

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

RAPHAEL ANDRADE DE CASTRO

**OZONIZAÇÃO COMO TECNOLOGIA PARA O CONTROLE
DE CARRAPATOS.**

Ozone as technology for tick control.

TESE DE DOUTORADO

DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, maio/2023

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

RAPHAEL ANDRADE DE CASTRO

**OZONIZAÇÃO COMO TECNOLOGIA PARA O CONTROLE
DE CARRAPATOS**

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

São José dos Campos, maio/2023

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

RAPHAEL ANDRADE DE CASTRO

OZONIZAÇÃO COMO TECNOLOGIA PARA O CONTROLE DE CARRAPATOS

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
Doutorado em Engenharia Biomédica
Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Heloiza Helena de Oliveira Morelli Amaral
Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Gino Chaves da Rocha
Universidade de Brasília

Prof. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Osmar Pinto Neto
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Henrique Cunha Carvalho (Suplente)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Renato Amaro Zangaro (Suplente)
Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, maio/2023

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

RAPHAEL ANDRADE DE CASTRO

Médico Veterinário, Sanitarista, Professor e Coordenador de Curso de Medicina Veterinária. Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal) e Especialista em Saúde Pública e Gestão da Vigilância Sanitária. Servidor Público Municipal.

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM

Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C35o Castro, Raphael Andrade de
Ozonização como tecnologia para controle de carrapatos / Raphael Andrade de Castro – 2023.
106f.: 30 cm.

Orientador: Livia Helena Moreira da Silva Mélo.
Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2023.
Bibliografia: f. 99-106.

1. Engenharia Biomédica. 2. Tecnologias. 3. Ozônio. 4. Controle.
5. Carrapatos. I. Título.

CDD 610.28

Bibliotecária Iara Neves CRB 8/8799

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado ao meu pai Ernesto MOACIR Ribeiro de Castro (*in memoriam*), que se orgulhava de ter um filho “doutor”, muito antes de seu doutoramento.

AGRADECIMENTOS

À minha amada esposa, Maria Clara de Oliveira Valente, pela motivação, confiança, reconhecimento, torcida, compreensão quando estive ausente e por me auxiliar durante a execução de todos os protocolos experimentais, da coleta dos carrapatos às leituras até o final da experimentação. À minha orientadora, Professora Dra. Lívia Helena Moreira da Silva Mélo, pela paciência, compreensão, honestidade, ensinamentos e a substancial orientação que me permitiu chegar até aqui. Ao Centro Universitário de Barra Mansa, pela disponibilidade de equipamentos e flexibilidade para que pudesse cumprir os requisitos da pós-graduação. Aos meus alunos, pela compreensão durante minhas ausências quando assistia aulas presenciais da pós-graduação. Aos meus alunos, hoje médicos veterinários Geraldo Freitas e Ana Júlia, pela parceria na obtenção de muitos dos carrapatos utilizados neste trabalho. Aos amigos Fernando Habib, José Netto e Maycon Carvalho, pela cumplicidade nos estudos e todos os momentos de descontração que auxiliaram durante desafios vividos. A todo corpo docente, discente e administrativo da Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi, que proporcionaram ambiente acadêmico-científico para a obtenção de novos conhecimentos. Muito obrigado!

“Se depender de mim
Eu vou até o fim
Cada célula
Todo fio de cabelo
Falando assim
Parece exagero
Mas se depender de mim
Eu vou até fim”

(Até o Fim, *Humberto Gessinger*)

OZONIZAÇÃO COMO TECNOLOGIA PARA O CONTROLE DE CARRAPATOS

RESUMO

Carrapatos são artrópodes hematófagos parasitas de diversas espécies, incluindo seres humanos. Causam grandes prejuízos à produção animal, pelo custo do tratamento de doenças causadas por bioagentes por eles transmitidos. O tratamento dos animais infestados é frequentemente realizado com carrapaticidas sintéticos com potencial tóxico para os hospedeiros e para as pessoas que manipulam esses produtos, podendo atuar em organismos não-alvos, induzindo ao desenvolvimento de resistência. Como alternativa, o ozônio é uma molécula triatômica de oxigênio com grande propriedade oxidativa sobre compostos biológicos, sendo utilizado para controle de pragas de grão e frutas. Recentemente tem sido estudado seu efeito sobre carrapatos. Portanto, este trabalho objetivou caracterizar principalmente o efeito carrapaticida da mistura gasosa oxigênio+ozônio (O_3) em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Larvas e fêmeas adultas deste parasita foram expostas a diferentes doses da mistura oxigênio+ozônio. O óleo de girassol ozonizado e água de osmose reversa ozonizada foram testados em larvas desta mesma espécie. Já o óleo de girassol ozonizado foi testado *in vivo*, em condições naturais de parasitismo por carrapatos, em um bovino e um equino. Os resultados mostraram que o ozônio apresentou importantes efeitos para o controle do carrapato. O gás ozônio possui relação dose-dependente e demonstrou uma atividade acaricida imediata e tardia. Sobre parâmetros biológicos do carrapato foi capaz de reduzir o índice de eficiência reprodutiva, o nutricional e o de produção de ovos. A ozonização do óleo de girassol apresentou efeito carrapaticida sobre as larvas de *R. microplus*, e controlou o parasitismo no bovino e no equino avaliados. Assim, terapias com ozônio podem tornar-se alternativas terapêuticas importantes para o controle de carrapatos.

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

OZONE AS TECHNOLOGY FOR TICK CONTROL

ABSTRACT

Ticks are hematophagous parasitic arthropods that infect several species, including humans. They cause great economic loss due to the costs to treat diseases caused by the transmission of pathogenic agents. Acaricides made from synthetic compounds have been widely used against ticks. However, they have high toxicity to animal and human health. Besides, they can affect non-target organisms and allow development of resistance to acaricides. Ozone gas (O₃) is a triatomic molecule of oxygen that has shown potent oxidizing activity on biological compounds. It is used as an acaricide alternative to control pests of grains and fruits and recently its use against ticks is studied. The aim of the present study was to assess mainly the oxygen+ozone gas mixture acaricidal effect on *R. microplus* ticks. Larvae and adult females of *R. microplus* were exposed to different doses of oxygen+ozone gas mixture. Ozonized sunflower oil and ozonized reverse osmosis waters acaricidal activity were also tested on *R. microplus* larvae. Ozonized sunflower oil was tested *in vivo* on natural conditions of tick parasitism in a bovine and a horse. Ozone had important effects to control *R. microplus* tick. Ozone had a dose-dependent acaricidal effect with acaricidal activity in different moments after exposure and effect on *R. microplus* biological parameters. Ozone reduced its reproductive, nutritional and egg production indexes. Ozonized sunflower oil had an acaricidal effect on *R. microplus* larvae and controlled its parasitism on the bovine and the horse assessed. Thus, ozone therapies may become important therapeutic alternatives for tick control.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO GERAL	22
2.1 Objetivos Específicos.....	22
2.2 Justificativa	22
2.3 Hipótese.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA	24
3.2 Geração da Mistura Gasosa Oxigênio+Ozônio.....	24
3.3 Preparo das Soluções.....	24
3.3.1 Ozonização do Óleo de Girassol e Água de Osmose Reversa.....	24
3.3.2 Solução Carrapaticida Sintética Comercial	25
3.4 Protocolo Experimental in vitro	26
3.4.1 Ensaios em Fêmeas Adultas Ingurgitadas de Carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	26
3.4.1.1 Obtenção e Preparo	26
3.4.1.2 Grupos Experimentais	27
3.4.1.3 Procedimento Experimental.....	28
3.4.1.4 Rotina dos Ensaios.....	30
3.4.1.5 Avaliações Realizadas.....	31
3.4.1.5.1 Avaliação do Efeito Carrapaticida in vitro da Mistura Gasosa Oxigênio+Ozônio.....	31
3.4.1.5.2 Avaliações de Parâmetros Biológicos.....	32
3.4.2 Ensaios em Larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	33
3.4.2.1 Obtenção e Preparo	33
3.4.2.2 Grupos Experimentais	34
3.4.2.2.1 Para Exposição aos Gases Oxigênio e Oxigênio+Ozônio.....	34
3.4.2.2.2 Para Exposição ao Óleo Girassol ou Água de Osmose Reversa Ozonizada	35
3.4.2.3 Procedimentos Experimentais	37
3.4.2.3.1 Exposição aos Gases Oxigênio e Oxigênio+Ozônio	37
3.4.2.3.2 Exposição ao Óleo de Girassol e à Água de Osmose Reversa.....	38
3.4.2.4 Avaliações Pós-Exposição.....	39
3.4.2.4.1 Pós-Exposição aos Gases Oxigênio e Oxigênio+Ozônio	39

3.4.2.4.2 Pós-Exposição ao Óleo de Girassol e a Água de Osmose Reversa Ozonizados	40
3.4.2.5 Parâmetro Avaliado	42
3.5 Protocolo Experimental in vivo	42
3.5.1 Preparo, Armazenamento e Transporte do Óleo de Girassol Ozonizado ..	43
3.5.2 Ensaio Realizado em Bovino	44
3.5.2.1 Caracterização do Animal.....	44
3.5.2.2 Aplicação Tópica do Óleo de Girassol Ozonizado.....	45
3.5.2.3 Avaliações no Bovino Tratado	46
3.5.3 Ensaio Realizado em Equino	47
3.5.3.1 Caracterização do Animal.....	47
3.5.3.2 Aplicação Tópica do Óleo de Girassol Ozonizado.....	48
3.5.3.3 Avaliações no Equino Tratado	49
3.6 Análises Estatísticas	49
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Efeitos acaricidas da mistura gasosa de O_2+O_3 sobre fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	51
4.2 Efeitos acaricidas da mistura gasosa de O_2+O_3 sobre parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	56
4.3 Efeito acaricida da mistura gasosa de O_2+O_3 sobre larvas de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	63
4.4 Efeito acaricida do óleo de girassol ozonizado e da água de osmose reversa ozonizada sobre larvas de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	64
4.5 Efeito do Óleo de Girassol Ozonizado sobre Bovino Parasitado	66
4.6 Efeito do Óleo de Girassol Ozonizado sobre Equino Parasitado	71
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ozonização do óleo de girassol por coluna de borbulhamento. Circuito composto por um gerador de ozônio acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal que se conecta ao difusor de aço inoxidável, posicionado ao centro no fundo do recipiente de vidro, por uma mangueira de silicone. 25
- Figura 2 - Preparo e seleção das teleóginas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*..... 27
- Figura 3 - Esquema do circuito utilizado para a técnica de ozonização de carrapatos. Gerador de ozônio acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal, com capacidade de três litros portando válvula reguladora de pressão e fluxômetro, na entrada do equipamento, e saída da mistura gasosa oxigênio+ozônio para recipiente plástico acoplado a um dispositivo catalisador para dissolução e eliminação dos gases. 29
- Figura 4 - Recipiente organizador, contendo quinze divisórias, utilizado para a alocação e acompanhamento das teleóginas após a exposição à mistura gasosa oxigênio+ozônio. Legenda: Notar a presença de alocação individual das teleóginas por divisória e a identificação de cada um dos compartimentos: a letra se refere ao recipiente organizador e a numeração à posição do espécime no recipiente. Registro realizado durante a avaliação após a exposição. 30
- Figura 5 - Espátulas adaptadas após remoção do bisel e achatamento da extremidade remanescente das agulhas. Com canhão verde, agulha 25x0,8 mm e com canhão âmbar, agulha 13x0,45 mm. 31
- Figura 6 - Incubação e desenvolvimento de larvas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*..... 34
- Figura 7 - Esquema do Processo Experimental para Exposição ao Óleo Girassol (OG) ou Água de Osmose Reversa (OR) Ozonizada com o número amostral de cada grupo 37
- Figura 8 – Manipulação e acondicionamento das larvas de carrapatos em tubetes de plástico. 38
- Figura 9 - Tubetes de plástico contendo larvas imersas em soluções ozonizados. 39
- Figura 10 - Segmento de folha de papel sulfite utilizada para o acompanhamento das condições das larvas em vivas (★) ou mortas (†). Neste registro, 32 larvas (15=★ e 17=†) já haviam sido transferidas do recipiente. Nota-se a diferença no padrão de organização das larvas na divisão estabelecida: à esquerda as larvas espalhadas devido sua constante movimentação; à direita padrão uniforme de organização devido à ausência de movimentação. Registro feito durante a avaliação após a exposição. 40
- Figura 11 – Sequência do processo de imersão para avaliação do efeito acaricida das soluções testadas em larvas de carrapatos..... 41

Figura 12 – Recorte de segmento do lenço de papel utilizado durante as avaliações das larvas após imersão nas soluções. Seta vermelha destaca o desalinhamento de larvas devido sua locomoção, confirmando-as como vivas e não mortas, como as demais presentes na linha de dobra do lenço.....	42
Figura 13 - Parasitismo por carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em bovino pertencente à propriedade rural no município de Barra Mansa (RJ).	44
Figura 14 – Organograma com datas que demarcam as atividades de tratamento tópico com óleo ozonizado em bovino, bem como os momentos de avaliações realizadas.....	45
Figura 15 – Primeira aplicação com óleo de girassol ozonizado.....	46
Figura 16 - Parasitismo por carrapatos <i>Amblyomma</i> spp. e <i>Dermacentor nitens</i> em equino pertencente à propriedade rural no município de Barra Mansa (RJ).	47
Figura 17 - Organograma com datas que demarcam as atividades de tratamento tópico com óleo ozonizado em equino, bem como o intervalo e frequência de avaliações realizadas.	48
Figura 18 - Equino tratado com óleo de girassol ozonizado.....	48
Figura 19 - Curva dose resposta obtida para Os Efeitos Acaricidas Imediatos e Tardios.	53
Figura 20 -Evolução do efeito acaricida percentual (%) após exposição de fêmeas ingurgitadas à mistura gasosa oxigênio+ozônio em todos os tempos de exposição (e dose) utilizados para avaliação de efeitos imediatos e tardios.....	55
Figura 21 – Comparativo da média \pm erro padrão entre grupos em diferentes parâmetros biológicos relacionados ao peso (g).	57
Figura 22 Evolução do efeito acaricida percentual (%) após exposição de fêmeas ingurgitadas à mistura gasosa oxigênio+ozônio em baixos tempos de exposição (e subdoses) para avaliação dos efeitos sobre parâmetros biológicos.	58
Figura 23 – Comparativo da média \pm erro padrão dos Índices de Eficiência Reprodutiva (IER), Índice Nutricional (IN) e Índice de produção de Ovos (IPO) de cada grupo experimental.	59
Figura 24 - Evolução do percentual (%) de ovipostura das fêmeas ingurgitadas expostas à mistura oxigênio+ozônio utilizando baixos tempos (e subdoses) para avaliação de efeitos sobre seus parâmetros biológicos.	60
Figura 25 - Comparativo da média \pm erro padrão entre grupos avaliados no Período de Pré-postura e no Período de Postura.	61
Figura 26 - Comparativo do percentual médio \pm erro padrão dos grupos relacionados ao Período de Incubação e ao Percentual de Eclodibilidade.	62

Figura 27 – Evolução da Razão de Oviposição de cada tempo experimental de fêmeas ingurgitadas expostas à subdoses da mistura gasosa oxigênio+ozônio 62

Figura 28 – Curva dose resposta do efeito acaricida imediato observado em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 63

Figura 29 – Comparativo do percentual de efeito acaricida (%) após imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, por diferentes tempos, em óleo de girassol ozonizado por duas (OGO_{3.2h}) ou quatro (OGO_{3.4h}) horas, comparado à imersão em óleo de girassol não ozonizado (OGP) e duas soluções carrapaticidas sintéticas (Deltametrina e Amitraz 12,5%)..... 64

Figura 30 – Efeito acaricida (%) da imersão de larvas de *R. microplus* por diferentes tempos em água de osmose reversa ozonizada por duas horas, comparado à imersão em água de osmose reversa não ozonizada e duas soluções carrapaticidas sintéticas. 65

Figura 31 – Registros das principais datas de acompanhamento do parasitismo em região pélvica do bovino: vista do úbere e faces posterior e interna dos membros caudais. 69

Figura 32 – Registros das principais datas de acompanhamento do parasitismo no membro posterior direito do bovino: vista lateral. 70

Figura 33 – Registros das principais datas de acompanhamento do parasitismo na região do peito, pescoço e barbela antes e após duas semanas do primeiro tratamento tópico com óleo de girassol ozonizado..... 70

Figura 34 – Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo na cabeça do equino tratado com óleo ozonizado: vista frontal. 76

Figura 35 - Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo no pescoço do equino tratado com óleo ozonizado: vista lateral esquerda..... 76

Figura 36 - Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo no pescoço do equino tratado com óleo ozonizado: vista lateral direita..... 77

Figura 37 - Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo perianal do equino tratado com óleo ozonizado: vista caudal. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos grupos amostrais por sessão experimental e relação do número amostral.....	28
Tabela 2 - Descrição dos grupos amostrais formados por larvas expostas ao oxigênio+ozônio, e relação do número amostral.	35
Tabela 3 - Descrição dos grupos amostrais formados por larvas expostas ao óleo de girassol ou água de osmose reversa, e relação do número amostral.	36
Tabela 4 – Relação entre o peso médio da amostra \pm desvio padrão e o número amostral de cada grupo em cada sessão experimental.	52
Tabela 5 - – Distribuição percentual e temporal (h) do Efeito Acaricida Imediato da mistura oxigênio+ozônio após diferentes tempos de exposição (dose).	53
Tabela 6 - Distribuição percentual e temporal (h) do Efeito Acaricida Tardio da mistura oxigênio+ozônio após diferentes tempos de exposição (dose).	53
Tabela 7 - Distribuição percentual do Efeito Acaricida por Subdoses da mistura oxigênio+ozônio obtidos após curtos tempos de exposição (subdoses).	56
Tabela 8 - Distribuição percentual do efeito acaricida da mistura oxigênio+ozônio sobre larvas de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> após diferentes tempos de exposição (dose).	63
Tabela 9 - Efeitos acaricidas do óleo de girassol ozonizado sobre larvas de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> distribuídas em diferentes grupos experimentais.	65
Tabela 10 - Comparativo dos efeitos acaricidas do óleo de girassol ozonizado entre os grupos experimentais.	66
Tabela 11 – Relatório síntese contendo o grau de parasitismo a cada avaliação seguido de breve descrição das constatações identificadas durante o acompanhamento do bovino parasitado por <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e tratado com óleo de girassol ozonizado.	67
Tabela 12 - Relatório síntese contendo o grau de parasitismo a cada data de avaliação seguido de breve descrição das constatações identificadas durante o acompanhamento do equino parasitado por <i>Amblyomma</i> spp. e <i>Dermacentor nitens</i> e tratado com óleo de girassol ozonizado.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
★	Vivo
†	Morto
®	Marca Registrada
° C	Graus Celsius
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
d	Dias
DL ₅₀	Dose letal capaz de eliminar 50% da população exposta.
DL ₉₅	Dose letal capaz de eliminar 95% da população exposta.
g	Gramas
h	Horas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IER	Índice de Eficiência Reprodutiva
IMEA	Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária
IN	Índice Nutricional
IPO	Índice de Produção de Ovos
L	Litro
L/min	Litro dividido 1 minuto
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MG	Minas Gerais
mg/L	Miligrama dividido 1 litro
mg/L.min	Miligrama dividido por 1 litro vezes 1 minuto
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número da amostra
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
pH	Potencial Hidrogênico
PIB	Produto Interno Bruto
R\$	Real
R ²	Coeficiente de determinação
RJ	Rio de Janeiro
RO	Razão de Oviposição
sem	Semana
US\$	Dólar Americano
USP	Universidade de São Paulo
µm	Micrômetro
µL/mL	Microlitro dividido por 1 mililitro

1. INTRODUÇÃO

Segundo os dados da Pesquisa da Pecuária Municipal realizada em 2021 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil registrou um rebanho bovino com 224.602.112 cabeças de gado. Destes, 15.944.584 milhões eram vacas em lactação, responsáveis pela produção 35.305.047 litros de leite que corresponderam à geração de 68.173.032,00 reais (IBGE, 2023).

O Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/USP), em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), em 2021 o Produto Interno Bruto (PIB) referente ao Setor da Agropecuária representou 27,4% do PIB brasileiro (CNA; CEPEA, 2022). Todos os seus segmentos experimentaram alta em relação ao ano anterior, inclusive o ramo da pecuária com 5,79%, representado 25,4% de todo PIB do agronegócio, correspondendo a aproximadamente 7% de todo o PIB nacional no ano.

