ além de alterações morfofuncionais

descritas por FIGUEIREDO et al. (2019) e ABREU et al. (2020), o seu estudo oxidativo pode revelar informações na atividade metabólica em carrapatos.

A utilização e metabolização dos lipídios em espécies de insetos têm sido estudadas por diversos autores, porém ainda são raras essas informações para a Classe Aracnídea, onde se encontram os carrapatos. Portanto, novos estudos fazem-se necessários para maiores esclarecimentos acerca do metabolismo lipídico em carrapatos, podendo assim, determinar novos alvos para o controle deste parasito.

7. CONCLUSÃO

Após a aplicação da mistura gasosa oxigênio+ozônio tornou-se possível verificar mudanças nos parâmetros biológicos que sugerem múltiplos mecanismos de ação e que resultam desde a inviabilidade dos ovos, até o alto percentual de controle e morte do carrapato.

Dentre os lipídios neutros analisados, apenas o triacilglicerol apresentou alterações significativas nos grupos tratados com oxigênio+ozônio. Dessa forma, o seu aumento no corpo gorduroso justifica-se pela não realização da postura observada pelos parâmetros biológicos. Sendo assim, os resultados aqui apresentados validam a importância desse lipídio no processo de vitelogênese pelas fêmeas ingurgitadas. Ademais, a análise dos carboidratos em carrapatos que receberam a mistura gasosa oxigênio+ozônio poderá favorecer o descobrimento de novos efeitos secundários ainda não explorados, e consequentemente explicitar o efeito acaricida do ozônio.

Apesar da relevância no desenvolvimento e reprodução, poucos estudos abrangem o metabolismo de lipídios em carrapatos, extrapolando muitas vezes o conhecimento para os insetos. Isto posto, por ser um estudo pioneiro de grande importância e complexidade, percebemos que ainda é necessário maior esclarecimento acerca da fisiologia do carrapato *R. microplus*. Dessa forma, a compreensão das vias metabólicas e estudos direcionados ao metabolismo energético podem auxiliar no controle desses artrópodes.

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, p. 6-20, 2014.

ABREU, M. R., DELALIBERA, I., JR, PEREIRA, N., & CAMARGO-MATHIAS, M. I. (2021). Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) exposed to ozonated water: A control strategy. *Medical and veterinary entomology*, 35(1), 88–96. <https://doi.org/10.1111/mve.12472>

ABREU, M.R., et al. (2020) Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response, *Ozone: Science & Engineering*, 42:6, 507-516, DOI: 10.1080/01919512.2020.1727310

ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W, editores técnicos. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos – Brasília, DF: Embrapa, 240 p., 2019.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36 p.

ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.57, p.79– 83, 2010.

ANGELO, I.C.; GÔLO, P. S.; PERINOTTO, W.M.S ; CAMARGO, M.G. ; QUINELATO, S.; SÁ, F.A. ; PONTES, E.G. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. . Neutral lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal infections. *Parasitology Research*, v. 112, p. 501-509, 2013.

ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, v. 55, p. 207-225, 2010.

ARUOMA, O. I.,GROOTVELD, M. e BAHORUN, T. Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology. *BioFactors* 27, 1-4, 1-3, 2006.

BANDSTRA, S.R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. *Parasitology Research*, v.99, p.414–418, 2006.

BANADAKEI, H.D., MOSHAVERINIA, A., HADDAD KHODAPARAST, M., KALIDARI, G. (2018). In vitro evaluation of acaricidal activity of aqueous ozone against *Dermanyssus gallinae*. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 10(1), 53-56. doi: 10.22067/veterinary.v10i1.70015

BALLINGER C.A., CUETO R., SQUADRITO G., COFFIN J.F., VELSOR L.W., PRYOR W.A., POSTLETHWAIT E.M. Antioxidant-mediated augmentation of ozone-induced membrane oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 2005;38:515–526. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.009.

BOCCI, V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozonotherapy a future in medicine? *Brit. J. Biomed. Sci.* 56: 270-279, 1999.

BOCCI, V. *Ozone: A New Medical Drug*. Dordrecht: Springer, (2 ed.) 2010.

CABRAL, G.A. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sciences*, v.77, p. 1699–1710, 2005.

BONJOUR, E.L.; OPIT, G.P.; HARDIN, J.; JONES, C.L.; PAYTON, M.E.; BEEBY, R.L. Efficacy of ozone fumigation against the major grain pests in stored wheat. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v.104, n.1, p.308–316, 2011. doi: 10.1603/ec10200.