Os dados acima demonstram a importância e a relevância da bovinocultura leiteira, ou de corte, na geração de emprego e renda no Brasil, com importante contribuição para a economia nacional. Por outro lado, a bovinocultura vem sendo desafiada mundialmente, seja na perspectiva econômica da produção e geração de emprego e renda, seja na perspectiva da saúde e do bem-estar animal. Dentre os desafios, o parasitismo por carrapatos merece destaque neste segmento. Estima-se que os prejuízos causados pelo parasitismo por carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alcancem um montante financeiro entre US\$ 13,9 e 18,7 bilhões de dólares ao ano, em todo o mundo (BETANCOURT, 2017). Em um apontamento recente, a realidade deste parasitismo na Uganda revela uma perda anual agregada de US\$ 1,1 bilhões de dólares, tanto por prejuízos diretos quanto indiretos (KASAIJA et al, 2021). Sobre a bovinocultura brasileira, este prejuízo já foi estimado em 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al. 2014). Somente em 2022, o controle parasitário foi responsável por um prejuízo de R\$ 2,64 a cada arroba do boi comercializado no estado do Mato Grosso (IMEA, 2023).

Esta espécie artrópode é parasita preferencialmente de bovinos (RECK et al., 2014) e é considerada o ectoparasito mais disseminado do mundo (JONSSON, 2006). Devido a essa ampla distribuição, estima-se afetar em torno de 80% da população mundial de bovinos (HURTADO; GIRALDO-RIOS, 2018), causando diretamente prejuízos econômicos relacionados à perda de peso, baixa

conversão alimentar, depreciação da qualidade do couro, gastos com a utilização de carrapaticidas e profissionais para o tratamento (GRISI *et al.*, 2014). Os prejuízos indiretos estão relacionados à transmissão de parasitos do sangue (hematozoários), como os responsáveis pela Tristeza Parasitária Bovina, e contaminação de ambientes com o uso indiscriminado de carrapaticidas (HURTADO; GIRALDO-RIOS, 2018; GUERREIRO *et al.*, 2014).

O controle do parasitismo por carrapatos é predominantemente realizado com o uso de carrapaticidas sintéticos, que, paradoxalmente, apesar de seu efeito carrapaticida, permitem a seleção de populações cada vez mais resistentes (RECK *et al.*, 2014). Como se não bastasse, por apresentarem propriedades não-específicas, seus efeitos também provocam danos em organismos não-alvos, gerando impacto ambiental (HURTADO; GIRALDO-RIOS, 2018; FURTADO *et al.*, 2013).

A busca por melhores estratégias para o controle deste parasito é antiga e desafiadora, motivo pelo qual Oliveira e Pedrassani (2017) apontaram para a necessidade de se encontrar nova alternativa que não apresente mecanismo de resistência para o controle do *R. microplus*. Outro apontamento desses autores refere que a nova alternativa deva, preferencialmente, gerar menores riscos à saúde humana e ambiental, além de minimizar as perdas dos produtores de bovinos.

Uma das possíveis potenciais alternativas para o controle do parasitismo por carrapatos é o desenvolvimento de estratégias envolvendo a utilização do gás ozônio (O_3), que já se destaca como potencial método de controle por não induzir a resistência nos microrganismos, não deixar resíduos no meio ambiente e atuar como potente agente antimicrobiano (PASSOS *et al.* 2014; FONSECA *et al.* 2015).

O O_3 é encontrado na estratosfera e se forma quando a molécula de oxigênio (O_2) se rompe e seus átomos separados combinam individualmente com outra molécula de O_2 (KIRCHHOFF, 1995; BATAKLIEV *et al.* 2014). Esse processo pode ser realizado naturalmente, a partir de uma descarga elétrica em uma tempestade ou pela radiação ultravioleta, situada entre o comprimento de onda de 180 a 200 nanômetros, emitida pelo sol (NOGALES *et al.* 2008; BATAKLIEV *et al.* 2014). Industrialmente, sua geração é obtida utilizando geradores em um Sistema Ultravioleta de Produção, Sistema de Descargas

Elétricas (BOCCI, 2006), e pelo Sistema de Produção por Plasma Frio (ARAUJO, 2006; NOGALES *et al.* 2008).

Diversos pesquisadores já demonstraram a utilização do ozônio para o controle de artrópodes considerados pragas em grãos e frutas (ROSADO *et al.* 2008; BONJOUR *et al.* 2011; SOUSA *et al.* 2012; HUSAIN *et al.* 2015; OSMAN, 2015). A utilização do ozônio para combater infestações por carrapatos também vem sendo gradualmente explorada.

Em 2004, Garcia e colaboradores observaram 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*. Em outro protocolo, a mistura de oxigênio e ozônio sobre carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (o carrapato do cão) foi estudada por Szabó e seus colaboradores, em 2009, não tendo sido identificando qualquer efeito acaricida na dose praticada. Diferentemente desses resultados, em um relato de caso utilizando óleo de girassol ozonizado para tratamento tópico de um cão infestado por carrapatos dessa mesma espécie, Oliveira e seus colaboradores (2014), observaram efeito acaricida com a ausência do parasitismo e recuperação das lesões de pele após a aplicação da solução.

O efeito acaricida do ozônio, demonstrado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi novamente observado em *R. sanguineus* ao identificar ação oxidativa na cutícula e no espiráculo respiratório (MOREIRA *et al.* 2017). Nesse trabalho, os autores informaram que novos estudos seriam conduzidos para avaliar os efeitos morfológicos, bem como seu mecanismo de ação.

A influência dos efeitos da aplicação da mistura gasosa oxigênio+ozônio sobre os aspectos morfofuncionais do aparelho reprodutivo de teleóginas de *R. microplus*, durante o período de pré-postura, também foram estudadas (FIGUEIREDO, 2015). Este autor identificou as dosagens acaricidas da mistura e, apesar dos aspectos morfofuncionais do sistema reprodutor terem obedecido aos padrões biológicos encontrados na literatura, as variações morfológicas apresentadas indicaram a necessidade da realização de novos estudos. O estudo de Moreira e seus colaboradores (2017), identificou a atividade oxidante do ozônio sobre a cutícula do idiossoma de carrapatos da espécie *R. microplus* utilizando MEV, observação também relatada por FIGUEIREDO *et al.* (2018).

Recentemente, dois estudos utilizando um protocolo de exposição com água ozonizada (Abreu et al 2020; Abreu, *et al.* 2021) identificaram efeitos tóxicos em carrapatos do cão. Ambos os estudos utilizaram técnicas histológicas e de microscopia óptica convencional. O primeiro objetivou a avaliação do tegumento do idiossoma, e o segundo as alterações morfofisiológicas de glândulas salivares.

O conjunto de estudos existentes reforçam o potencial da atividade carrapaticida da utilização do ozônio em diferentes metodologias. Todavia, essa diversidade de protocolos não fornece dados suficientes para a caracterização das doses acaricidas a serem utilizadas, tampouco demonstram os efeitos tardios ao longo do desenvolvimento do ciclo biológico do carrapato ou a sua influência sobre a constituição bioquímica molecular presente em sua hemolinfa.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito acaricida *in vitro* de diferentes métodos utilizando o ozônio (com oxigênio, com óleo de girassol ou com água de osmose reversa) em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nas fases de larva e de teleóginas ingurgitadas.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar as dosagens *in vitro* necessárias para obtenção de efeito acaricida da mistura gasosa oxigênio-ozônio em larvas e teleóginas de *R. microplus*.
- Determinar as dosagens *in vitro* necessárias para o controle biológico através da mistura gasosa oxigênio-ozônio em teleóginas de *R. microplus*.
- Avaliar parâmetros biológicos *in vitro* em teleóginas de *R. microplus* expostas à mistura gasosa oxigênio-ozônio.
- Avaliar os efeitos *in vitro* da água de osmose reversa, ozonizada e não ozonizada, em larvas de *R. microplus*.
- Comparar o efeito carrapaticida *in vitro* da exposição de larvas de *R. microplus* à mistura gasosa oxigênio+ozônio ao óleo de girassol ozonizado e não ozonizado.
- Comparar os efeitos *in vitro* do óleo de girassol ozonizado com carrapaticida sintético convencional em larvas de *R. microplus*.
- Avaliar o efeito *in vivo* da aplicação tópica do óleo de girassol ozonizado em bovino e equino parasitados naturalmente por carrapatos.

2.2 Justificativa

A utilização de carrapaticidas sintéticos tem sido historicamente a estratégia mais eficiente no controle do parasitismo por carrapatos em rebanhos bovinos. Contudo, o desenvolvimento de resistência parasitária, o impacto sobre organismos não-alvos e seu potencial efeitos tóxico para os animais e seres humanos têm impulsionado a busca por estratégias mais seguras, sustentáveis e que não permitam o desenvolvimento de resistência.

2.3 Hipótese

Fluidos ozonizados podem apresentar atividade acaricida em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo possível existir uma relação dose-resposta em diferentes fluidos em estágios diferentes do ciclo biológico do parasita.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

O protocolo experimental foi submetido e aprovado (CEUA: 04003/2019) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Anhembi Morumbi.

3.2 Geração da Mistura Gasosa Oxigênio+Ozônio

O gerador de ozônio, utilizado para a obtenção da mistura gasosa oxigênio+ozônio, para o preparo das soluções de óleo de girassol e da água de osmose reversa ozonizados, foi da marca Ozone & Life (São José dos Campos/SP, Brasil), modelo O & L 1.5M, com regulagem da concentração calibrada em 71 mg/L, acoplado a um cilindro de oxigênio medicinal de 3 L utilizando a vazão de 1/8 L/min.

3.3 Preparo das Soluções

Foram utilizadas e preparadas diferentes soluções para exposição aos carrapatos:

- Óleo de girassol;
- Óleo de girassol ozonizado;
- Água de osmose reversa;
- Água de osmose reversa ozonizada;
- Solução carrapaticida com amitraz 12,5%
- Solução carrapaticida com deltametrina

3.3.1 Ozonização do Óleo de Girassol e Água de Osmose Reversa

Utilizou-se óleo de girassol comercial, destinado a culinária, embalado em recipiente de 900 mL. Para a ozonização, o óleo foi acondicionado em um recipiente de vidro cilíndrico e transparente, medindo 12x40 cm, onde, por um difusor de gás em aço inoxidável (conexão de ¼ e porosidade de 0,5 micrômetros), posicionada centralmente no fundo do recipiente e conectado ao gerador de ozônio através de uma mangueira de silicone (4x8 mm), ocorria a

difusão da mistura gasosa oxigênio+ozônio (Figura 1), caracterizando uma coluna de borbulhamento.

A ozonização da água de osmose reversa ocorreu de modo semelhante à coluna de borbulhamento descrita anteriormente, se diferenciando, apenas pelo recipiente utilizado para o seu acondicionamento, uma proveta de vidro com capacidade para 1.000 mL.

Ao final do processo de ozonização, o óleo preparado foi acondicionado em frascos de vidro de cor âmbar ou verde escuro (azeite), com volume de 500 mL e imediatamente armazenado em freezer à uma temperatura inferior a -10°C . A água de osmose reversa ozonizada foi acondicionada em garrafas pet (polietileno tereftalato) higienizadas de 1.000 mL, com imediata armazenagem sob temperatura de refrigeração entre 2°C e 8°C .

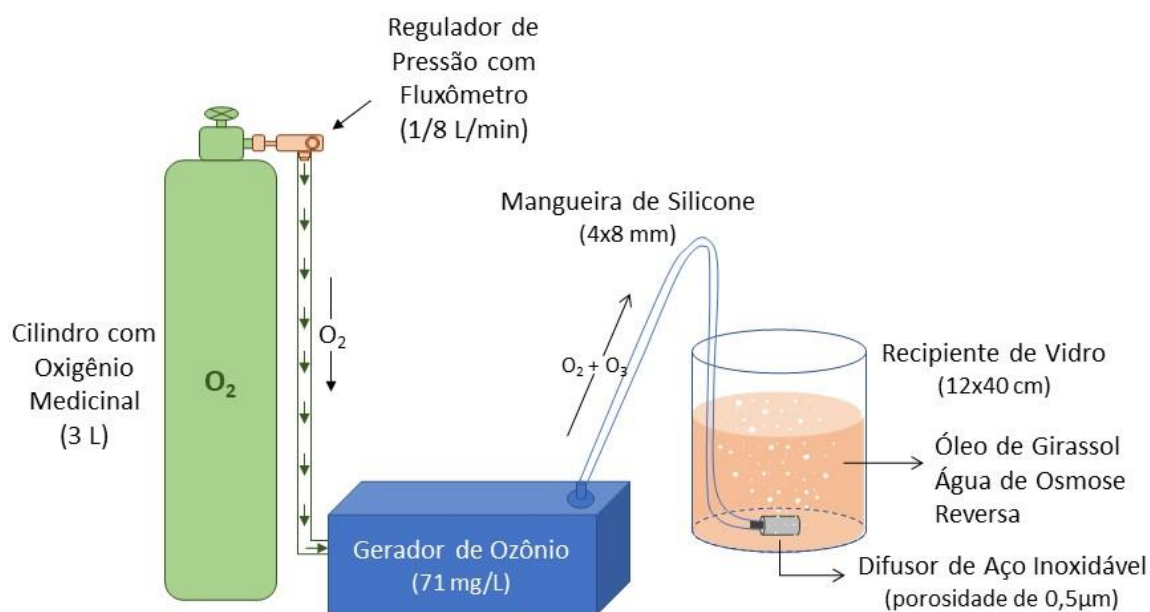


Figura 1 - Ozonização do óleo de girassol por coluna de borbulhamento. Circuito composto por um gerador de ozônio acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal que se conecta ao difusor de aço inoxidável, posicionado ao centro no fundo do recipiente de vidro, por uma mangueira de silicone.

3.3.2 Solução Carrapaticida Sintética Comercial

Soluções carrapaticidas sintéticas foram utilizadas em grupos controles e foram preparadas seguindo o recomendado na bula de seus fabricantes. Utilizou-se dois produtos comerciais cujo as bases foram o amitraz (Amitraz 12,5%

Indubraz[®], Contagem/MG, Brasil) e a deltametrina (Butox[®] P CE 25, Cruzeiro/SP, Brasil).

Para o preparo da solução com amitraz, 0,2 mL do produto carrapaticida foi retirado diretamente de seu frasco comercial com o auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL, seguido de sua diluição em 100 mL de água, previamente medida com auxílio de uma proveta de 100 mL, e acondicionada em frasco pet de capacidade para 200 mL. O preparo da solução de deltametrina ocorreu de forma muito semelhante, se diferenciando pela diluição de 0,1 mL do produto comercial. Após cada preparo, os frascos foram identificados, mantidos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar direta para posterior utilização.

3.4 Protocolo Experimental *in vitro*

3.4.1 Ensaios em Fêmeas Adultas Ingurgitadas de Carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

3.4.1.1 Obtenção e Preparo

Fêmeas ingurgitadas (teleóginas) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram colhidas manualmente diretamente sobre bovinos leiteiros mestiços, parasitados naturalmente, pertencentes às propriedades rurais dos municípios de Andrelândia (MG) e Barra Mansa (RJ), colhidos entre os meses de março e junho de 2020.

Após a colheita, todas as teleóginas foram lavadas (Figura 3A) e higienizadas em água corrente e sabão neutro (Figura 3B) e, em seguida, secas naturalmente sobre papel toalha (Figuras 3C e 3D). Foram selecionadas (n=444) (Figura 3E) as fêmeas que se encontravam híginas, sem deformações ou mutilações. Todas mantidas à temperatura e umidade ambiente, e fotoperíodo natural (Figura 3F).



Figura 2 - Preparo e seleção das teleóginas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Legenda: (A) Lavagem utilizando água e sabão neutro; (B) Higienização em água corrente; (C) Início da secagem natural em papel toalha; (D) Secagem em papel toalha finalizado; (E) Seleção dos carrapatos para o estabelecimento de grupos experimentais; (F) Grupos experimentais em processo de estabelecimento.

3.4.1.2 Grupos Experimentais

Após a seleção, as teleóginas (n=444) foram aleatoriamente divididas em grupos experimentais contendo entre 20 e 23 espécimes. Grupos controles, sem exposição aos gases e com exposição somente ao gás oxigênio medicinal, também foram estabelecidos. As divisões entre os grupos ocorreram conforme seu tempo de exposição aos gases e segundo sua sessão experimental de acordo como apresentado na tabela 1:

Tabela 1 – Descrição dos grupos amostrais por sessão experimental e relação do número amostral.

		Grupos Experimentais	Amostragem (n)	Descrição
Efeito Acaricida Dose-resposta		GO ₃ 105'	20	Exposto ao O ₃ por 105 min
		GO ₃ 85'	20	Exposto ao O ₃ por 85 min
		GO ₃ 83'	23	Exposto ao O ₃ por 83 min
		GO ₃ 80'	21	Exposto ao O ₃ por 80 min
		GO ₃ 75'	20	Exposto ao O ₃ por 75 min
		GO ₃ 60'	20	Exposto ao O ₃ por 60 min
		GO ₃ 45'	20	Exposto ao O ₃ por 45 min
		GO ₃ 30'	20	Exposto ao O ₃ por 30 min
		GO ₃ 25'	20	Exposto ao O ₃ por 25 min
		GO ₃ 20'	20	Exposto ao O ₃ por 20 min
		GO ₃ 15'	20	Exposto ao O ₃ por 15 min
		GO ₃ 10'	20	Exposto ao O ₃ por 10 min
		GO ₃ 05'	20	Exposto ao O ₃ por 05 min
		GO ₂ 15'	20	Exposto ao O ₂ por 15 min
		GC	40	Exposto ao ambiente
	Total	324		
		Grupos Experimentais	Amostragem (n)	Descrição
Efeito nos Parâmetros Biológicos		GO ₃ 04'	20	Exposto ao O ₃ por 04 min
		GO ₃ 03'	20	Exposto ao O ₃ por 03 min
		GO ₃ 02'	20	Exposto ao O ₃ por 02 min
		GO ₃ 01'	20	Exposto ao O ₃ por 01 min
		GO ₂ 04'	20	Exposto ao O ₂ por 04 min
		GC	20	Exposto ao ambiente
		Total	120	
		Total Geral	444	

3.4.1.3 Procedimento Experimental

Para a realização das sessões, cada grupo exposto à mistura gasosa O₂+O₃ e O₂ foram colocados em um recipiente cilíndrico de plástico (polipropileno + anel de silicone para vedação da tampa), com 12 cm de diâmetro e 06 cm de altura, com tampa hermética e volume aproximado de 680 mL. A entrada dos gases se deu por um conector de aço inoxidável adaptado e instalado no ponto central da tampa; a saída dos gases ocorreu por outro a conector, idêntico ao primeiro, instalada na parte mais distal do recipiente, conforme o esquema da figura 3. A exposição do GCO₂ se deu no mesmo circuito, porém, com o gerador

de ozônio mantido desligado, permitindo a passagem somente do oxigênio medicinal.

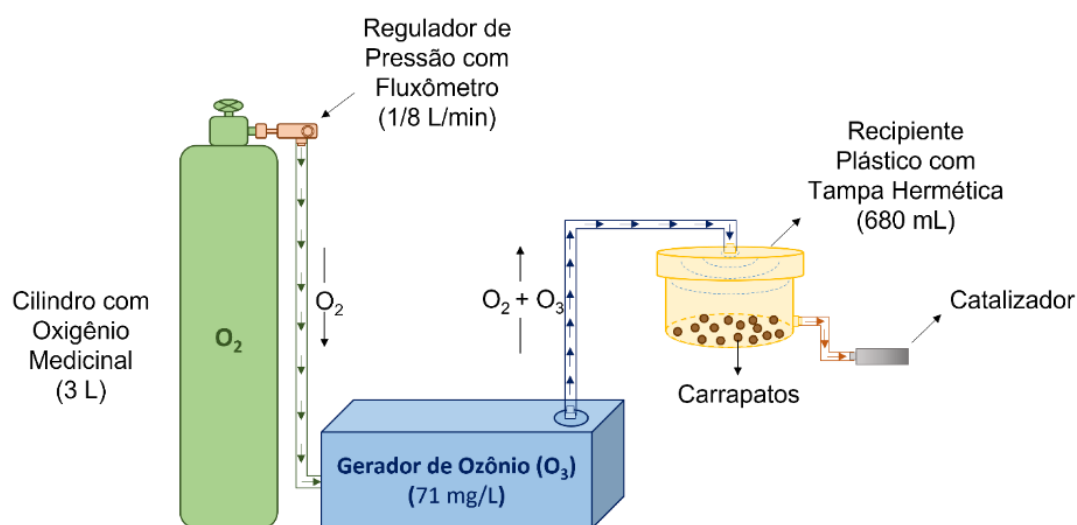


Figura 3 - Esquema do circuito utilizado para a técnica de ozonização de carrapatos. Gerador de ozônio acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal, com capacidade de três litros portando válvula reguladora de pressão e fluxômetro, na entrada do equipamento, e saída da mistura gasosa oxigênio+ozônio para recipiente plástico acoplado a um dispositivo catalisador para dissolução e eliminação dos gases.

Devido ao volume do espaço interno do recipiente utilizado para a experimentação, foram acrescidos 05 min em todos os tempos avaliados, para permitir adequada homogeneização do gás no interior do recipiente. Após cada tempo de exposição, os carrapatos foram individualmente pesados e seu registro feito em formulário elaborado para acompanhamento. Para a avaliação dos efeitos carrapaticidas, cada grupo estudado ficou armazenado em recipientes organizadores de plástico com quinze divisórias (17x10x2,3 cm), de modo que cada teleógina ficasse individualmente separada das demais (figura 4). Cada recipiente foi identificado, segundo o grupo correspondente a sua utilização e suas divisórias foram numeradas, contribuindo para o acompanhamento e registro individual de cada espécime. Foram utilizados dois recipientes por grupo, com dez espécimes em cada.



Figura 4 - Recipiente organizador, contendo quinze divisórias, utilizado para a alocação e acompanhamento das teleóginas após a exposição à mistura gasosa oxigênio+ozônio. Legenda: Notar a presença de alocação individual das teleóginas por divisória e a identificação de cada um dos compartimentos: a letra se refere ao recipiente organizador e a numeração à posição do espécime no recipiente. Registro realizado durante a avaliação após a exposição.

3.4.1.4 Rotina dos Ensaios

Imediatamente após a experimentação, com os carrapatos nos recipientes isolados, iniciou-se a observação e o registro da presença ou não de atividades biológicas (locomoção e movimento das patas) em cada um dos espécimes. Na ausência de movimentação espontânea dos membros das teleóginas, elas eram estimuladas com o auxílio de pinça cirúrgica do tipo ponta romba. Alternativamente à pinça, foram confeccionadas espátulas adaptadas com agulhas de diferentes calibres (13x0,45 mm, 25x0,7 mm, 25x0,8 mm). A confecção se deu após a remoção do bisel e do achatamento de sua extremidade remanescente, conforme figura 5. Assim, as patas eram distendidas com o auxílio da pinça ou da espátula e sua contração ou o movimento voluntário de outros membros foram observados. Em qualquer das condições em que se fosse observado a presença de movimento (natural ou estimulado), o espécime permanecia considerado como vivo.

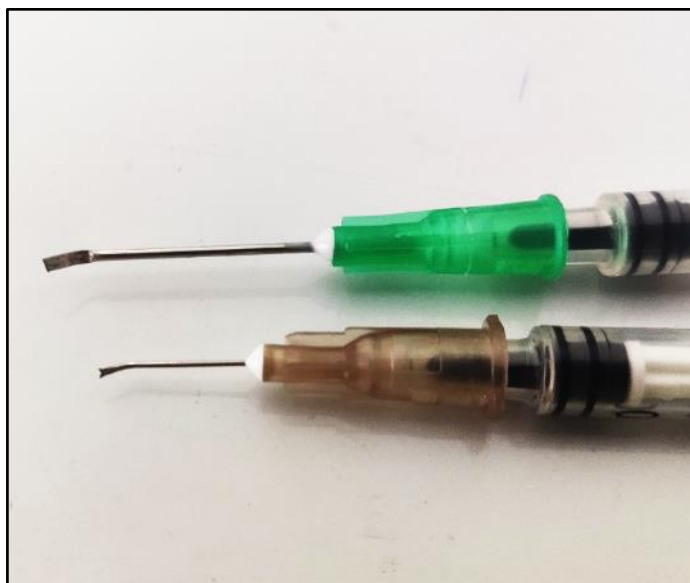


Figura 5 - Espátulas adaptadas após remoção do bisel e achatamento da extremidade remanescente das agulhas. Com canhão verde, agulha 25x0,8 mm e com canhão âmbar, agulha 13x0,45 mm.

Todos os grupos experimentais passaram a ser observados imediatamente após a exposição aos gases. Nos dez grupos expostos entre um e 30 minutos, as avaliações seguiram em intervalos de 12 horas. Porém, nos sete grupos expostos entre 45 e 105 minutos, as avaliações ocorreram em intervalos de uma hora. Nos grupos GO₃01', GO₃02', GO₃03' e GO₃04' as avaliações se mantiveram até o término do período de postura dos carrapatos.

3.4.1.5 Avaliações Realizadas

3.4.1.5.1 Avaliação do Efeito Carrapaticida *in vitro* da Mistura Gasosa Oxigênio+Ozônio

Imediatamente após a exposição dos carrapatos à diferentes dosagens da mistura gasosa oxigênio+ozônio, iniciou-se a contagem do tempo decorrido até ser observado que todo o grupo exposto fosse considerado morto. Esta atividade foi dividida em duas avaliações: a primeira buscou observar o efeito acaricida imediatamente após a utilização de diferentes dosagens da mistura gasosa, sendo considerado o percentual de carrapatos mortos em até cinco minutos após sua exposição. A segunda avaliação buscou registrar o efeito letal tardio, contado a partir de 4 horas após a exposição. Nesta avaliação, considerou o tempo (em

horas) total necessário para que todos os carrapatos do mesmo grupo fossem observados mortos após a exposição às diferentes dosagens da mistura gasosa.

3.4.1.5.2 Avaliações de Parâmetros Biológicos

Após as sessões de exposição aos gases, foram realizados os registros das avaliações dos parâmetros biológicos, por espécime pertencente a cada grupo experimental. Os parâmetros biológicos observados foram:

- a) **Peso da teleógina:** peso (mg) da fêmea de carrapato ingurgitada obtida imediatamente após a exposição experimental.
- b) **Peso da quenógina:** peso (mg) da fêmea do carrapato após a postura dos ovos. Para a realização das pesagens, considerou-se o intervalo de três a cinco dias sem postura de ovos.
- c) **Massa total de ovos produzidos:** massa total de ovos produzida ao final do período de postura, obtida a partir do somatório da pesagem da massa de ovos realizada entre três e cinco dias.
- d) **Índice de Eficiência Reprodutiva (IER):** calculado conforme a seguinte fórmula (Meléndez *et al.*, 1998):

$$IER = \frac{\text{Peso da Massa de Ovos}}{\text{Peso Inicial da Fêmea Ingurgitada}} * \text{Percentual de Eclosão}$$

- e) **Índice de Produção de Ovos (IPO):** calculado conforme a seguinte fórmula (Bennett, 1974):

$$IPO = \frac{\text{Peso da Massa de Ovos}}{\text{Peso Inicial da Fêmea Ingurgitada}} * 100$$

- f) **Índice Nutricional (IN):** calculado conforme a seguinte fórmula (Bennett, 1974):

$$IEN = \frac{\text{Peso da Massa de Ovos}}{\text{Peso Inicial} - \text{Peso Final da Fêmea Após Postura}} * 100$$

- g) **Razão de Oviposição (RO):** calculado segundo a seguinte fórmula:

$$RO = \frac{\text{Peso da Massa de Ovos}}{\text{Número de Fêmeas Ingurgitadas em Ovipostura}} * 100$$

- h) **Período de pré-postura:** intervalos de tempo registrados a cada 12 horas desde a colheita da teleógina até o início da postura de ovos.

- i) **Período de postura:** intervalo de tempo (dias) registrado entre o primeiro e último dia de postura de ovos.
- j) **Período de incubação dos ovos:** intervalos de horas (observados a cada 12 horas) entre o primeiro dia de postura e o início da eclosão.
- k) **Eclodibilidade:** avaliação visual da estimativa percentual das larvas eclodidas da massa total de ovos produzida e incubada, após o final da eclosão.
- l) **Dinâmica da distribuição temporal da produção da massa de ovos:** observação da distribuição da produção da massa de ovos em relação ao período de postura, obtida a partir da pesagem (mg) da massa de ovos entre três e cinco dias.
- m) **Dinâmica da distribuição temporal das teleóginas em oviposição:** avaliação da distribuição do quantitativo de teleóginas em oviposição, observado até que a última teleógina cessasse a oviposição.

3.4.2 Ensaios em Larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

3.4.2.1 Obtenção e Preparo

Larvas de *R. microplus* foram obtidas de ovos previamente incubados e mantidos à temperatura, umidade ambiente e fotoperíodo natural (Figura 6). Os ovos foram obtidos de teleóginas colhidas manualmente e diretamente sobre bovinos leiteiros mestiços pertencentes à propriedade rural do município de Barra Mansa (RJ) e Rio Claro (RJ). Essas teleóginas foram obtidas entre fevereiro de 2020 e março de 2022, as posturas iniciaram após intervalo de cinco a sete dias e as eclosões ocorreram entre 30 e 40 dias.



Figura 6 - Incubação e desenvolvimento de larvas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Legenda: (A) Massa de ovos de sete teleóginas sendo individualmente incubadas em tubos PET (20x920 mm) transparentes. (B) Larvas em eclosão. (C) Manutenção e desenvolvimento das larvas em tubos PET adaptados com agulhas (25x0,7 mm e 13x0,45 mm), para oxigenação do interior do recipiente.

Foram selecionadas 3.599 larvas, com idades entre 5 e 31 dias, que se encontravam híidas, sem deformações ou mutilações e que apresentavam locomoção típica. Dessas, 415 larvas foram expostas aos gases e 3.184 larvas às soluções contendo óleo ou água de osmose reversa.

3.4.2.2 Grupos Experimentais

3.4.2.2.1 Para Exposição aos Gases Oxigênio e Oxigênio+Ozônio

As larvas (n=415) foram aleatoriamente divididas em grupos com amostras entre 36 e 38 espécimes cada, e submetidas à exposição da mistura gasosa oxigênio+ozônio, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos grupos amostrais formados por larvas expostas ao oxigênio+ozônio, e relação do número amostral.

	<i>Grupos Experimentais</i>	<i>Amostragem (n)</i>	<i>Descrição</i>
<i>Efeito Acaricida Dose-resposta</i>	GO ₃ 90'	37	Exposto ao O ₃ por 90 min
	GO ₃ 80'	38	Exposto ao O ₃ por 80 min
	GO ₃ 75'	38	Exposto ao O ₃ por 75 min
	GO ₃ 74'	38	Exposto ao O ₃ por 74 min
	GO ₃ 73'	38	Exposto ao O ₃ por 73 min
	GO ₃ 70'	36	Exposto ao O ₃ por 70 min
	GO ₃ 60'	38	Exposto ao O ₃ por 60 min
	GO ₃ 40'	38	Exposto ao O ₃ por 40 min
	GO ₃ 25'	38	Exposto ao O ₃ por 25 min
	GO ₂ 90'	38	Exposto ao O ₂ por 90 min
	GC	38	Exposto ao ambiente por 90min
Total	415		

3.4.2.2.2 Para Exposição ao Óleo Girassol ou Água de Osmose Reversa Ozonizada

Larvas de *R. microplus* (n=3.184) foram aleatoriamente divididas em grupos heterogêneos contendo entre 61 e 308 espécimes e submetidas à imersão em óleo de girassol e água de osmose reversa, ambos com ou sem ozonização. A ozonização para o preparo das duas soluções ocorreu por duas horas, e para o óleo de girassol, também por quatro horas. As imersões foram realizadas por um período de 5, 10, 15 e 30 minutos. A tabela 3 apresenta os grupos estabelecidos e a figura 7 apresenta o processo experimental.

Tabela 3 - Descrição dos grupos amostrais formados por larvas expostas ao óleo de girassol ou água de osmose reversa, e relação do número amostral.

Grupos Experimentais	Amostragem (n)	Descrição
OG05'	99	Imerso por 05 min em Óleo de Girassol
OG10'	169	Imerso por 10 min em Óleo de Girassol
OG15'	137	Imerso por 15 min em Óleo de Girassol
OG30'	308	Imerso por 30 min em Óleo de Girassol
OGO ₃ 2h.05'	87	Imerso por 05 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 02 h
OGO ₃ 2h.10'	88	Imerso por 10 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 02 h
OGO ₃ 2h.15'	208	Imerso por 15 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 02 h
OGO ₃ 2h.30'	190	Imerso por 30 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 02 h
OGO ₃ 4h.05'	155	Imerso por 05 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 04 h
OGO ₃ 4h.10'	138	Imerso por 10 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 04 h
OGO ₃ 4h.15'	282	Imerso por 15 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 04 h
OGO ₃ 4h.30'	222	Imerso por 30 min em Óleo de Girassol Ozonizado por 04 h
OR.05'	77	Imerso por 05 min em Água de Osmose Reversa
OR.10'	87	Imerso por 10 min em Água de Osmose Reversa
OR.15'	114	Imerso por 15 min em Água de Osmose Reversa
OR.30'	166	Imerso por 30 min em Água de Osmose Reversa
ORO ₃ 2h.05'	112	Imerso por 05 min em Água de Osmose Reversa Ozonizada por 02 h
ORO ₃ 2h.10'	61	Imerso por 10 min em Água de Osmose Reversa Ozonizada por 02 h
ORO ₃ 2h.15'	112	Imerso por 15 min em Água de Osmose Reversa Ozonizada por 02 h
ORO ₃ 2h.30'	111	Imerso por 30 min em Água de Osmose Reversa Ozonizada por 02 h
GA5'	111	Imerso em Solução Carrapaticida Sintética (amitraz 12,5%) por 05 min
GD5'	150	Imerso em Solução Carrapaticida Sintética (deltametrina) por 05 min
Total	3184	

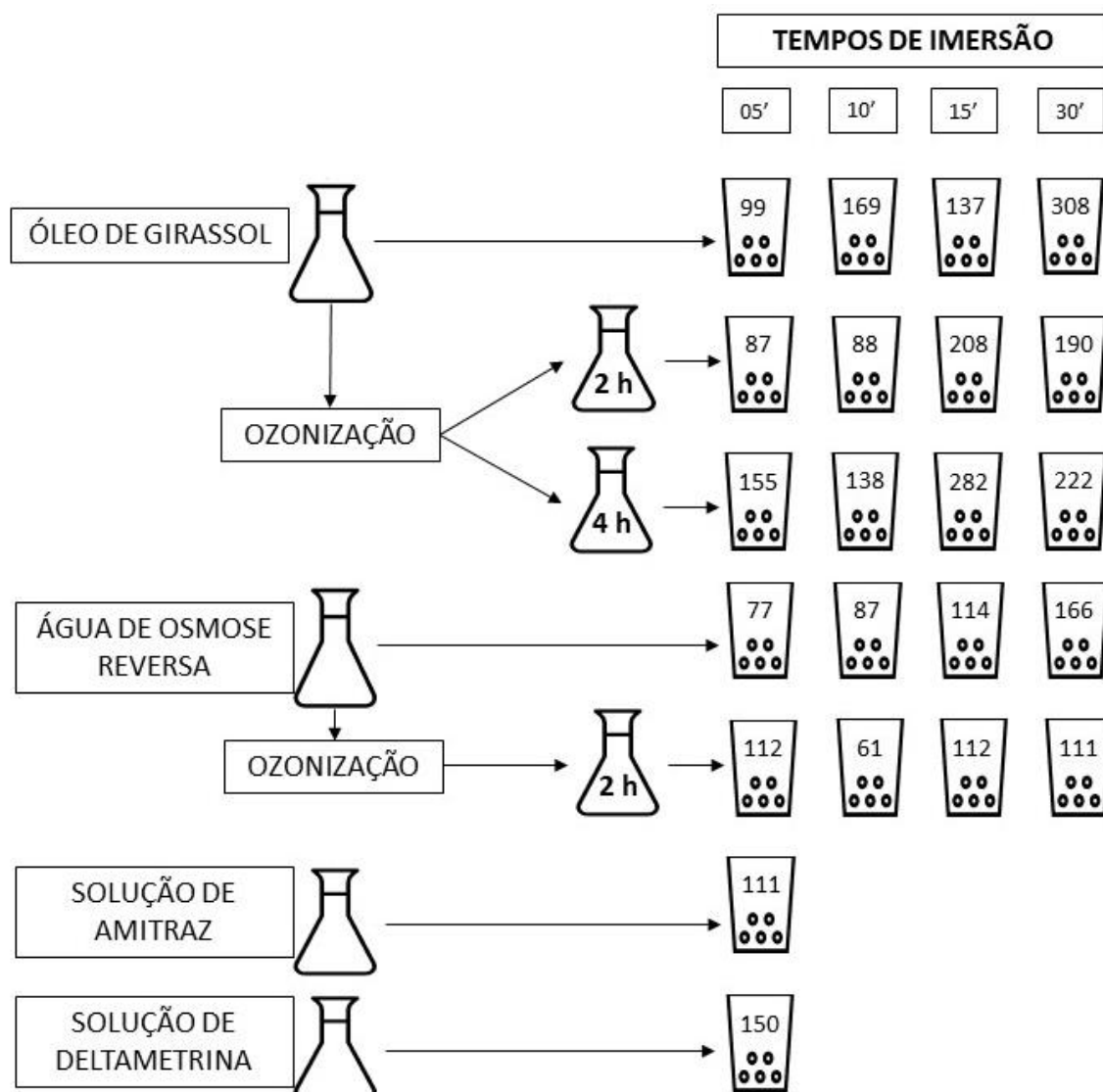


Figura 7 - Esquema do Processo Experimental para Exposição ao Óleo Girassol (OG) ou Água de Osmose Reversa (OR) Ozonizada com o número amostral de cada grupo

3.4.2.3 Procedimentos Experimentais

3.4.2.3.1 Exposição aos Gases Oxigênio e Oxigênio+Ozônio

Cada espécime foi coletado da ninhada e depositado no interior do recipiente para experimentação, até atingir o número amostral final. A exposição aos gases se deu no mesmo circuito utilizado para a experimentação de teleóginas, contudo, não se realizou o armazenamento dos espécimes em recipientes individualizados após a exposição.

3.4.2.3.2 Exposição ao Óleo de Girassol e à Água de Osmose Reversa

Os espécimes foram coletados em grupos aleatórios diretamente da ninhada com o auxílio da espátula adaptada (Figura 8 A). Foram depositados no interior de tubetes cilíndricos de plástico com tampa, medindo externamente 38 mm de altura e 22 mm de largura (Figura 8 B), cujo volume interno correspondia a 10 mL, aproximadamente.



Figura 8 – Manipulação e acondicionamento das larvas de carrapatos em tubetes de plástico.

Legenda: (A) Retirada de grupos de larvas da ninhada presente no interior de tubetes. (B) Reacondicionamento das larvas no interior de tubeles para a formação de grupos experimentais.

Após alocados no interior do tubete, este fora completado até o seu limite superior com, aproximadamente, 10 mL da solução desejada (óleo de girassol ozonizado por duas horas ou quatro horas ou sem ozonização, e água de osmose reversa ozonizada por duas horas ou sem ozonização). O recipiente estava completamente cheio e tampado, praticamente sem a formação de bolsas de ar que impedisse a submersão de qualquer espécime (Figura 9).

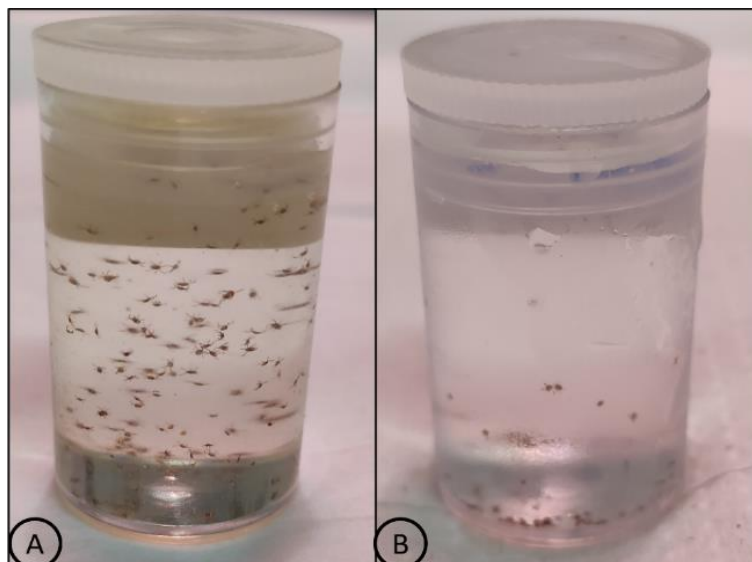


Figura 9 - Tubetes de plástico contendo larvas imersas em soluções ozonizadas.
Legenda: (A) Tubete contendo larvas de carrapatos imersas em óleo de girassol ozonizado; (B) Tubete contendo larvas de carrapatos imersas em água de osmose reversa ozonizada.