BOOPATHY B., RAJAN A., RADHAKRISHNAN M. Ozone: An Alternative Fumigant in Controlling the Stored Product Insects and Pests: A Status Report. *Ozone Sci. Eng.* 2022;44:79–95. doi: 10.1080/01919512.2021.1933899.

CAMPOS E., MORAES J., FAÇANHA A.R., MOREIRA E., VALLE D., ABREU L., MANSO P.P., NASCIMENTO A., PELAJO-MACHADO M., LENZI H., MASUDA A., DA SILVA VAZ JR. I. & LOGULLO C. 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology*. 138(3-4): 49-357. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.02.004.

CAMPOS, P. M., BAHIA, L. M., SZABÓ, M. P. J. KLAFKE, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. Primeira edição. São Paulo. Editorial MedVet. 192p. 2008.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z.E.; KARNAS, K.J. PENNINGTON, J.E.; WELLS, M.A. Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition*, v.21, p.23-46, 2001. doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.23.

CASTRO-JANER, E., MARTINS, J.R., MENDES, M.C., NAMINDOME, A., KLAFKE, G.M., SCHUMAKER, T.T. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Vet. Parasitol.* 2010, 173, 300–306. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.036.

CHERRY, L. M. Utilization of cholesterol by the cattle tick *Boophilus microplus*: cholesterol economy in the engorged female adult. *Insect Biochemistry*, v.6, p.587-594, 1976.

COHEN, E. Fat body. In: Resh, V.H.; Cardé, R.T. *Encyclopedia of Insects*. 2ed: London, Academic Press. 2009. 1024p.

CUTULLÉ, C.; JONSSON, N.N., SEDDON, J. Population structure of Australian isolates of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol. Vet.*, v.161, n.3-4, p.283- 291, 2009.

DA GLÓRIA, M. A.; FACCINI, J. L. H.; DAEMON, E.; GRISI, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *B. microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticida em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 2, n. 2, p. 79-84, 1993.

DAVIS, M-T. B. Critical temperature and changes in cuticular lipids in the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*. *Journal of Insect Physiology*, v. 20, p.1087 to 1100, 1974.

DEL PINO, J.C.; TRINDADE, V.M.T.; GUMA, F.; BERNARD, E.A. Biochemical studies of ovary glycoproteins of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry*, v.19, n.7, p.657-661, 1989.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; MATHIAS, M. I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Micron*, v. 39, n. 7, p. 875-83, 2008.

DEVANEY, E. Genetic and genomic approaches to understanding drug resistance in parasites. *Parasitology*, 2013, 140, 1451–1454.

DONG, X., AGARWAL, M., XIAO, Y., REN, Y., MAKER, G., & YU, X. (2022). Ozone Efficiency on Two Coleopteran Insect Pests and Its Effect on Quality and Germination of Barley. *Insects*, 13(4), 318. <https://doi.org/10.3390/insects13040318>

ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: BOWERS, W.S.; EBING, W.; MARTIN, D. (Eds.) *Chemistry of Plant Protection*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. v.6, p.67-68.

FIGUEIREDO, Thaylon Fernando Bonatti Figueiredo. Influência dos efeitos da aplicação da mistura gasosa oxigênio/ozônio nos aspectos morfofuncionais do aparelho reprodutivo de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) durante o período de pré-postura. 2015. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, Universidade Brasil, São Paulo – SP, 2015.

FIGUEIREDO, T. F. B., JOSÉ DE LIMA, C., FERNANDES, A. B., ZÂNGARO, R. A., MENDES, A. L. DA S., & MOREIRA, L. H. (2018). Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) Females During the Pre-Laying Period. *Ozone: Science & Engineering*, 18. Doi: 10.1080/01919512.2018.1533807

FONSECA, P. M. M., L. S. FEITOSA, A. B. FERNANDES, R. A. ZÂNGARO, W. MIYAKAWA, AND C. J. DE LIMA. 2015. "Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus Mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound." *Ozone: Science & Engineering* 37: 85–89. doi: 10.1080/01919512.2014.904740.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Conhecimento Básico para o Controle do Carrapato dos Bovinos. In: FURLONG, J. (Org.). *Carrapatos: Problemas e Soluções*. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, p. 9-20, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *Hora Veterinária*, v.159, p.1-7, 2007.

GARCIA, C.A.; FARIA, A.B.; ROSSI, D.A. Esterilização da microbiota bacteriana do idiossoma de *Boophilus microplus* pelo gás ozônio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 34., 2004 São Luis. Anais... São Luis: CD Media Ltda 2004. CD-ROM.