Para este ensaio foram preparados 1.000 mL de óleo ozonizado, sendo 500 mL ozonizados, por 2 h e 500 mL ozonizados, por 4 h. Todavia, desses volumes preparados, foram utilizados somente 80 mL, sendo 40 mL de cada tempo de preparação. Outros 40 mL de óleo de girassol sem ozonização foram utilizados para avaliação controle, totalizando o consumo de 120 mL de óleo de girassol.

Quanto à ozonização da água de osmose reversa, foram preparados 500 mL desta solução por 2 h. Foram utilizadas 40 mL da solução ozonizada e 40 mL desta solução sem ozonização.

3.4.2.4 Avaliações Pós-Exposição

3.4.2.4.1 Pós-Exposição aos Gases Oxigênio e Oxigênio+Ozônio

Finalizado à exposição aos gases os espécimes foram prontamente analisados, diretamente no próprio recipiente utilizado para sua exposição. Para isto, o recipiente foi aberto e, para evitar a inalação dos gases residuais em seu interior, aguardou-se o tempo de 30 segundos para o início da observação.

A locomoção natural ou a movimentação espontânea dos membros foram os parâmetros observados para avaliar a presença de atividade biológica nos espécimes em até cinco minutos após serem experimentados. As espátulas adaptadas para o auxílio, durante a avaliação das teleóginas, foram utilizadas para separar e coletar cada larva do recipiente, transferindo-as para uma folha de

papel sulfite branca (Figura 10), onde a avaliação seguiu até sua finalização. A utilização da folha branca permitiu reduzir possíveis erros de julgamento devido ao maior contraste com larva, quando comparado ao recipiente (plástico transparente), destacando pequenas mudanças de posicionamento das larvas sobre sua superfície.

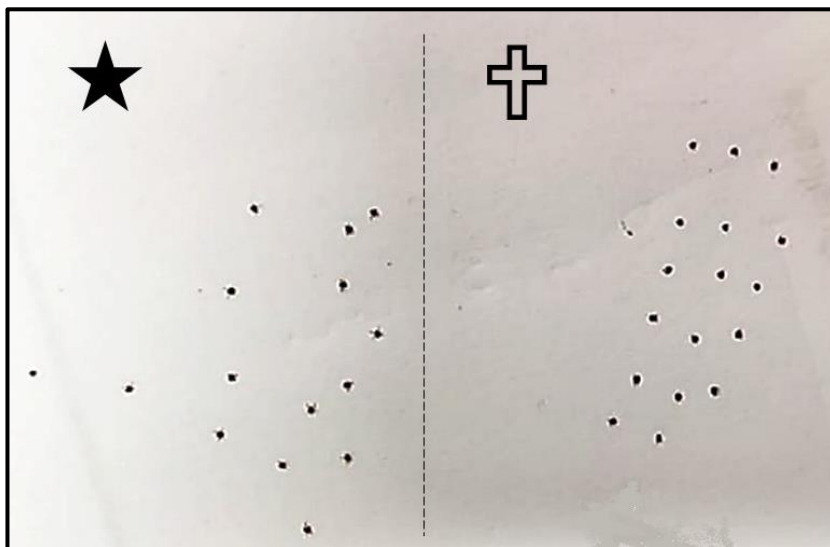


Figura 10 - Segmento de folha de papel sulfite utilizada para o acompanhamento das condições das larvas em vivas (★) ou mortas (†). Neste registro, 32 larvas (15=★ e 17=†) já haviam sido transferidas do recipiente. Nota-se a diferença no padrão de organização das larvas na divisão estabelecida: à esquerda as larvas espalhadas devido sua constante movimentação; à direita padrão uniforme de organização devido à ausência de movimentação. Registro feito durante a avaliação após a exposição.

3.4.2.4.2 Pós-Exposição ao Óleo de Girassol e a Água de Osmose Reversa Ozonizados

Decorrido o tempo necessário para a imersão das larvas, a tampa do recipiente foi retirada e a boca do recipiente foi coberta com um lenço de papel de folha dupla (22 cm x 21,5 cm), seguida por cinco folhas de papel toalha (20 cm x 21 cm). Imediatamente após, o conjunto foi invertido de forma a manter o tubete de boca para baixo sobre o lenço. Lentamente foi-se suspendendo o tubete para permitir o extravasamento de seu conteúdo, até seu total esvaziamento e posterior avaliação das larvas (Figura 11).

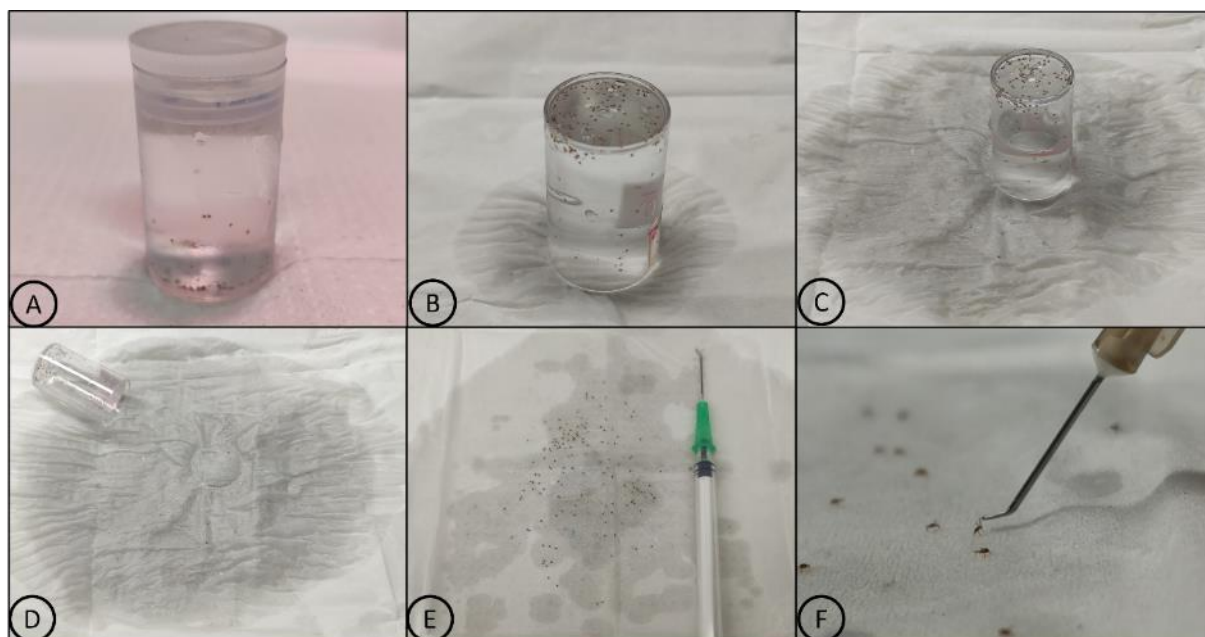


Figura 11 – Sequência do processo de imersão para avaliação do efeito acaricida das soluções testadas em larvas de carrapatos.

Legenda: (A) Tubete tampado contendo larvas totalmente imersas em água de osmose reversa; (B) Tubete destampado, com sua boca para baixo sobre o lenço, imediatamente após o tempo de imersão; (C) Esvaziamento gradual do tubete após o tempo de imersão; (D) Total esvaziamento do tubete sobre o lenço e as folhas de papel toalha umedecidas; (E) Larvas de carrapato após imersão aguardando avaliação; (F) Avaliação do efeito acaricida da solução utilizada.

As larvas eram, então, individualmente removidas da porção úmida do lenço de papel para a extremidade seca, onde terminavam de secar. Neste momento, era iniciado a contagem de todas as larvas. Aquelas que apresentavam atividade locomotora eram contadas como vivas, enquanto aquelas que não se locomoviam, mesmo que apresentassem movimentos de seus membros, eram consideradas mortas. Do mesmo modo como para exposição aos gases, nos casos em que se necessitavam maiores cuidados no julgamento, algumas larvas eram alinhadas em fileira enquanto se prosseguia com a avaliação das demais. Neste caso, seu desalinhamento posterior indicava sua movimentação sobre o lenço de papel (Figura 12).



Figura 12 – Recorte de segmento do lenço de papel utilizado durante as avaliações das larvas após imersão nas soluções. Seta vermelha destaca o desalinhamento de larvas devido sua locomoção, confirmando-as como vivas e não mortas, como as demais presentes na linha de dobra do lenço.

3.4.2.5 Parâmetro Avaliado

A atividade carrapaticida dos fluidos: oxigênio; oxigênio+ozônio; óleo de girassol; óleo de girassol ozonizado; água de osmose reversa; água de osmose reversa ozonizada; solução carrapaticida a base de amitraz; e solução carrapaticida a base de deltametrina, foram avaliados de acordo com a presença ou ausência de vida nas larvas imediatamente após cada tempo de imersão. Para isso, se considerou o percentual de larvas mortas em até cinco minutos após a exposição à mistura gasosa e após a secagem natural em lenço de papel, para as larvas imersas em soluções líquidas.

3.5 Protocolo Experimental *in vivo*

No desenho experimental inicial previu-se a avaliação do óleo de girassol ozonizado em protocolos contendo grupos de bovinos parasitados. Contudo, em decorrência da pandemia por covid-19 e o isolamento social requerido, não foi possível o acesso às propriedades rurais ou estações experimentais de

universidades parceiras durante toda fase experimental desta tese, impactando na realização dos experimentos.

Apesar disso, buscou-se sempre pela realização de ensaios *in vivo*, até que foi possível a experimentação de um bovino (*Bos taurus*) em uma propriedade de leiteira no município de Barra Mansa (RJ). Esta oportunidade abriu porta para que, na propriedade vizinha, tivéssemos acesso a um equino (*Equus ferus caballus*) infestado por carrapatos. Ainda que as espécies de carrapatos que parasitavam os equinos não fossem foco principal desta tese, foi oportuno aproveitar a possibilidade para comparar seus efeitos *in vivo* com àqueles observados no bovino.

Por este motivo, foram realizados dois ensaios *in vivo* utilizando óleo de girassol ozonizado, um sob bovinos parasitados por *R. (Boophilus) microplus*, e outros sob um equino parasitado por carrapatos das espécies *Amblyomma* spp. e *Dermacentor nitens*. Ambos os hospedeiros estavam sob condições de parasitismo natural.

3.5.1 Preparo, Armazenamento e Transporte do Óleo de Girassol Ozonizado

O preparo do óleo de girassol foi realizado conforme descrito no tópico 3.3.1, por 4 h ininterruptas (Oliveira *et al.*, 2014). Foram preparados um total de 13 L de óleo de girassol ozonizado para tratamento tópico *in vivo*. Todos os preparos ocorriam previamente a cada tratamento tópico, na véspera da sua utilização.

A aplicação realizada no bovino necessitou de 5 L do óleo de girassol ozonizado, preparados em dois momentos. O primeiro preparo se deu para o tratamento no dia “0” (zero), onde foram processados os primeiros 3 L. Já o segundo preparo ocorreu para o tratamento, realizado após 21 dias do primeiro, neste momento foram ozonizados os 2 L restantes.

A ozonização do óleo de girassol para aplicação no equino contemplou o preparo de o volume total de 8 L, divididos em três momentos distintos. A primeira preparação processou 4 L, por ocasião do primeiro banho realizado no dia “0” (zero), e nas duas últimas preparações foram processados 2 L cada, utilizados no segundo (dia 21) e terceiro (dia 56) banho realizado.

O transporte e acondicionamento dos frascos com óleo ozonizado, do freezer até a sua utilização nos animais, foram realizados com caixa térmica refrigerada entre 2° C e 8° C com auxílio de placas de gelo reciclável.

3.5.2 Ensaio Realizado em Bovino

3.5.2.1 Caracterização do Animal

Um bovino, fêmea, da raça girolando, com vinte meses de idade, aproximadamente 180 kg, pertencente a uma propriedade rural localizada em Barra Mansa (RJ), apresentando parasitismo natural por carrapatos da espécie *R. (Boophilus) microplus*, foi submetido ao tratamento tópico com óleo de girassol ozonizado.

O animal apresentava parasitismo por todo o corpo, contudo concentrado na região do pescoço, peito, inguinal e face interna das coxas (Figura 13). Havia presença de eritema e lesões de pele provocadas pelo parasitismo, além da presença simultânea de papilomatose.

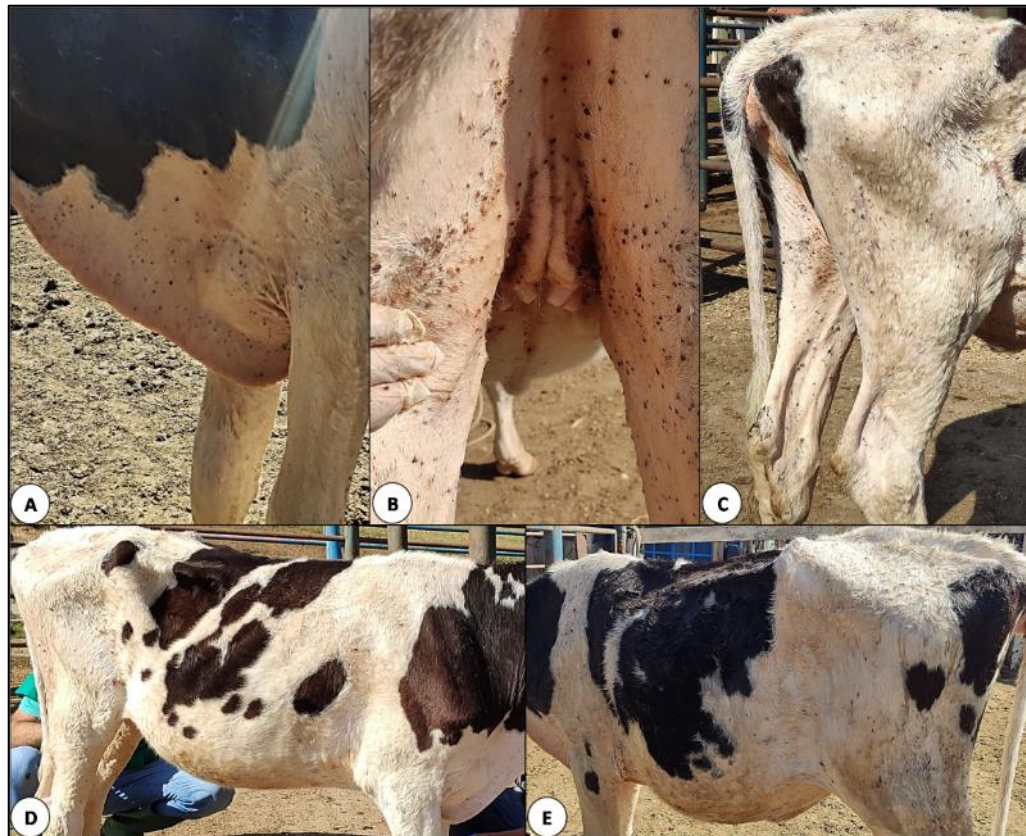


Figura 13 - Parasitismo por carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovino pertencente à propriedade rural no município de Barra Mansa (RJ).

Legenda: (A) Pescoço, peito e membro anterior esquerdo parasitados. (B) Face interna da coxa, pelve e porção do abdômen parasitados, eritematosa e presença de papilomas. (C) Lateral externa do membro posterior direito parasitado e face interna do membro posterior esquerdo parasitado e presença de papilomas. (D) Vista da lateral direita do animal com parasitismo. (E) Vista da lateral esquerda do animal com parasitismo.

3.5.2.2 Aplicação Tópica do Óleo de Girassol Ozonizado

Foram realizados dois banhos de aspersão com óleo de girassol ozonizado em intervalo de 21 dias, sendo a primeira aplicação no dia zero, data inicial de acompanhamento, e a segunda no dia 21 (figura 14). Os banhos foram realizados com as mãos do manipulador calçadas com luva de borracha nitrílica ou de látex e as aspersões foram realizadas com auxílio de pulverizador manual, disposto com válvula tipo gatilho, de plástico, com capacidade de armazenamento de 500 mL.

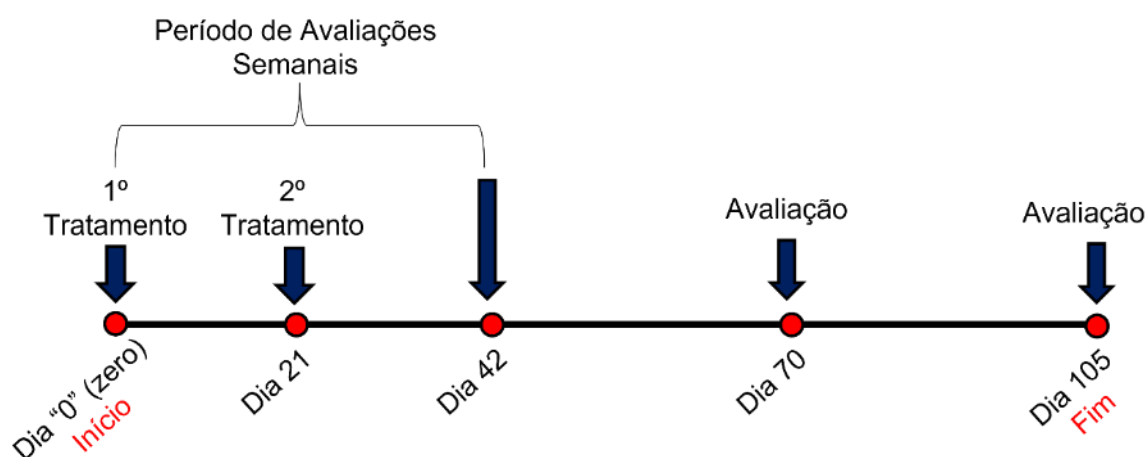


Figura 14 – Organograma com datas que demarcam as atividades de tratamento tópico com óleo ozonizado em bovino, bem como os momentos de avaliações realizadas.

Todas as aspersões foram realizadas no período da manhã. O primeiro banho foi realizado por toda a superfície corporal do animal (Figura 15), sendo necessários 3.000 mL de óleo de girassol ozonizados. Contudo, no segundo banho, as aspersões foram direcionadas especificamente para as áreas mais parasitadas, necessitando de 2.000 mL.



Figura 15 – Primeira aplicação com óleo de girassol ozonizado.

Legenda: (A) Banho por aspersão com óleo de girassol ozonizado sendo realizado utilizando dispositivo pulverizador com válvula gatilho. (B) Vista da lateral esquerda do bovino após realização do banho em toda sua superfície. (C) Aspersão com óleo de girassol sendo realizado na face interna da coxa direita. (D) Vista direita da região posterior do bovino após realização de banho.

3.5.2.3 Avaliações no Bovino Tratado

As avaliações foram realizadas sempre no período da manhã e ocorreram em intervalos de sete dias, durante os primeiros 42 dias. Após esse período, foram realizadas duas avaliações, a primeira no dia 70 e a última no dia 105, data final de acompanhamento do animal. Desta maneira, foram realizadas nove visitas para avaliação ou tratamento.

As avaliações compreendiam registros fotográficos do animal, palpação e inspeção da superfície corporal com avaliação visual da estimativa percentual da influência da utilização tópica do óleo de girassol ozonizado sobre o parasitismo por carrapatos e sobre as lesões dermatológicas associadas à espoliação por estes ectoparasitos.

3.5.3 Ensaio Realizado em Equino

3.5.3.1 Caracterização do Animal

Um equino, fêmea, mestiço, com sete anos de idade, aproximadamente 350 kg, pertencente a uma propriedade rural localizada em Barra Mansa (RJ), apresentando parasitismo natural por carrapatos das espécies *Amblyomma* spp. e *Dermacentor nitens* foi submetido à experimentação utilizando óleo de girassol ozonizado.

O animal apresentava intenso parasitismo, contudo, concentrado nas regiões da cabeça, inguinal, perianal, conduto auditivo, peito, axilas pescoço e face interna dos jarretes e antebraço (Figura 16). Encontrava-se magro, com pele seborreica e áreas alopécicas promovidas pelo parasitismo.



Figura 16 - Parasitismo por carrapatos *Amblyomma* spp. e *Dermacentor nitens* em equino pertencente à propriedade rural no município de Barra Mansa (RJ).

Legenda: (A) Cabeça com parasitismo, alopecia e descamação. (B) Região inguinal com parasitismo. (C) Região perianal e base da cauda com parasitismo. (D) Vista da lateral direita do pescoço, face e orelha com parasitismo, alopecia e descamação. (E) Vista da lateral esquerda do pescoço, face e orelha com parasitismo, alopecia e descamação.

3.5.3.2 Aplicação Tópica do Óleo de Girassol Ozonizado

Foram realizadas três aplicações no equino: a primeira no dia zero, a segunda no dia 21 e a terceira no dia 56 (Figura 17). Todas as aplicações ocorreram por toda a superfície do animal, de modo que fosse totalmente coberto por uma camada do óleo (Figura 18). Apesar disso, nas duas últimas aplicações, houve uma concentração direcionada para as áreas de maior parasitismo. Os três tratamentos foram realizados no período da manhã.

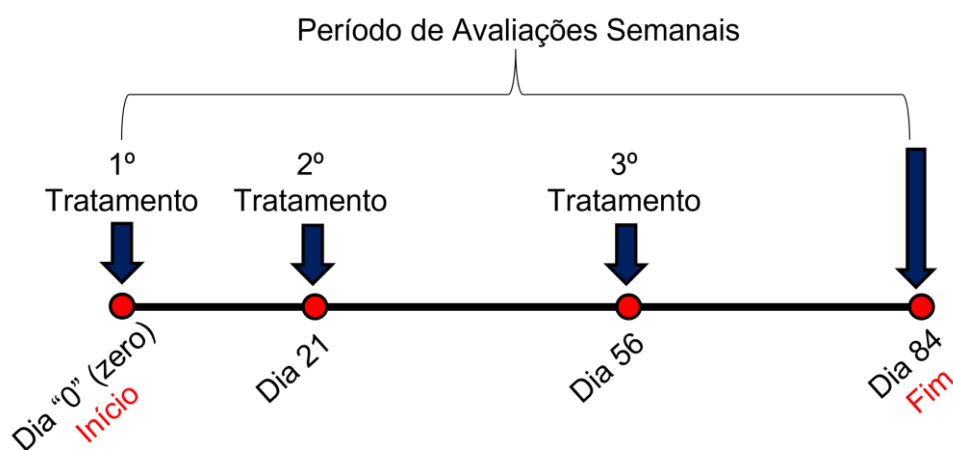


Figura 17 - Organograma com datas que demarcam as atividades de tratamento tópico com óleo ozonizado em equino, bem como o intervalo e frequência de avaliações realizadas.

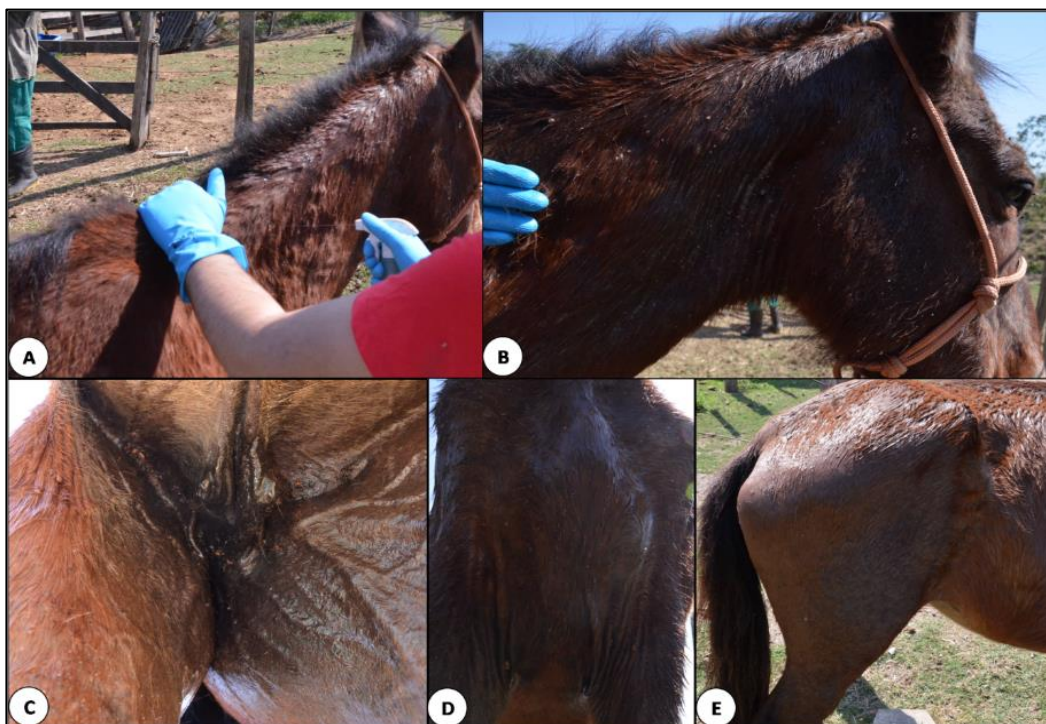


Figura 18 - Equino tratado com óleo de girassol ozonizado.

Legenda: (A) Aspersão do óleo de girassol ozonizado sendo realizado na lateral direita do pescoço do animal. (B à E) Registro de algumas regiões banhadas: B: Porção do pescoço, orelha e face direita; C: Região inguinal

e porção da face interna das coxas; D: Peito e axilas; E: Porções da lateral direita do tronco, abdômen, lombar e membro posterior direito.

Do mesmo modo como utilizado no bovino, as aplicações se deram com auxílio de pulverizador manual de plástico, com válvula tipo gatilho e com capacidade de armazenamento de 500 mL. Utilizou-se 1.800 mL de óleo de girassol ozonizados em cada uma das três aplicações. As mãos do aplicador se mantiveram calçadas com luvas de borracha nitrílica ou de látex durante todo o momento destinado ao tratamento.

3.5.3.3 Avaliações no Equino Tratado

O equino foi acompanhado por 84 dias, sendo avaliado a cada sete dias, somando um total de 13 avaliações (Figura 17). Durante cada uma delas, diversos registros fotográficos do animal foram feitos, sempre buscando observar as diferentes áreas da superfície corporal do animal. Inspeções visuais da estimativa do parasitismo foram realizadas a fim de se comparar o status do parasitismo a cada semana.

3.6 Análises Estatísticas

A avaliação de normalidade dos grupos experimentais foi realizada pelo teste Shapiro-Wilk ($\alpha=0,05$). Para os grupos cujos dados apresentaram distribuição normal, foram submetidos ao teste de significância One-Way Anova, seguido pela comparação múltipla entre grupos, realizada pelo teste de Tukey. Já os dados que apresentaram distribuição não-normal foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pela comparação múltipla entre os grupos realizado pelo teste de Dunn's. Ambos os procedimentos consideraram o nível de significância de 5%.

Análises estatísticas e gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad (InStat, GraphPad, v.5.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism, Inc.). A demonstração gráfica dinâmica do efeito acaricida do ozônio em todos os tempos de exposição foi realizada utilizando o programa Excel (Microsoft Office 360).

As concentrações letais (CL_{50}/CL_{95}) e os intervalos de confiança 95% (IC_{95}) foram obtidas a partir do desenvolvimento da curva dose-resposta, pela equação

de Hill (Gadagkar; Call, 2015) como demonstrado por Minho; Gaspar e Domingues (2016) e definida pelos parâmetros: linha de resposta base (bottom), resposta máxima (top), inclinação (Hill slope). Os gráficos e o cálculo da regressão não linear de Hill foram realizados utilizando o Software GraphPad Prism.

4. RESULTADOS

Os resultados observados a partir dos efeitos do ozônio sobre carrapatos demonstraram seu potencial acaricida para o controle do parasitismo.

A exposição das fêmeas ingurgitadas à mistura oxigênio+ozônio ocorreram nos seguintes tempos de exposição: 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 45; 60; 75; 80; 83; 85 e 105 minutos. O intervalo de tempo entre 45 e 105 min apresentou efeito acaricida imediatamente após a exposição dos espécimes à mistura gasosa, alcançando mortalidade de 100% em até 4 h, e foram definidos como Efeito Acaricida Imediato. Entre 5 e 30 min o efeito acaricida se iniciou 12 h após a exposição, findando-se após 180 horas, quando eliminou todos os espécimes antes do início da postura dos ovos, sendo definido como Efeito Acaricida Tardio. As exposições que ocorreram em menores tempos de exposição, entre 1 e 4 min, permitiram a observação de efeitos tóxicos sobre parâmetros biológicos, e se denominaram de Efeito Acaricida por Subdoses.

4.1 Efeitos acaricidas da mistura gasosa de O_2+O_3 sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A distribuição das médias de peso e seu desvio padrão estão apresentadas na tabela 4, e está dividida segundo sua sessão experimental. Somente nos grupos onde foram observados efeitos acaricidas tardios houve distribuição não-normal e apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Relação entre o peso médio da amostra \pm desvio padrão e o número amostral de cada grupo em cada sessão experimental.

	Grupos Experimentais	Amostras (n)	Peso (g)
Efeito Acaricida Imediato	GO ₃ 105'	20	0,201 \pm 0,044
	GO ₃ 85'	20	0,210 \pm 0,038
	GO ₃ 83'	23	0,200 \pm 0,022
	GO ₃ 80'	21	0,198 \pm 0,050
	GO ₃ 75'	20	0,210 \pm 0,034
	GO ₃ 60'	20	0,228 \pm 0,035
	GO ₃ 45'	20	0,218 \pm 0,032
	GC	20	0,216 \pm 0,031
	Total	164	
	Grupos Experimentais	Amostras (n)	Peso (g)
Efeito Acaricida Tardio	GO ₃ 30'	20	0,150 \pm 0,039 ^{b,c}
	GO ₃ 25'	20	0,187 \pm 0,034 ^{b,c}
	GO ₃ 20'	20	0,216 \pm 0,029 ^{b,c}
	GO ₃ 15'	20	0,273 \pm 0,041 ^a
	GO ₃ 10'	20	0,259 \pm 0,035 ^{a,b}
	GO ₃ 05'	20	0,264 \pm 0,043 ^{a,b}
	GO ₂ 15'	20	0,242 \pm 0,037 ^{a,b}
	GC	20	0,244 \pm 0,050 ^{a,b}
	Total	160	
Total Geral	324		

Legenda: Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

A distribuição do percentual dos efeitos acaricidas imediatos, bem como dos tardios, observados sobre fêmeas ingurgitadas encontram-se nas tabelas 5 e 6, onde podem ser comparados os tempos de exposição às doses da mistura gasosa O₂+O₃, massa total de ozônio e número amostral com percentual da mortalidade observada.

Tabela 5 - – Distribuição percentual e temporal (h) do Efeito Acaricida Imediato da mistura oxigênio+ozônio após diferentes tempos de exposição (dose).

Tempo de Exposição (min)	Dose (mg/L.min)	Massa Total de Ozônio (mg)	n.	Mortalidade Imediata (%)	Mortalidade de 100% (h)
45	3.195	399,37	20	10%	3,58
60	4.260	532,50	20	5%	2,67
75	5.325	665,62	20	25%	1,50
80	5.680	710,00	21	38%	1,32
83	5.893	736,62	23	52%	1,12
85	6.035	754,37	20	60%	0,92
105	7.455	931,87	20	100%	0,08

Legenda: n. = número amostral

Tabela 6 - Distribuição percentual e temporal (h) do Efeito Acaricida Tardio da mistura oxigênio+ozônio após diferentes tempos de exposição (dose).

Tempo de Exposição (min)	Dose (mg/L.min)	Massa Total de Ozônio (mg)	n.	Mortalidade em 36 h (%)	Mortalidade de 100% (h)
5	355	44,37	20	0	180
10	710	88,75	20	5	156
15	1.065	133,12	20	40	96
20	1.420	177,50	20	80	48
25	1.775	221,87	20	100	36
30	2.130	266,25	20	90	48

Legenda: n. = número amostral

Os dados de mortalidade observados permitiram o desenvolvimento das curvas dose-resposta, juntamente com o cálculo de doses letais (DL_{50} e DL_{95}) e seus correspondentes intervalos de confiança (Figura 19).

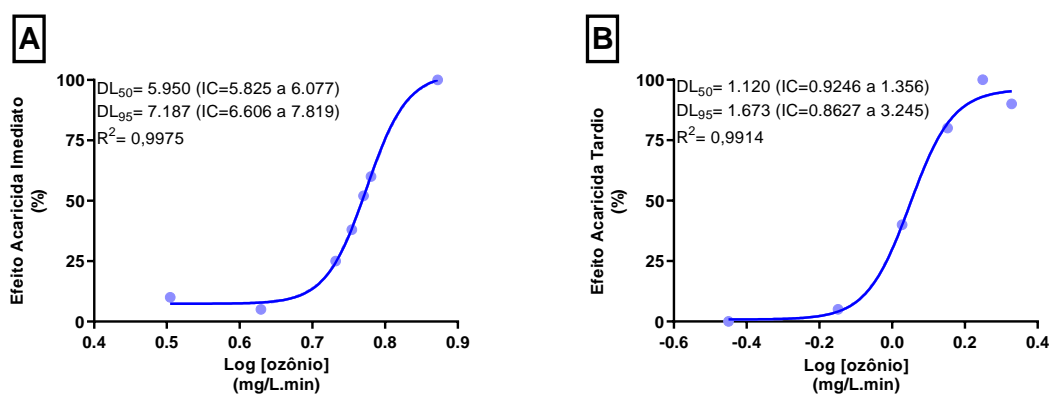


Figura 19 - Curva dose resposta obtida para Os Efeitos Acaricidas Imediatos e Tardios.

Legenda: (A) Curva dose-resposta apresentada no efeito acaricida imediato; (B) Curva dose-resposta apresentada no efeito acaricida tardio. DL_{50} = Dose letal necessária para eliminar 50% da população exposta; DL_{95} = Dose letal necessária para eliminar 95% da população exposta; IC = Intervalo de confiança; R^2 = Coeficiente de determinação.

A dinâmica da evolução (h) do efeito acaricida da mistura gasosa O_2+O_3 em todos os grupos expostos entre 5 e 105 min (Efeitos Acaricidas Imediatos + Tardios), encontra-se representada na figura 20.

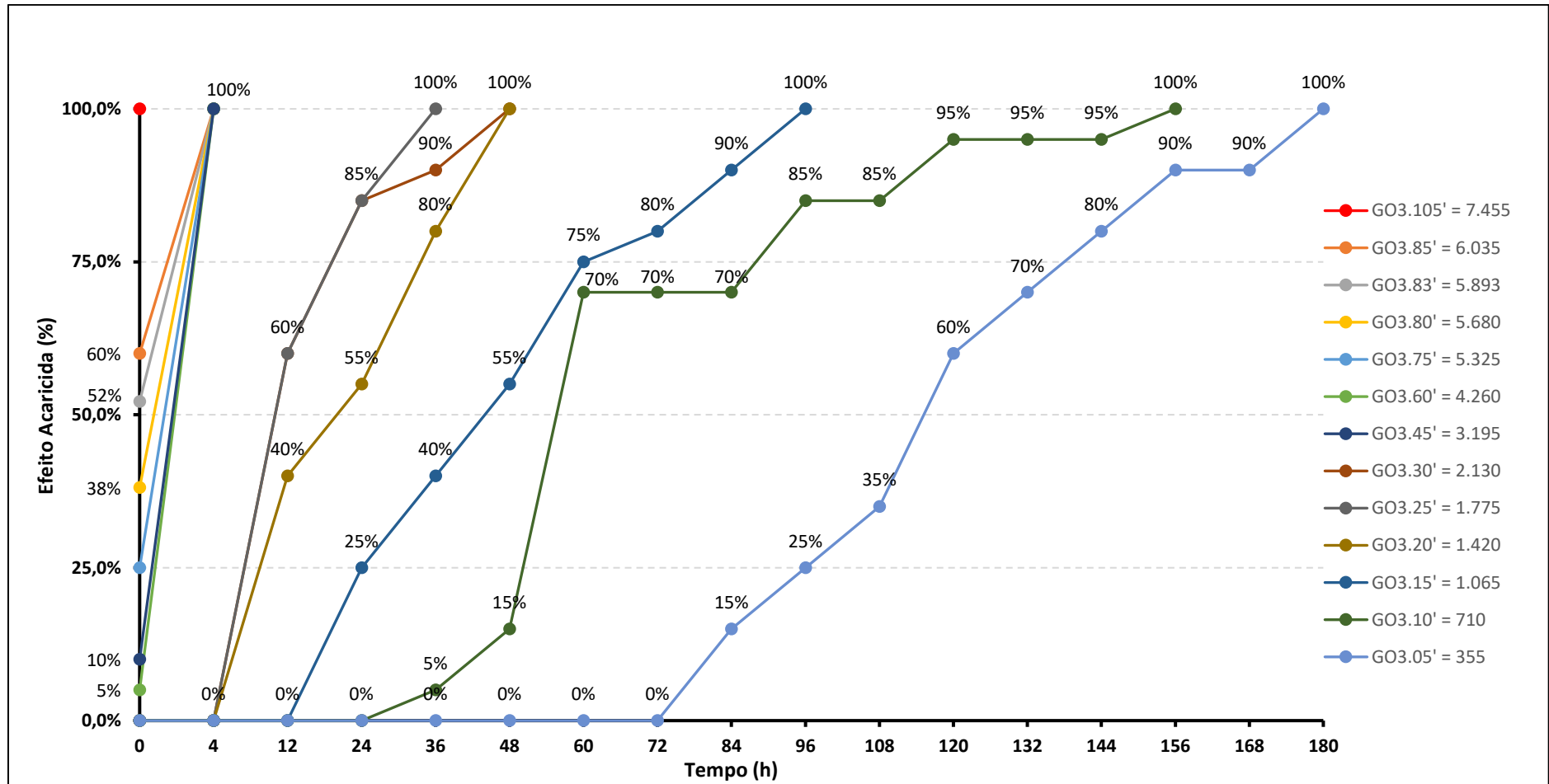


Figura 20 -Evolução do efeito acaricida percentual (%) após exposição de fêmeas ingurgitadas à mistura gasosa oxigênio+ozônio em todos os tempos de exposição (e dose) utilizados para avaliação de efeitos imediatos e tardios.

4.2 Efeitos acaricidas da mistura gasosa de O_2+O_3 sobre parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Atividade acaricida dose-dependente relativa aos Efeitos Acaricidas por Subdoses (1 a 4 min de exposição; 71 a 284 mg) da mistura gasosa O_2+O_3 utilizadas para avaliação de seus efeitos sobre parâmetros biológicos, encontram-se na tabela 7. Observa-se a progressão do percentual de mortalidade de cada grupo exposto conforme aumento da dose no tempo de 360 h, após a exposição.

Tabela 7 - Distribuição percentual do Efeito Acaricida por Subdoses da mistura oxigênio+ozônio obtidos após curtos tempos de exposição (subdoses).

Tempo de Exposição (min)	Subdose (mg/L.min)	Massa Total de Ozônio (mg)	n.	Mortalidade em 360 h (%)
1	71	8,88	20	10
2	142	17,75	20	25
3	213	26,63	20	65
4	284	35,50	20	70

Legenda: n. = número amostral

O peso médio \pm desvio padrão de cada grupo (n=20), submetido a avaliação do efeito acaricida sobre seus parâmetros biológicos, podem ser comparados na figura 21. Nessa mesma figura também podem ser comparados os mesmos parâmetros para o peso médio da massa de ovos e peso médio das quenógenas por grupo experimental. Os parâmetros apresentaram distribuição não-normal e diferenças significativas ($p<0,05$) foram observadas nas análises sobre o peso médio da massa de ovos e o peso médio das quenógenas.