GAUDÊNCIO, Fabricio Nascimento. Efeito do fluazuron sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. 2016. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Seropédica – Rio de Janeiro, 2016.

GAUDÊNCIO, F.N., et al. Metabolic changes in *R. (B.) microplus* in response to fluazuron. *Braz. J. Vet. Parasitol.* v. 25, n. 1, jan.-mar. 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016006>

GAUSS, C. L. B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural*, v.32, 2002. 467-472p.

GOMES, ALBERTO, KOLLER, WILSON WERNER E BARROS, ANTONIO THADEU MEDEIROS DE. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciência Rural* [online]. 2011, v. 41, n. 8, pp. 1447-1452. doi.org/10.1590/S0103-84782011005000105

GONDIM, Katia C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, [s. l.], v. 101, p. 108–123, 2018.

GONZÁLES, J.C.; SILVA, N.R.; FRANCO, N. A vida livre do *Boophilus microplus*. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*. 3: 21-28, 1974.

GUIZZO, M.G.; ABREU, L.; MASUDA, A.; LOGULLO, C.; VAZ JUNIOR, I.S. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.40, n.1, p.1-12, 2012.

HOLMSTRUP M., SØRENSEN J.G., HECKMANN L.-H., SLOTSBO S., HANSEN P., HANSEN L.S. Effects of ozone on gene expression and lipid peroxidation in adults and larvae of the red flour beetle (*Tribolium castaneum*) *J. Stored Prod. Res.* 2011;47:378–384. doi: 10.1016/j.jspr.2011.07.002.

IWUALA, M.; UMEZURIKE, G.M.; NWADIOGBU, N. A qualitative study of the lipid components of eggs of *Boophilus decoloratus* KOCH (Ixodoidea Ixodidae). *Acarologia*, v.21, p. 3-4, 1979.

JONGEJAN, F., & UILENBERG, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 Suppl, S3–S14. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005967>
Kilby, B. A. (1963) The biochemistry of the insect fat body. In: J. W. L. Beament, J. E. Treherne & V. B. Wigglesworth (Eds.), *Advances in insect physiology*, pp. 111-174. Academic Press, New York.

- KLAFKE, G.M., CASTRO-JANER, E., MENDES, M.C., NAMINDOME, A., SCHUMAKER, T.T. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 2012, 184, 212–220.
- KLUCK, G. E.G., SILVA CARDOSO, L., DE CICCIO, N.N.T., LIMA, M.S., Folly, E., Atella, G.C., 2018. A new lipid carrier protein in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick. Dis.* 9, 850 – 859
- KONGSUWAN, K. et al. Activation of several key components of the epidermal differentiation pathway in cattle following infestation with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal of Parasitology*, 40 (4), 499-507, 2010.
- LE GALL, V. L., KLAFKE, G. M. & TORRES, T. T. (2018). Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Scientific Reports*, 8(1):1-10.
- LIPOVSEK, S.; NOVAK, T.; JANZEKOVIC, F.; PABST, M.A. Role of the fat body in the cave crickets *Troglophilus cavicola* and *Troglophilus neglectus* (Rhaphidophoridae, Saltatoria) during overwintering. *Arthropod Structure & Development*, v. 40,p. 54-63, 2011.
- LOVIS, L., MENDES, M.C., PERRET, J.L., MARTINS, J.R., BOUVIER, J., BETSCHART, B., SAGER, H. Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. *Vet. Parasitol.* 2013, 191, 323–331.
- MARCHESINI, P., LEMOS, A.S., BITENCOURT, R.B., FIOROTTI, J., ANGELO, I., FABRI, R.L., COSTA-JÚNIOR, L.M., LOPES, W.D., BITTENCOURT, V.R., & MONTEIRO, C.M. (2021). Assessment of lipid profile in fat body and eggs of *Rhipicephalus microplus* engorged females exposed to (E)-cinnamaldehyde and α -bisabolol, potential acaricide compounds. *Veterinary parasitology*, 300, DOI:10.1016/j.vetpar.2021.109596
- MARECHAL, E.; RIOU, M.I.; KERBOEUF, D.; BEUGNET, F.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P.M. Membrane lipidomics for the discovery of new antiparasitic drug targets. *Trends in Parasitology*, v.27, n.11, 2011.
- MENDES, T.M., BALBINO, J.N., SILVA, N.C.T., FARIAS, L.A.F. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*: uma revisão sobre as perspectivas, distribuição e resistência. *Pubmed* - v.13, n.6, a347, p.1-9, Jun., p.1-10, 2019.
- MENDES, M.C., DUARTE, F.C., MARTINS, J.R., KLAFKE, G.M., FIORINI, L.C., BARROS, A.T.M. Characterization of the pyrethroid resistance profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2013, 22, 379–384.