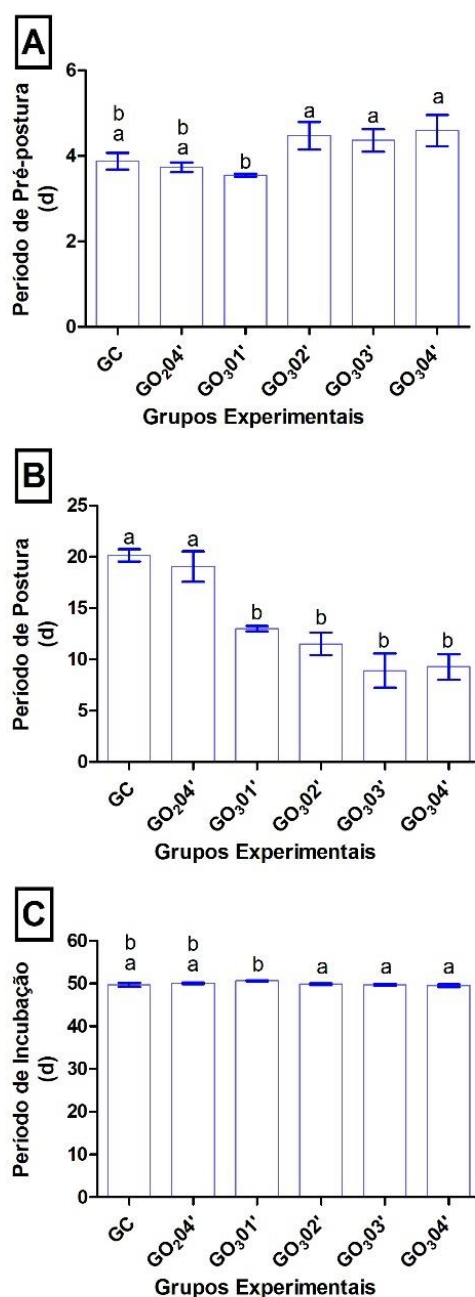


Figura 21 – Comparativo da média \pm erro padrão entre grupos em diferentes parâmetros biológicos relacionados ao peso (g).

Legenda: (A) Peso das Teleóginas; (B) Peso das Quenógenas e (C) Peso da Massa de Ovos. Média \pm erro padrão da média seguidos de letras iguais não apresentam diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

A evolução da mortalidade até o final da oviposição encontra-se representada pela figura 22, caracterizando a dinâmica desse efeito em fêmeas ingurgitadas expostas às subdoses da mistura gasosa O₂+O₃.

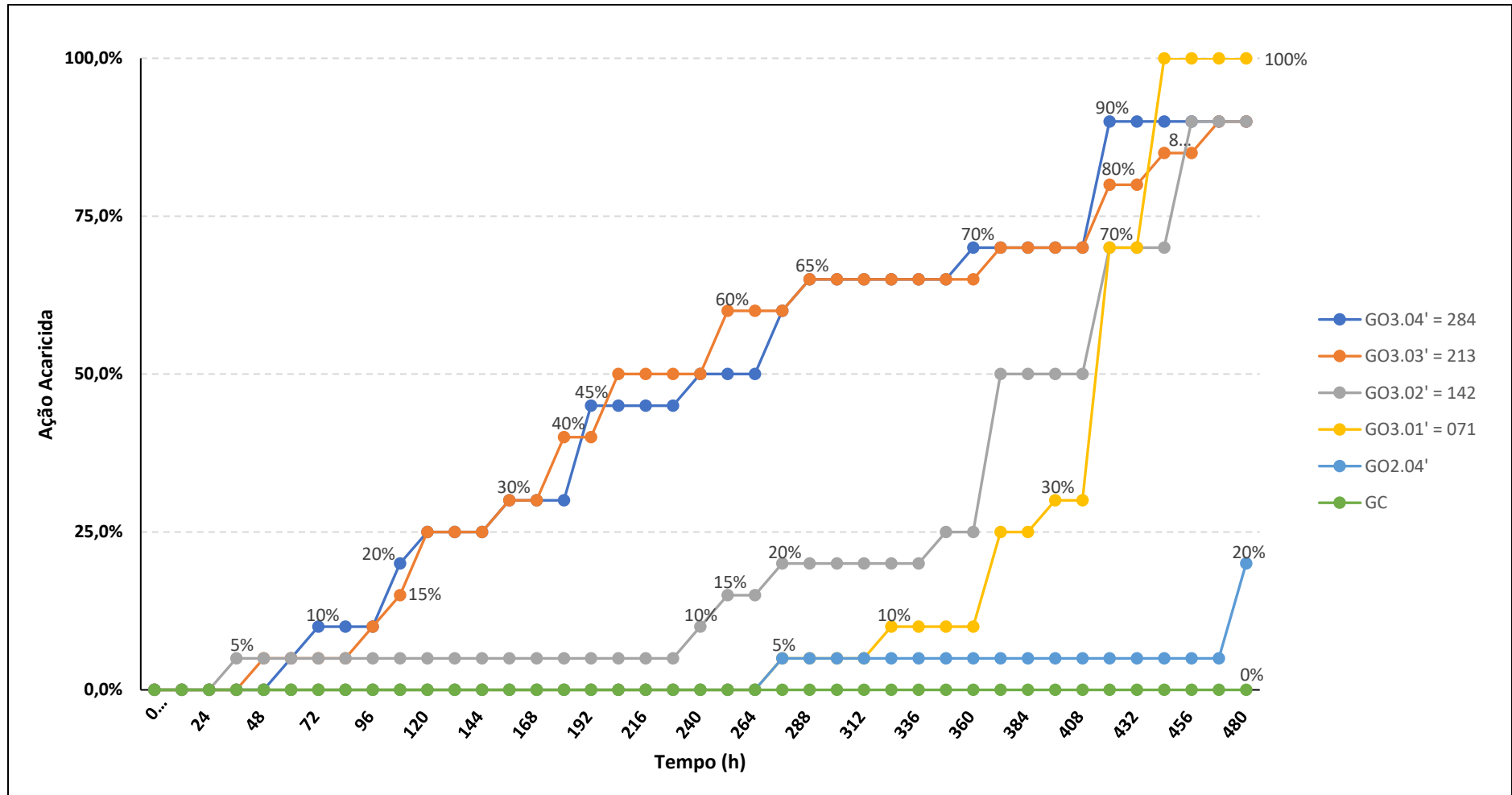


Figura 22 Evolução do efeito acaricida percentual (%) após exposição de fêmeas ingurgitadas à mistura gasosa oxigênio+ozônio em baixos tempos de exposição (e subdoses) para avaliação dos efeitos sobre parâmetros biológicos.

O peso médio das fêmeas ingurgitadas após a postura dos ovos, das quenóginas, da massa de ovos e o percentual de eclosão dos ovos permitiram o cálculo do Índice de Eficiência Reprodutiva, Índice Nutricional e Índice de Produção de Ovos (Figura 23), estas avaliações apresentaram distribuição não-normal e suas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram semelhantes.

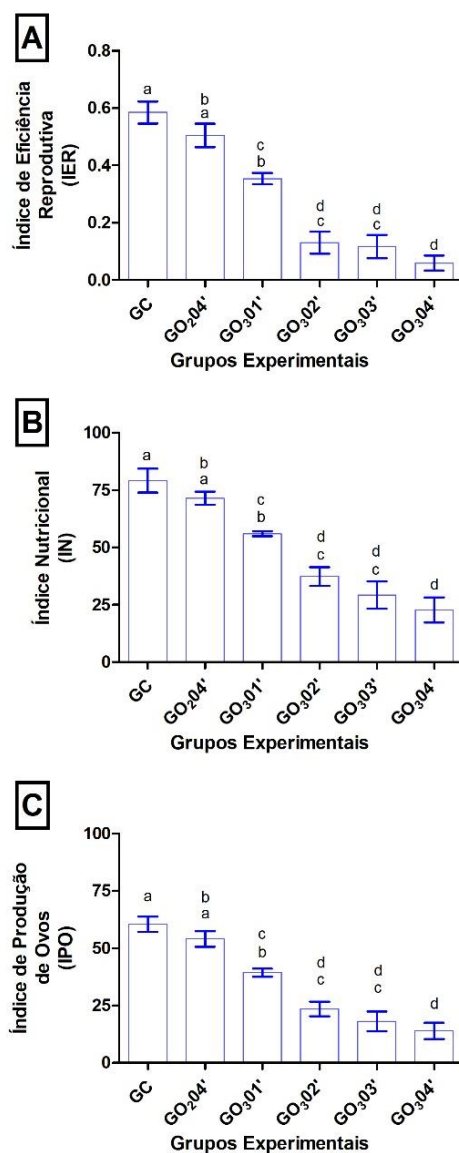


Figura 23 – Comparativo da média \pm erro padrão dos Índices de Eficiência Reprodutiva (IER), Índice Nutricional (IN) e Índice de produção de Ovos (IPO) de cada grupo experimental.

Legenda: (A) Índices de Eficiência Reprodutiva (IER); (B) Índices Nutricional (IEN) e Índice de Produção de Ovos. Média \pm erro padrão da média seguidos de letras iguais não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

A dinâmica do percentual de fêmeas em oviposição após exposição à subdoses da mistura gasosa O₂+O₃ é demonstrada até o final da ovipostura, para todos os grupos experimentais expostos entre 1 e 4 min, pela figura 24.

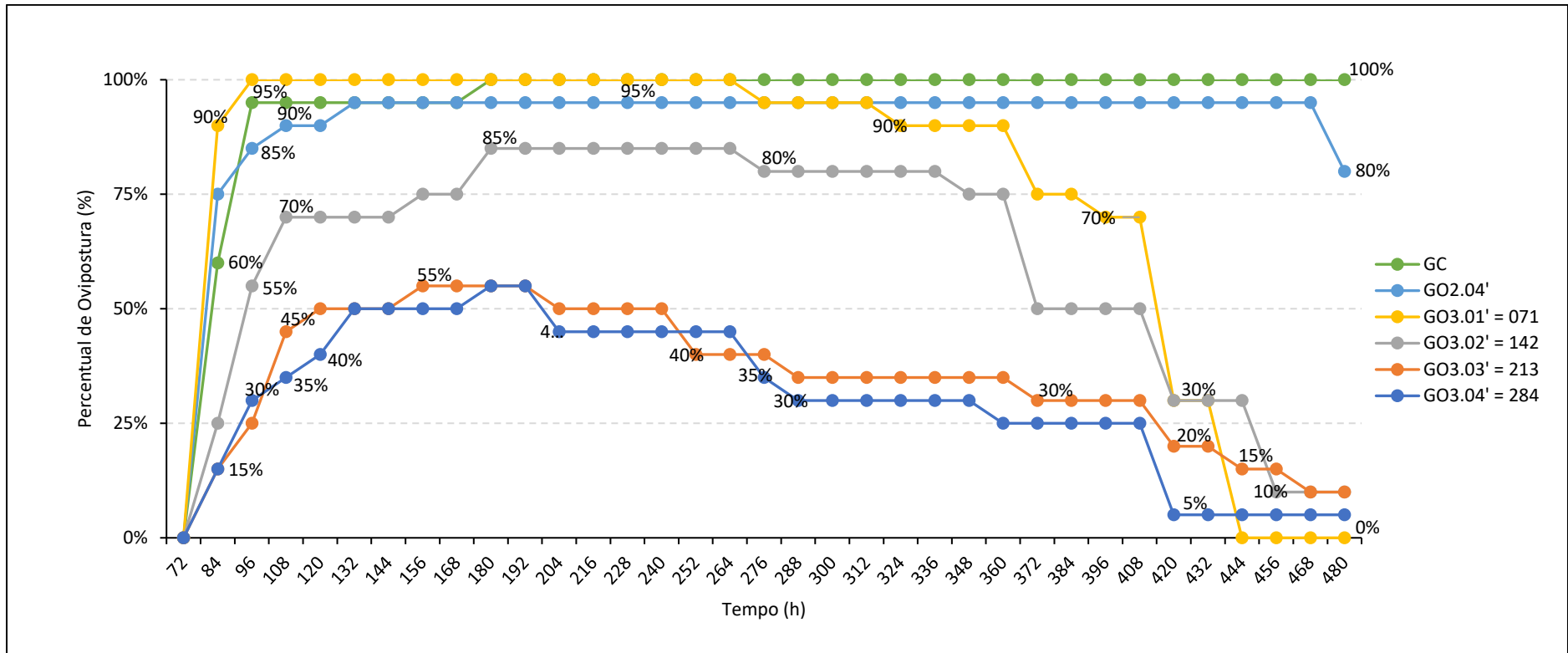


Figura 24 - Evolução do percentual (%) de ovipostura das fêmeas ingurgitadas expostas à mistura oxigênio+ozônio utilizando baixos tempos (e subdoses) para avaliação de efeitos sobre seus parâmetros biológicos.

O intervalo de dias observado entre a coleta e o início da postura (Período de Pré-postura) e entre o início e final da postura (Período de Postura) foi parâmetro de comparação e não apresentaram distribuição normal, sendo sua diferença estatística ($p < 0,05$) observada em cada uma dessas avaliações conforme demonstra a figura 25.

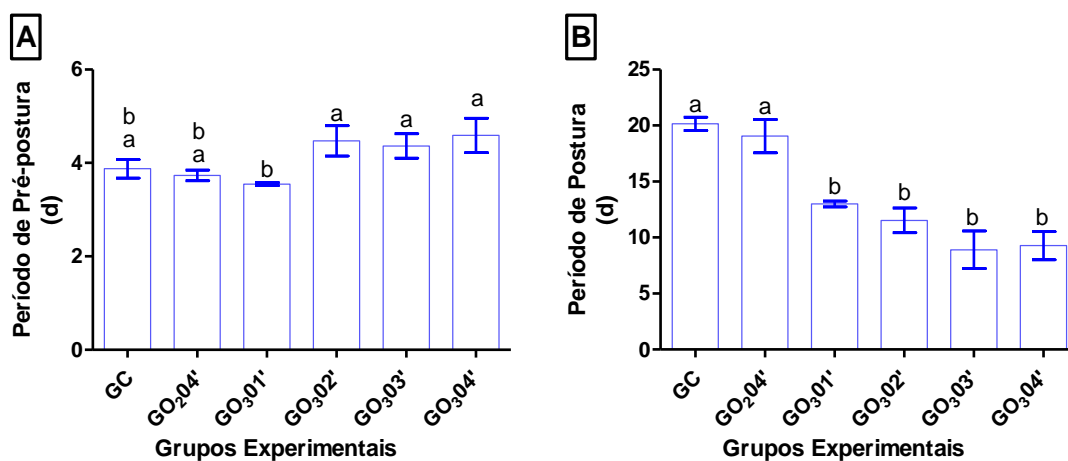


Figura 25 - Comparativo da média \pm erro padrão entre grupos avaliados no Período de Pré-postura e no Período de Postura.

Legenda: (A) Período de Pré-postura; (B) Período de Postura. Média \pm erro padrão da média seguidos de letras iguais não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

Do mesmo modo, o comparativo entre a média \pm erro padrão do Período de Incubação (final da postura e início da eclosão) dos grupos consta na figura 26. Também se encontram os comparativos do percentual médio \pm erro padrão da avaliação de eclodibilidade, observada visualmente nas massas de ovos. Ambos os parâmetros não apresentaram distribuição normal e suas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram sinalizadas na figura.

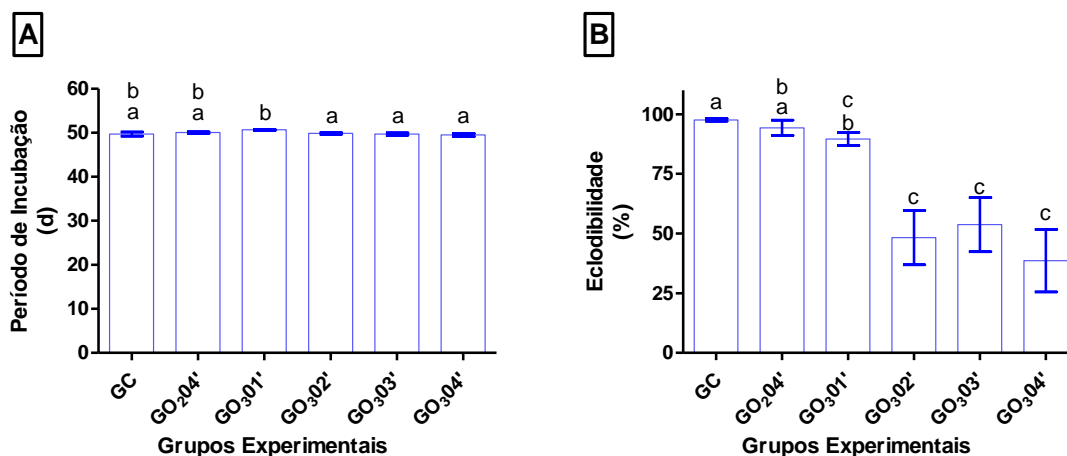


Figura 26 - Comparativo do percentual médio \pm erro padrão dos grupos relacionados ao Período de Incubação e ao Percentual de Eclodibilidade.

Legenda: (A) Período de Incubação (B) Percentual de Eclodibilidade. Média \pm erro padrão da média seguidos de letras iguais não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

A razão existente entre o peso total da massa de ovos (g), em cada tempo de avaliação, sobre o total de fêmeas ingurgitadas que realizaram a postura em todo o período e postura, foi computado e a comparação entre os grupos pode ser observada na figura 27.

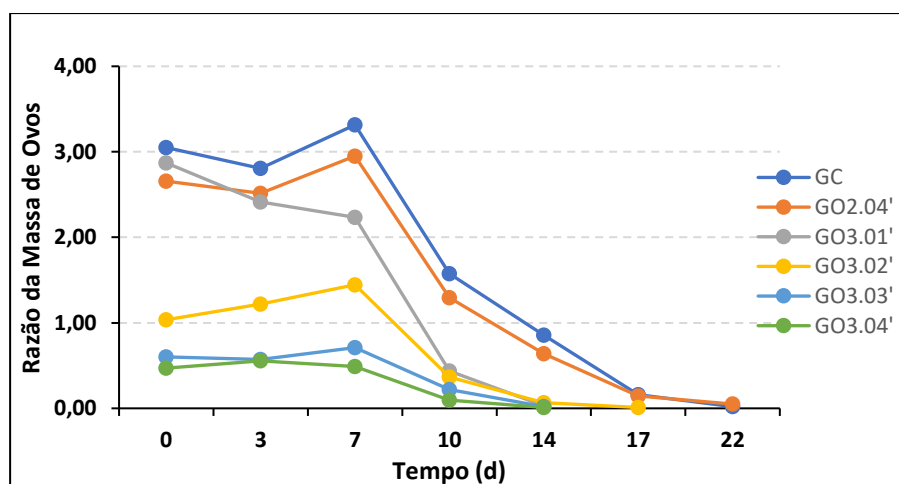


Figura 27 – Evolução da Razão de Oviposição de cada tempo experimental de fêmeas ingurgitadas expostas à subdoses da mistura gasosa oxigênio+ozônio

4.3 Efeito acaricida da mistura gasosa de O_2+O_3 sobre larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O efeito acaricida imediato também foi observado sobre as larvas ($n=339$) de *R. microplus* e encontra-se relacionado na tabela 8, podendo ser comparados os tempos de exposição às doses da mistura gasosa O_2+O_3 , massa total de ozônio, número amostral e mortalidade imediata. Os grupos controles não exposto aos gases (GC; $n=38$) e exposto ao oxigênio por 90 min ($GO_{2.90}$) não apresentaram mortalidade durante o tempo de avaliação.

Tabela 8 - Distribuição percentual do efeito acaricida da mistura oxigênio+ozônio sobre larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* após diferentes tempos de exposição (dose).

Tempo de Exposição (min)	Dose (mg/L.min)	Massa Total de Ozônio (mg)	n.	Mortalidade em até 5 min (%)
25	1.775	221,87	38	5,3%
40	2.840	355,00	38	10,5%
70	4.970	621,25	36	33,3%
73	5.183	647,87	38	42,1%
74	5.254	656,75	38	52,6%
75	5.325	665,62	38	60,5%
80	5.680	710,00	38	76,3%
90	6.390	798,75	37	100,0%

Legenda: n. = número amostral

Do mesmo modo como para as fêmeas ingurgitadas, os dados de mortalidade em larvas permitiram a construção das respectivas curvas dose-resposta, juntamente com a determinação das doses letais (DL_{50} e DL_{95}) e seus correspondentes intervalos de confiança (Figura 28).

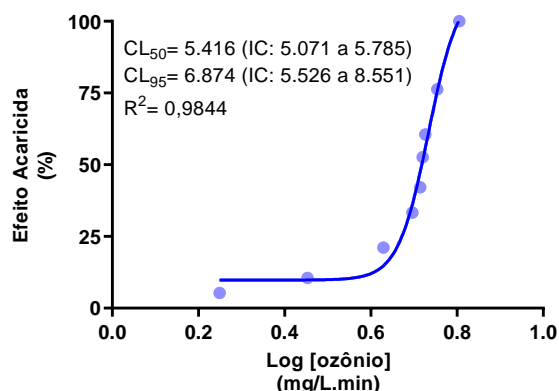


Figura 28 – Curva dose resposta do efeito acaricida imediato observado em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Legenda: DL₅₀ = Dose letal necessária para eliminar 50% da população exposta; DL₉₅ = Dose letal necessária para eliminar 95% da população exposta; IC = Intervalo de confiança; R²= Coeficiente de determinação.