MITCHELL, R. D., SONENSHINE, D. E., & PÉREZ DE LEÓN, A. A. (2019). Vitellogenin Receptor as a Target for Tick Control: A Mini-Review. *Frontiers in Physiology*, 10. doi:10.3389/fphys.2019.00618.

MORAES, J.; GALINA, A.; ALVARENGA, P.H.; REZENDE, G.L.; MASUDA, A.; VAZ JR., I.S.; LOGULLO, C. Glucose metabolismo during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 146, p.528–533, 2007.

MOREIRA, L.H.M., FIGUEIREDO, T.F.B., ALVES, L.P., FERNANDES, A.B., ZÂNGARO, R.A., MENDES, A.L.S., GAUDÊNCIO, F.N. & LIMA, C.J.L. (2018). Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, *Ozone: Science & Engineering*, 40:3, 183-190, DOI: 10.1080/01919512.2017.1403306

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, v. 56, n. 1, 2003. 169-172 p.

NAGAYOSHI, M.; KITAMURA, C.; FUKUIZUMI, T. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J. Endod.* 30: 778-781, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5ª ed. Porto Alegre: W.H. Freeman, 2011. 1100 p.

OLIVEIRA, H. H., C. J. LIMA, A. B. FERNANDES, R. A. ZANGARO, AND L. H. MOREIRA. 2014. “Uso de óleo ozonizado no tratamento tópico de infestação por carrapato em cão - Relato de caso.” *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 36:405–08.

PASSOS, T. M., L. H. M. SILVA, L. M. MOREIRA, R. A. ZÂNGARO, R. S. SANTOS, F. B. FERNANDES, C. J. LIMA, AND A. B. FERNANDES. 2014. “Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the Elimination of *Giardia* Spp. Cysts from Wastewater.” *Ozone: Science & Engineering* 36: 138–43. doi: 10.1080/01919512.2013.864227.

PAVELA, Roman et al. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: A review. *Research in Veterinary Science*, [s. l.], v. 109, p. 1–9, 2016.

POLANCO-ECHEVERRY, D. N.; RÍOS-OSORIO, L.A. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, v.17(1), p.81-95, 2016.

PONTES, E.G.; LEITE, P.; MAJEROWICZ, D.; ATELLA, G.C.; GONDIM, K.C. Dynamics of lipid accumulation by the fat body of *Rhodnius prolixus*: The involvement of lipophorin binding sites. *Journal of Insect Physiology*, v.54, p.790–797, 2008.

PRICE, G. M. Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. *Biology Review*, Cambridge, v. 48, p. 333-375, 1973.

RECK, J., KLAFKE, G.M., WEBSTER, A., DALL'AGNOL, B., SCHEFFER, R., SOUZA, U.A., CORASSINI, V.B., VARGAS, R., DOS SANTOS, J.S., MARTINS, J.R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 2014, 201, 128–136.

ROE, R. Michael et al. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. In: SONENSHINE, Daniel E.; ROE, R. Michael (Eds.). *Biology of ticks*. Second ed. New York, USA: Oxford University Press, 2013. p. 416–448.

ROZADO, A. F., L. R. A. FARONI, W. M. I. URRUCHI, R. N. C. GUEDES, and J. P. PAES. 2008. "Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado." *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 12: 282–85. doi: 10.1590/S1415-43662008000300009.

SEN, C. K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine and science in sports and exercise* 33, 3, 368-370, 2001.

SZABO, M. P. J.; GARCIA, C. A.; SILVA, T. L.; OLEGÁRIO, M.M.M.; CAMPOS, V. A.; CASTRO, I. P. Efeito acaricida da mistura de oxigênio-ozônio sobre o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Not.*, 15 (2): 43-50.

SCHRODER, B., REILLY B. Seasonal variations in ixodid tick populations on a commercial game farm in the Limpopo province, South Africa. *Afr. Invert* 54:491-498. 2013.

SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONIA, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; VAZ JR., I.S. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.148, p.149– 156, 2012.

SILVA, T. F.; ALVES-SOBRINHO, A. V. .; LIMA, L. F. S. de; ZIEMNICZAK, H. M.; FERRAZ, H. T.; LOPES, D. T.; SILVA, V. L. D. da; BRAGA, Ísis A.; SATURNINO, K. C.; RAMOS, D. G. de S. Bovine parasite sadness: Review. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e15410111631, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i1.11631.