4.4 Efeito acaricida do óleo de girassol ozonizado e da água de osmose reversa ozonizada sobre larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O efeito acaricida após a imersão das larvas por diferentes tempos em solução de óleo de girassol ozonizado por duas (n=573) e quatro horas (n=797), pode ser observado e comparado com a imersão ao óleo de girassol não ozonizado (n=713) e duas soluções carrapaticidas sintéticas comumente utilizadas para controle do parasitismo por carrapatos (figura 29). Da mesma maneira, o efeito após imersão de larvas (n=396) em água de osmose reversa ozonizada por duas horas pode ser comparado ao efeito sobre a imersão na mesma solução sem ozonização (n=444) (figura 30) e pelas mesmas soluções carrapaticidas anteriores. Ambas as avaliações foram controladas positivamente pelos mesmos dois grupos experimentais expostos às duas soluções carrapaticidas sintéticas, a primeira cujo princípio foi a deltametrina (GD.5'; n=150) e a segunda o amitraz à 12,5% (GA.5'; n=111).

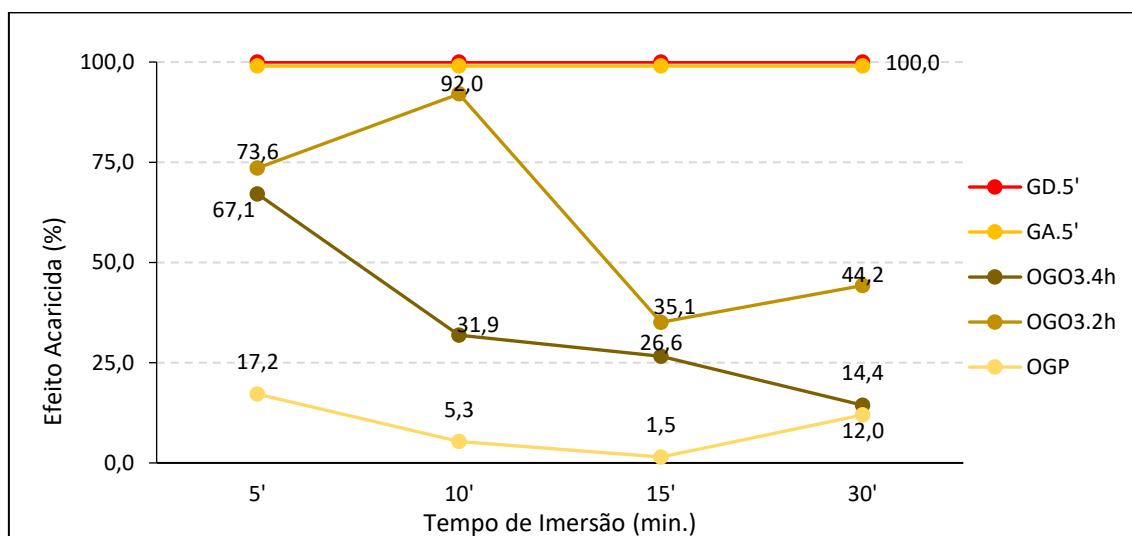


Figura 29 – Comparativo do percentual de efeito acaricida (%) após imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, por diferentes tempos, em óleo de girassol ozonizado por duas (OGO₃.2h) ou quatro (OGO₃.4h) horas, comparado à imersão em óleo de girassol não ozonizado (OGP) e duas soluções carrapaticidas sintéticas (Deltametrina e Amitraz 12,5%).

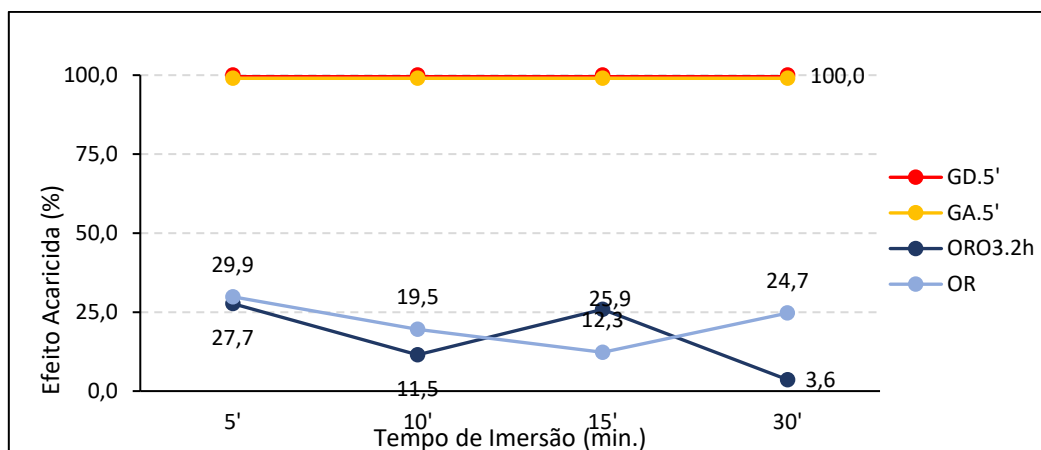


Figura 30 – Efeito acaricida (%) da imersão de larvas de *R. microplus* por diferentes tempos em água de osmose reversa ozonizada por duas horas, comparado à imersão em água de osmose reversa não ozonizada e duas soluções carrapaticidas sintéticas.

A relação entre o efeito acaricida observado nas amostras pertencentes aos grupos experimentais imerso por cada tempo utilizado nos ensaios com óleo de girassol ozonizado ou água de osmose reversa ozonizada encontram-se nas tabelas 9 e 10. Os grupos experimentais GD.5' e GA.5' apresentaram 100% de mortalidade em 5 min de imersão das larvas.

Tabela 9 - Efeitos acaricidas do óleo de girassol ozonizado sobre larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* distribuídas em diferentes grupos experimentais.

Grupo Experimental	Tempo de Imersão (min)	n	Efeito Acaricida (%)	
OG.05'	5	99	17,2	
OG.10'	10	169	5,3	
OG.15'	15	137	1,5	
OG.30'	30	308	12	
Óleo de Girassol	OGO ₃ 2h.05'	87	73,6	
	OGO ₃ 2h.10'	88	92	
	OGO ₃ 2h.15'	208	35,1	
	OGO ₃ 2h.30'	190	44,2	
	OGO ₃ 4h.05'	155	67,1	
	OGO ₃ 4h.10'	138	31,9	
	OGO ₃ 4h.15'	282	26,6	
	OGO ₃ 4h.30'	222	14,4	
	GA.5'	5	111	100
	GD.5'	5	150	100
	Total de Larvas		2.344	

Tabela 10 - Comparativo dos efeitos acaricidas do óleo de girassol ozonizado entre os grupos experimentais.

Grupo Experimental	Tempo de Imersão (min)	n	Efeito Acaricida (%)
Água de Osmose Reversa	OR.05'	77	29,9
	OR.10'	87	19,5
	OR.15'	114	12,3
	OR.30'	166	24,7
	ORO ₃ 2h.05'	112	27,7
	ORO ₃ 2h.10'	61	11,5
	ORO ₃ 2h.15'	112	25,9
	ORO ₃ 2h.30'	111	3,6
	GA.5'	111	100
	GD.5'	150	100
Total de Larvas		840	

4.5 Efeito do Óleo de Girassol Ozonizado sobre Bovino Parasitado

O bovino tratado com óleo de girassol ozonizado foi submetido a dois tratamentos (dia zero e dia 21), sendo monitorado semanalmente nos primeiros 42 dias. A partir dessa data foram realizadas duas novas avaliações, uma no dia 70 e a última com 105 dias, totalizando 15 semanas de acompanhamento. Este acompanhamento ocorreu entre 09 de agosto a 22 de novembro de 2020.

O parasitismo foi avaliado por inspeção visual e seguiu a seguinte classificação: parasitismo muito baixo; parasitismo baixo; parasitismo moderado e parasitismo intenso. Os registros das classificações e a descrição das observações constadas em cada momento de avaliação encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Relatório síntese contendo o grau de parasitismo a cada avaliação seguido de breve descrição das constatações identificadas durante o acompanhamento do bovino parasitado por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e tratado com óleo de girassol ozonizado.

Intervalo de Avaliação	Classificação Do Parasitismo	Descrição
Dia zero	Intenso	Primeiro tratamento. Infestação por carrapatos da espécie <i>R. microplus</i> , que se concentrava na face interna e externa das coxas, barbela, peito, região inguinal e úbere, porém com baixo parasitismo em tronco. Foram identificados apenas machos e fêmeas adultas em diferentes estágios de ingurgitamento. Apresentava grande dermatite no local da infestação em decorrência do parasitismo e foi mantido estabulado individualmente com o fornecimento de água a vontade e alimento segundo rotina nutricional da propriedade leiteira onde se encontrava. O animal apresentava alguns papilomas iniciais concentrados no peito, barbela e face interna da coxa esquerda.
1º sem	Baixo	Redução estimada de 80% do parasitismo e 90% da dermatite.
2ª sem	Muito baixo	Parasitismo estimado em 10%. Ausência de dermatite no local onde havia sido parasitado.
3ª sem	Baixo	Segundo tratamento. Presença de poucos carrapatos na face interna da coxa e barbela.
4ª sem	Muito baixo	Menos de 5 espécimes parasitando o animal.
5ª sem	Muito baixo	Menos de 5 espécimes parasitando o animal.
6ª sem	Muito baixo	Menos de 5 espécimes parasitando o animal. Liberado para piquete próximo aos estábulos, junto com outros poucos animais.

10ª sem	Baixo	Animal livre de parasitismo por carrapatos adultos, porém, com a presença de algumas ninfas dispersas na face interna da coxa e inserção do úbere. Neste momento observou-se a progressão dos papilomas, que aumentaram de tamanho em sua altura e se espalhando ao redor das áreas onde se concentrava. O animal foi transferido para o pasto junto com rebanho de animais de mesma idade e mantidos sob alimentação predominante por pastejo, sendo suplementado por alimentação vegetal preparada triturada ao final de cada dia.
15ª sem	Baixo	Manutenção do estado de parasitismo anterior. A papilomatose encontrava-se em progressão, cobrindo uma área ligeiramente maior que anteriormente observada.

As figuras 31 à 33 registram regiões corporais como peito, pescoço, barbela, úbere, face interna dos membros posteriores, face externa do membro posterior direito e região inguinal sob parasitismo causado por *R. microplus*, e permite comparar a influência do tratamento tópico com óleo de girassol ozonizado no bovino experimentado.



Figura 31 – Registros das principais datas de acompanhamento do parasitismo em região pélvica do bovino: vista do úbere e faces posterior e interna dos membros caudais.

Legenda: Dia 0a = Dia zero, antes do tratamento. Animal mantido em estábulo individual.; Dia 0b = Dia zero, após primeiro tratamento; Dia 07 = Dia sete, após o primeiro tratamento; Dia 14 = Dia quatorze, após primeiro tratamento; Dia 21 = Dia vinte e um, após o primeiro tratamento e data do segundo tratamento; Dia 42 = Dia quarenta e dois, animal liberado para piquete de pastagem; Dia 70 = Dia setenta, animal liberado para pasto; e Dia 105 = Dia cento e cinco, última avaliação.



Figura 32 – Registros das principais datas de acompanhamento do parasitismo no membro posterior direito do bovino: vista lateral.

Legenda: Dia 0a = Dia zero, antes do tratamento. Animal mantido em estábulo individual.; Dia 0b = Dia zero, após primeiro tratamento; Dia 07 = Dia sete, após o primeiro tratamento; Dia 14 = Dia quatorze, após primeiro tratamento; Dia 21 = Dia vinte e um, após o primeiro tratamento e data do segundo tratamento; Dia 42 = Dia quarenta e dois, animal liberado para piquete de pastagem; Dia 70 = Dia setenta, animal liberado para pasto; e Dia 105 = Dia cento e cinco, última avaliação.



Figura 33 – Registros das principais datas de acompanhamento do parasitismo na região do peito, pescoço e barbela antes e após duas semanas do primeiro tratamento tópico com óleo de girassol ozonizado.

Legenda: Dia 0a = Dia zero, antes do tratamento. Animal mantido em estábulo individual.; Dia 0b = Dia zero, após primeiro tratamento; Dia 07 = Dia sete, após o primeiro tratamento; Dia 14 = Dia quatorze, após primeiro tratamento; Dia 21 = Dia vinte e um, após o primeiro tratamento e data do segundo tratamento; Dia 42 = Dia quarenta e dois, animal liberado para piquete de pastagem; Dia 70 = Dia setenta, animal liberado para pasto; e Dia 105 = Dia cento e cinco, última avaliação.

4.6 Efeito do Óleo de Girassol Ozonizado sobre Equino Parasitado

O equino tratado com óleo de girassol ozonizado foi submetido à três aplicações tópicas (dia zero, dia 21 e dia 56) em 84 dias de acompanhamento. Estas avaliações ocorreram a cada sete dias, sendo realizadas treze avaliações entre 13 de setembro a 06 de dezembro de 2020. O acompanhamento foi interrompido devido ao excesso de chuvas que dificultavam o deslocamento e manipulação dos animais, além de interferir diretamente no parasitismo.

Para registro do grau de parasitismo durante as inspeções visual e semiológica, utilizou-se a mesma classificação adotada para o bovino. As classificações registradas a cada semana de avaliação estão apresentadas na tabela 10, juntamente com uma breve descrição dos achados de inspeção visual.

As figuras 34 a 37 exibem registros fotográficos realizados em cada semana experimental, permitindo observar e comparar o parasitismo observado em diferentes regiões anatômicas conforme descrito na tabela 12.

Tabela 12 - Relatório síntese contendo o grau de parasitismo a cada data de avaliação seguido de breve descrição das constatações identificadas durante o acompanhamento do equino parasitado por *Amblyomma* spp. e *Dermacentor nitens* e tratado com óleo de girassol ozonizado

Intervalo de Avaliação	Classificação Do Parasitismo	Descrição
Dia zero	Intenso	Primeiro tratamento. Presença de carrapatos das espécies <i>Amblyomma</i> spp. e <i>Dermacentor nitens</i> , em estágios de ninfa, machos adultos e fêmeas em diferentes estágios de ingurgitamento, localizados nas regiões do pescoço, peito, axila, perianal, inguinal, dorso, orelha interna, frente, base da orelha e próximo a inserção da crina, membros posteriores e anteriores. Animal apresentava-se magro, com intensa seborreia e áreas alopecicas na frente, laterais do pescoço, membros, tronco e garupa. Os pelos encontravam-se longos, quebradiços e opacos. Proprietário refere dificuldade para a alimentação devido à seca e ausência de alimentação suplementar. Sinais clínicos dermatológicos compatíveis com dermatite fúngica foram observados, entretanto não foi realizado diagnóstico laboratorial confirmatório.
1º sem	Muito baixo	Redução de 80 a 90% no parasitismo por ambas as espécies, todavia, havia presença de carrapatos em quase todos os pontos anteriormente identificado, exceto na região frontal da cabeça. Algumas fêmeas ingurgitadas foram identificadas fixas sobre o animal, entretanto, apresentavam-se moribundas, de coloração amarelada e aspecto ligeiramente enrugado. O pelame se encontrava agregado e oleoso.
2ª sem	Muito baixo	A presença de carrapatos nas áreas identificadas anteriormente manteve-se sem evolução, contudo, em estágio de maior ingurgitamento. A espécie de maior presença foi <i>Amblyomma</i> spp.

		Animal ainda se apresentava magro, com progressão das áreas alopécicas do lado esquerdo do pescoço e na lateral direita do membro posterior. Placas de pelos unidos se desprendiam com o auxílio das mãos, deixando a pele exposta. Foi observado melhora da alopecia na frente, onde se manteve sem parasitismo.
3ª sem	Moderado	Segundo tratamento. Abaixo das placas de pelo ainda aderidas ao animal foi identificado grande quantidade de carrapatos em fase de larva muito ingurgitada, por todo o pescoço, tronco e garupa. Após o banho, identificou novas áreas com grande parasitismo, como axilas, face interna dos membros, face externa próxima a região escapular, pescoço, base das orelhas próximo a crina, região pélvica e perianal. O animal apresentava crescimento de pelos nas áreas anteriormente afetadas. Após o início da correção do manejo alimentar, animal iniciava sinais de recuperação de seu escore corporal.
4ª sem	Muito baixo	Redução de 80 a 90% do parasitismo após o segundo tratamento. Presença em baixa quantidade de carrapatos em quase todas as regiões (perianal, tronco, membros, pescoço, inguinal). Ausência de parasitismo na frente, face interna da orelha e entre as orelhas. A maioria das teleóginas apresentavam coloração clara e desidratada, porém, algumas (n=4) encontravam-se bem ingurgitadas e sem anormalidades. Foram observadas ninfas e larvas mortas, totalmente ressecadas, de coloração branca e sinais de ecdise. Também foi constatado redução significativa da alopecia, com bom crescimento do pelame, principalmente na da garupa e pescoço. Animal com escore corporal em melhora e sem seborreia.
5ª sem	Moderado.	Observou-se presença de ambas as espécies de carrapatos concentrados na face interna do jarrete, face interna dos membros anteriores próximos ao peito, região perianal. Vários estágios entravam-se presentes. Cerca de 15 a 20% mortos e esbranquiçados, totalmente ressecados.

		Região de frente, inguinal e entre as orelhas ainda sem carrapatos. Face interna da orelha com poucas larvas ingurgitadas e algumas poucas mortas. Região perianal com diversas ninfas e uma única teleógina. Região do jarrete com todos os estágios e presença das duas espécies, porém, com sinais de ecdise. Face interna da coxa com alguns <i>Amblyomma</i> spp. dispersos se deslocando dorsalmente. Redução quase que completa da alopecia, exceto axila, face interna dos membros anteriores próximos ao peito. Frente muito alopécico, com marcas de arranhões. Escaras na lateral da inserção da cauda.
6ª sem	Moderado	Não houve mudança no estado de parasitismo do animal, mantendo as constatações anteriores. Houve melhora na qualidade da alimentação e já apresentava bom escore corporal. Mudança de clima com início das chuvas.
7ª sem	Baixo	Não foi identificado a presença de carrapatos nos membros dianteiro (face interna) e houve grande redução de carrapatos nos jarretes. Apenas uma das orelhas havia carrapatos em evolução. Peito com parasitismo por alguns machos de <i>Amblyomma</i> spp., sem fêmeas ou outros estágios. Região perianal com parasitismo moderado, inguinal com poucos carrapatos. Retorno do crescimento dos pelos na frente. Ausência de alopecia em outras áreas. Animal bem alimentado e com bom escore corporal.
8ª sem	Baixo	Terceiro tratamento. Presença concentrada na região perianal (principalmente <i>Dermacentor nitens</i>), onde se viam machos adultos e fêmeas adultas jovens, e alguns poucos próximo ao úbere, peito e axilas, principalmente <i>Amblyomma</i> spp.. Poucos carrapatos jovens na orelha.
9ª sem	Muito baixo	Redução de 30% dos carrapatos presente na região perianal. Baixa presença de carrapatos no peito e axilas, próximo ao úbere. Sem parasitismo na orelha e membros.

10ª sem	Muito baixo	Carrapatos das axilas evoluíram para teleóginas, região perianal concentrada por parasitismo predominante estágios de linfa e fêmeas adultas jovens. Ausência de parasitismo na orelha e membros.
11ª sem	Muito baixo	Carrapatos concentrados na região perianal, muitos estágios e presença de poucas teleóginas. Carrapatos dispersos próximos ao úbere e axila. Ausência de parasitismo na orelha e membros.
12ª sem	Baixo	Carrapatos concentrados na região perianal com evolução dos estágios iniciais para diversas teleóginas. Carrapatos dispersos próximos ao úbere e axila.



Figura 34 – Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo na cabeça do equino tratado com óleo ozonizado: vista frontal.



Figura 35 - Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo no pescoço do equino tratado com óleo ozonizado: vista lateral esquerda.



Figura 36 - Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo no pescoço do equino tratado com óleo ozonizado: vista lateral direita.



Figura 37 - Registro cronológico (semanal) de acompanhamento do parasitismo perianal do equino tratado com óleo ozonizado: vista caudal.