SILVEIRA, I. C. T. Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em *DAPHNIA SIMILIS*. 2004. Tese – Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental – Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVEIRA NETO, O.J.; TAVEIRA, R.Z.; AMARAL, A.D.; MARTINS, T.R.; OLIVEIRA, B.C. Avaliação da suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em bovinos leiteiros na região do Oeste Goiano, Brasil. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 11, n. 1, p 54-59, 2017.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal). Disponível em: www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8

SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M. Biology of ticks, volume: 1. 2ed. Oxford: Oxford University Press. 2013.560p.

SONENSHINE, D.E. The Biology of Ticks. 1. Ed. Oxford University Press, New York, USA, 1991.

STUART, J.A., GILLIS, T.E.; BALLANTYNE, J.S. Compositional correlates of metabolic depression in the mitochondrial membranes of estivating snails. American Journal of Physiology -Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v.44, n.6, p.1977-1982, 1998.

SUTHERST, R.W.; KERR, J.D.; MAYWALD, G.F.; STEGEMAN, D.A. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. J. Agric. Res., v.34, p.329-339, 1983.

TAYLOR, M. A. Parasitologia Veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro, 2017.

TORRES-SANTOS, P. T., FARIAS, I. F., PASSOS, G. DOS S., ALMEIDA, M. D., & HORTA, M. C. (2021). AVALIAÇÃO IN VITRO DA RESISTÊNCIA DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* A DIFERENTES CARRAPATICIDAS. *Veterinária E Zootecnia*, 28, 1–9. <https://doi.org/10.35172/rvz.2021.v28.550>

TRACHOOTHAM, D., LU, W., OGASAWARA, M. A., NILSA, R. D. e HUANG, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling* 10, 8, 1343-1374, 2008.

TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: LEHANE, MJ; BILLINGSLEY, PF (Eds.). *Biology of the Insect Midgut*. London: Chapman & Hall, 1996. p. 293–320.

Vasuki, V.; Rajavel, A. R. (1992). Influence of short time exposure to an insect growth regulator, Hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitoes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(2), 275-283.

VANCE, D.E.; VANCE, J.E. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed., Vance, D.E.; Vance, J.E. (Eds.), Elsevier Science B.V., 2002.

XAVIER, Mariana Amaral. *Metabolismo de lipídeos na reprodução de carrapatos*. 2019. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

XAVIER, M. A., TIRLONI, L., PINTO, A. F. M., DIEDRICH, J. K., YATES, J. R., GONZALES, S., ... TERMIGNONI, C. (2019). Tick gené's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.03.013

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN R. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, p. 264-72, 2006.

World Health Organization – WHO. (1998). Residues of some veterinary drugs in animals and foods (48-55). Rome.

ANEXOS

Anexo A. Fórmulas dos parâmetros biológicos índice de produção de ovos (BENNETT, 1974), índice de eficiência reprodutiva (MELÉNDEZ et al., 1998), índice nutricional (BENNETT, 1974) e eficiência reprodutiva e eficiência do acaricida (Drummond et al., 1971).

- 1) Índice de produção de ovos (IPO) (segundo BENNETT, 1974)

$$\text{IPO} = \frac{\text{PESO DA POSTURA} \times 100}{\text{PESO DA TELEÓGIA}}$$

- 2) Índice de eficiência reprodutiva (IER) (segundo MELÉNDEZ et al., 1998)

$$\text{IER} = \frac{\text{PESO DA POSTURA} \times \% \text{ DE ECLOSÃO}}{\text{PESO DA TELEÓGIA}}$$

- 3) Índice nutricional (IN) (segundo BENNETT, 1974)

$$\text{IN} = \frac{\text{PESO DA POSTURA} \times 100}{(\text{PESO DA TELEÓGINA} - \text{PESO DA QUENÓGENA})}$$

- 4) Eficiência reprodutiva e eficiência do acaricida (Drummond et al., 1971).

$$\text{ER} = \frac{\text{Peso da massa dos ovos} \times \% \text{ Eclosão} \times 20.000^*}{\text{Peso das Fêmeas}}$$

ER = Eficiência Reprodutiva

* = Número de larvas por 1 grama de ovos.

$$\text{EP} = \frac{\text{ER Controle} - \text{ER Produto} \times 100\%}{\text{ER Controle}}$$

EP = Eficiência do Produto