5. DISCUSSÃO

Estudos utilizando o gás O₃ para controle de carrapatos são recentes (SZABÓ *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2018; ABREU *et al.*, 2020; ABREU *et al.*, 2021) e buscam atender a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas contra esses artrópodes (OLIVEIRA; PEDRASSANI 2017). Devido sua ampla distribuição mundial (SONENSHINE; ROE, 2014), tornou-se o ectoparasito que mais acomete a população bovina (HURTADO; GIRALDO-RÍOS, 2019). Sua importância advém dos danos à saúde de seus hospedeiros (DEMESSIE; DERSO, 2015; NICHOLSON *et al.*, 2019) e prejuízos econômicos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; GRISI *et al.*, 2014; LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016) que vêm impactando a produtividade de leite, carne e couro (BIANCHI; BARRÉ; MESSAD, 2003; JONGEJAN; UILENBERG, 2004; FURTADO *et al.*, 2013; ESKEZIA; DESTA, 2016; HURTADO; GIRALDO-RÍOS, 2019), em diversas regiões no mundo.

Um agravante se deve ao fato de que a utilização frequentemente inadequada dos carrapaticidas sintéticos disponíveis (FURLONG *et al.*, 2007; TIDWELL *et al.*, 2021) permitem o desenvolvimento de mecanismos de resistência (BIANCHI; BARRÉ; MESSAD, 2003; RECK *et al.*, 2014; TIDWELL *et al.*, 2021) que se perpetua por muitas gerações, motivando a busca frequente por novos compostos e estratégias que promovam melhor enfrentamento e controle desses parasitos.

Devido às suas propriedades físico-químicas, o gás O₃ vem sendo estudado para o controle de diversos artrópodes (HANSEN *et al.*, 2012; JIAN *et al.*, 2013; DARWISH *et al.*, 2019; BOOPATHY *et al.*, 2021), apesar de seu mecanismo letal ainda não ter sido descrito (DONG *et al.*, 2022). Em insetos, cerca de três vias podem estar envolvidas. A primeira envolvendo a frequência respiratória, ao induzir o fechamento dos espiráculos respiratórios, reduzindo a disponibilidade de O₂, impactando seu metabolismo, a segunda refere-se a sua atividade oxidativa propriamente dita, sob componentes moleculares essenciais e a terceira parece se relacionar com a expressão gênica (BALLINGER *et al.*, 2005; HOLMSTRUP *et al.*, 2011; BOOPATHY *et al.*, 2021; DONG *et al.*, 2022).

Há, no entanto, o entendimento de que a distância a ser percorrida pelo O₃ e seus metabólitos nos tecidos e membranas biológicas podem influenciar em seus efeitos (BALLINGER *et al.*, 2005), uma vez que quanto maior a distância a ser percorrida maior possibilidade de interação com biomoléculas.

Considerando os registros da ação acaricida da mistura O₂+O₃ em carrapatos relatada por Oliveira *et al.* 2014; Moreira *et al.* 2017 e Figueiredo *et al.* 2018, buscou-se demonstrar a relação entre diferentes doses desse gás com seus conseguintes efeitos sob larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Isto possibilitou registrar o perfil da mortalidade deste gás, estabelecer suas doses letais e sua influência sobre parâmetros biológicos nessa espécie. Diversas doses foram testadas apresentando efeitos acaricida e efeitos biológicos sobre esta espécie de carrapato.

A atividade acaricida em fêmeas ingurgitadas, obtidas a partir das maiores doses por exposição entre 45 e 105 min (3.195 a 7.455 mg/L.min; Tabela 5), demonstram efeitos letais imediatos, enquanto em doses intermediárias, obtidas entre 5 e 30 min (355 a 2.130 mg/L.min; Tabela 6) de exposição, demonstraram efeitos letais tardios, ambas condições eliminaram 100% dos espécimes expostos sem que estes tivessem iniciado a postura dos ovos. Em larvas, a mistura O₂+O₃ foi testada somente quanto ao efeito acaricida imediato, utilizando doses entre 25 e 90 min (1.775 a 6.390 mg/L.min; Tabela 8).

Durante os ensaios utilizando a mistura O₂+O₃, pôde-se perceber que menores tempos de exposição (menores doses) também apresentaram alta taxa de mortalidade quando avaliados por períodos mais longos (Figura 20), como já identificado para insetos pragas de grãos (DONG *et al.*, 2022). Tanto para fêmeas ingurgitadas quanto para larvas de *R. microplus*, os dados configuraram uma curva dose-resposta de estimulação (MINHO; GASPAR; DOMINGUES, 2016), demonstrando que conforme se aumenta a dose há maior efeito acaricida (Figuras 19 e 28), confirmando sua atividade dose-dependente (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

Avaliando os efeitos imediatos, fêmeas ingurgitadas apresentaram DL₅₀ de 5.950 mg/L.min (IC₉₅=5.825 a 6.077 mg/L.min) e DL₉₅ de 7.187 mg/L.min (IC₉₅=6.606 a 7.819 mg/L.min), e as larvas registraram DL₅₀ de 5.416 mg/L.min

(IC₉₅=5.071 a 5.785 mg/L.min) e DL₉₅ de 6.875 mg/L.min (IC₉₅=5.526 a 8.551 mg/L.min), demonstrando a proximidade e a coerência entre doses e os diferentes estágios do desenvolvimento deste parasito. Em todas as curvas obtidas, o coeficiente de determinação apresentou-se elevado, superior a R²=0,98 (Figuras 19 e 28), assegurando o ajuste da curva aos dados obtidos.

Um resultado diferente foi observado por Szabó *et al.* em 2009. Eles avaliaram os efeitos do gás O₃ sobre ovos, larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas de carrapatos da espécie *R. sanguineus* a partir de um gerador com capacidade de produção de 0,23 mg/min de O₃, por 15, 30 e 45 min. Esta produção gerou, respectivamente, 3,45 mg, 6,90 mg e 10,35 mg de massa de O₃ a que foram expostos cada estágio do parasito, e os autores concluíram que nas condições testadas não observaram efeito acaricida ou nocivo, sugerindo a utilização de períodos de exposição mais prolongados ou a utilização de maior concentração de O₃. Neste trabalho, foi utilizado maior concentração de O₃ por diferentes tempos para avaliar seu efeito acaricida sobre a espécie *R. microplus*. No nosso protocolo utilizamos um gerador cuja capacidade de produção foi de 8,875 mg/min (concentração x vazão), aproximadamente, 3.759 vezes maior, portanto, para os mesmos tempos utilizados por Szabó e colaboradores, produzimos 133,12 mg, 226,25 mg e 399,37 mg de O₃, uma notável diferença entre as quantidades de O₃ disponibilizadas aos espécimes. Por este motivo, a ausência de efeito acaricida observada por aqueles autores e não identificada em nosso trabalho, possivelmente se relacionava à exposição a quantidades insuficientes O₃, não possibilitando necessária atividade tóxica, inviabilizando a observação de efeito acaricida ou biológico naquela metodologia.

Por outro lado, Moreira *et al.* (2017) observaram atividade acaricida do O₃ em fêmeas ingurgitadas de carrapatos da espécie *R. sanguineus*. Eles utilizaram a dose de 9.300 mg/L.min (62 mg/L por 150 min) que correspondeu à produção final de 1.162,5 mg de massa de O₃, observando 100% de mortalidade imediatamente após a exposição e constataram a presença de ulcerações no tegumento e no espiráculo respiratório a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV). No presente estudo, buscamos caracterizar o perfil da relação dose-efeito do O₃ sobre fêmeas ingurgitadas e larvas da espécie *R. microplus*,

sem avaliar possíveis danos a sua superfície tegumentar. Entretanto, observamos o mesmo efeito utilizando uma dose 20% menor (7.455 mg/L.min; Tabela 3 e Figura 20), correspondente a 931,87 mg de massa de O₃, quando todos os espécimes expostos morreram imediatamente após sua exposição. Essa variação pode ser atribuída a existência de diferenças na constituição e fisiologia dos carrapatos, inclusive àqueles pertencentes ao mesmo gênero (REMÉDIO *et al.*, 2014).

Já a atividade acaricida do O₃ sobre a espécie *R. microplus* foi registrada por Figueiredo *et al.* em 2018. Eles sugeriram uma relação dose-dependente e, também, identificaram a presença de ulcerações no tegumento utilizando MEV, semelhantes àquelas observadas por Moreira *et al.* (2017). Estes autores observaram que 1.550 mg/L.min (massa de ozônio=193,75 mg) foi capaz de eliminar 80 a 87% dos espécimes 96 h após sua exposição, enquanto a dose de 3.410 mg/L.min (massa de ozônio=426,25 mg) causou 100% de mortalidade entre 24 e 48 h. Em nosso trabalho utilizamos doses menores que estas, porém, com efeitos mais potentes. A dose de 1.420 mg/L.min (massa de ozônio de 177,5 mg), que apresentou mortalidade de 80% em 36 h após a exposição, chegando a 100% em 48 h (Tabela 6 e Figura 20). Já a dose de 3.195 mg/L.min (massa de ozônio=399,37 mg) apresentou mortalidade de 10% imediatamente após a exposição, atingindo 100% em menos de 4 h (Tabela 5 e Figura 20). Apesar de utilizados recipientes diferentes para acomodação dos espécimes durante a experimentação, todo o circuito foi montado de forma muito semelhante e não acreditamos que esta diferença tenha influenciado. Mas, é possível que as diferenças observadas se devam a evolução do ingurgitamento das fêmeas (REMÉDIO *et al.*, 2014) no momento de sua aquisição, pois, a depender desta condição, haverá diferenças na composição, espessura de seu tegumento (HACHMAN; FILSHIE, 1982) e teor de água (SONENSHINE; ROE, 2014), que podem influenciar a atividade do O₃. Cutículas totalmente distendidas, por exemplo, apesar de se tornarem delgadas, possuem seus canais porosos fechados (HACHMAN; FILSHIE, 1982), o que poderia reduzir a difusão do gás O₃ ou seus derivados, reduzindo sua ação. Nos trabalhos de Abreu *et al.* (2020 e 2021), as alterações histológicas no tegumento e glândula salivar foram

identificadas em fêmeas semi-ingurgitadas, o que talvez não ocorresse ou ocorresse em menor quantidade se utilizadas fêmeas-totalmente ingurgitadas. Moreira *et al.* 2017 e Figueiredo *et al.* 2018, também, observaram tais alterações analisadas por MEV na superfície tegumentar de carrapatos. Estas alterações encontradas por Abreu *et al.* 2020, foram histologicamente observadas após a imersão de fêmeas semi-ingurgitadas em água ozonizada, porém, possivelmente, devido à baixa concentração de ozônio presente na água, o grau de lesão foi menor, mas suficientemente capaz de caracterizar uma metaplasia na barreira epitelial. Estas alterações podem ter ocorrido também após diferentes doses que utilizamos, levando não somente a lesões diretas como, possivelmente, a alterações bioquímicas graves capazes de limitar a sobrevivência desses parasitos sem que fossem capazes de promover sua reparação. Estas constatações, provavelmente, registram as consequências da atividade direta e do estresse oxidativo promovido pelo O₃, determinando o dano molecular e celular presente na constituição do tegumento dos carrapatos. Como até mesmo as doses intermediárias, utilizadas em nosso trabalho, eliminaram todos os espécimes expostos, requerendo para isto maior tempo de observação (180 h; Figura 20), desconfia-se que as alterações promovidas pelo O₃ neste experimento possam, de fato, ser irreversíveis, como cita Abreu *et al.* 2020. Como consequência, levando-os posteriormente a morte em diferentes momentos por mecanismos e vias ainda a se esclarecer. Porém, mais ensaios devem ser realizados na avaliação da ação do O₃ (ou seus metabolitos) sobre constituintes moleculares da cutícula de carrapatos e no metabolismo oxidativo.

A investigação da influência do O₃ sobre parâmetros biológicos foi possível a partir da exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* a subdoses da mistura O₂+O₃, obtidas entre 1 e 4 min (71 a 284 mg/L.min; Tabela 7). Assim como observado nas doses entre 5 e 105 min (355 a 7.455 mg/L.min; Tabelas 5 e 6), mesmo se utilizando rápida exposição (subdoses) observou-se uma mortalidade proporcional à dose, marcadamente registrada às 360 h de experimentação, demonstrando a manutenção de um efeito dose-dependente à longo prazo.

Após exposição entre 1 e 4 min, observou-se efeito acaricida antes mesmo do início da postura de ovos, que ocorreu 84 h (3,5 d.) após a exposição dos grupos expostos entre 2 e 4 min, tornando-se progressivamente maior entre aqueles expostos por 3 e 4 min (Figura 22). O grupo exposto por 2 min apresentou maior mortalidade a partir de 240 h (10 d.) e o grupo exposto por 1 min iniciou a mortalidade 276 h (11,5 d.) após a exposição, apresentando maior crescimento a partir de 360 h (15 d.). Após 420 h (17,5 d.) da exposição inicial, a mortalidade entre os grupos expostos era igual ou superior a 70%. Esse mesmo momento, o grupo exposto somente ao O₂ apresentava 5% de mortalidade, enquanto o grupo sem exposição não registrou mortalidade. Este cenário caracterizou que as subdoses utilizadas promoveram efeito letal durante o período em que se esperava a postura de ovos, o que não foi observado nos grupos controles.

Apesar de não termos identificado trabalhos avaliando a influência do O₃ sobre os parâmetros biológicos de carrapatos, há aqueles que avaliaram diferentes compostos químicos ou fitoterápicos para o controle de carrapatos, considerando sua influência sobre parâmetros biológicos variados.

Os primeiros parâmetros biológicos avaliados foram o peso inicial das fêmeas ingurgitadas, peso das quenógenas e o peso da massa de ovos dos grupos expostos entre 1 e 4 min ao O₃ (Figura 21). Devido a uniformidade na distribuição entre os grupos, os pesos médios dos grupos de fêmeas ingurgitadas não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$; Figura 21A), estando todos entre 197 e 210 mg. Segundo Gaxiola-Camacho *et al.* (2009), estudos sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* deve considerar o peso mínimo de 160 mg, uma vez que a massa de ovos, o número de ovos e suas viabilidades serão menores em fêmeas de menor peso, não sendo uma representação confiável. Logo, fêmeas ingurgitadas mais pesadas, apresentam valores mais altos no número de ovos postos.

Inversamente ao que observamos anteriormente, o peso das quenógenas se apresentou maior conforme o aumento da dose de ozônio utilizada, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos grupos controles a partir da exposição realizada por 2 min (141 mg/L.min; Figura 21B). Quando há natural conversão

nutricional e todo mecanismo para a oviposição encontra-se fisiologicamente funcional, espera-se que o peso das quenógenas sejam inversamente proporcional a massa de ovos produzida, uma vez que, quanto menos ovos produzirem ou depositarem, maior será seu peso final. Bennett (1974) menciona que o peso final das fêmeas ingurgitadas após a oviposição representa o exoesqueleto, tecidos reprodutivos residuais e os subprodutos do metabolismo, e sua diferença para o peso inicial é valor próximo aos nutrientes disponíveis para a conversão de ovos. Sendo assim, considerando a ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) entre os pesos iniciais das fêmeas ingurgitadas, a presença dessas diferenças nos pesos finais (quenógenas) sugere baixa conversão nutricional em ovos, sendo este um possível efeito do O_3 . Deve-se considerar também que, apesar não ter sido objeto de avaliação, é possível que os danos anatômicos ou fisiológicos possam ter ocorrido no mecanismo de postura de ovos, limitando sua oviposição. Segundo Sonenshine e Roe (2014), a vagina cervical é o segmento mais altamente muscularizado do trato reprodutivo feminino em carrapatos, sugerindo que este órgão é especialmente importante para forçar os ovos para fora do sistema durante a oviposição, uma vez que não há um ovipositor separado. Anatomicamente, a vagina cervical encontra-se muito próxima a abertura genital, podendo sua musculatura lisa ter sido um alvo da atividade oxidativa do O_3 .

Na avaliação do peso total da massa de ovos, também se constatou relação inversa (Figura 21B e C), onde os grupos controles apresentaram maior peso em sua massa de ovos, sem diferença estatística ($p > 0,05$) entre eles. No entanto, quando avaliado com os grupos expostos ao O_3 , o peso da massa de ovos foi menor conforme o aumento da dose utilizada, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos grupos controles a partir da exposição por 1 min (Figura 21C). Quando comparado ao grupo não exposto, a redução das médias de produção da massa de ovos ficou entre 32% e 75% nos grupos expostos ao O_3 . Em um estudo recente (BRUDNIEWSKI *et al.*, 2020), o peso da massa de ovos oriundos de fêmeas ingurgitadas imersas por cinco minutos em diferentes compostos fitoterápicos, como o óleo de neem, extrato hidroalcolico de citronela e extrato hidroalcolico de noni e o peso da massa de ovos não

apresentaram diferenças quando comparado ao grupo controle não tratado, diferentemente do grupo tratado com o carrapaticida cipermetrina que não permitiu a postura de ovos. A cipermetrina é um carrapaticida de contato integrante do grupo dos piretróides sintéticos, juntamente com a deltametrina e a alfametrina, que por apresentar poder residual, favoreceu o desenvolvimento de resistência (FURLONG, 2005). Por outro lado, uma dificuldade quanto ao uso de extratos vegetais para controle de carrapatos é a perda e eficiência dos extratos vegetais quando testados em animais (BORGES; SOUZA; BARBOSA, 2011). Como ressaltamos, o O₃ se destaca por não induzir a resistência e não deixa resíduos (PASSOS *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2015) e vislumbramos seus efeitos *in vivo* em duas espécies diferentes (Tabela 11 e 12 e Figuras 31 a 37). Em nossa avaliação, a exposição às subdoses de O₃ foi capaz de reduzir o peso médio da massa de ovos de forma proporcional a dose quando comparado com os grupos controles, possivelmente por reduzir sua produção ou sua postura, sendo esta redução um parâmetro desejado para o controle da população de carrapatos.

Após a queda ou a remoção de uma fêmea ingurgitada de *R. microplus* de seu hospedeiro, iniciam-se diversas transformações fisiológicas na direção da oviposição, como a maturação dos ovários e a produção e a maturação dos ovos (GARCIA *et al.*, 2019). Toda essa fase é compreendida por diferentes períodos, conforme o evento biológico envolvido. O primeiro período, período de pré-postura (denominado de período de pré-oviposição por SONENSHINE; ROE, 2014 e CRUZ *et al.*, 2020), é aquele compreendido entre saída de seu hospedeiro e o início da postura dos ovos, momento este em que se inicia o período de postura. Após a postura dos ovos inicia-se seu período de incubação, que se encerra a partir da eclosão da primeira larva. Dessa feita, a avaliação do período de pré-postura demonstrou ser maior nos grupos expostos ao O₃ por 2 a 4 min (4,36 e 4,59 dias), apesar de nenhuma das exposições terem promovido diferenças estatísticas ($p > 0,05$), comparativamente aos grupos controles (GC=3,88 e GO₂₀₄'=3,73 dias) (Figura 25A). Diferença estatisticamente ($p < 0,05$) ocorreu somente entre o grupo exposto por 1 min ao O₃ quando comparado aos demais grupos também expostos. As médias de cada grupo estiveram entre o

intervalo de 3,55 e 4,59 dias, o mesmo relatado por Garcia *et al.* em 2019 (3 a 5 dias) e observado em três das cinco avaliações realizadas por Cruz *et al.* (2020). Sonenshine; Roe (2014) registraram um intervalo de 3 a 4 dias, e Furlong, Martins e Prata (2003) registraram um intervalo menor, de 2 a 3 dias. É possível que em 20 anos, acompanhando as mudanças climáticas, os carrapatos da espécie *R. microplus* tenham se adaptado e ajustado seu ciclo biológico para sua melhor reprodutividade, uma vez a umidade, temperatura e fotoperíodo influenciam diretamente em seu ciclo biológico.

Apesar de não ter ocorrido diferenças significativas a partir da análise estatística ($p > 0,05$) no período de pré-postura, o período de postura apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), sendo menor em todos os grupos expostos ao O_3 entre 1 e 4 min quando comparado aos dos grupos controles (Figura 25B). Os grupos controles sem exposição (GC) e expostos ao O_2 (GO_{204}) apresentaram média de 20,2 e 19,1 dias, respectivamente, enquanto os grupos expostos ao O_3 por 1 a 4 min apresentaram 13,0, 11,5, 8,91 e 9,27 dias, respectivamente, uma redução entre 35 e 56%. O período de postura natural variou de 9,77 a 23,43 dias nos estudos de Cruz *et al.* (2020), sendo o maior período registrado na época da seca e o menor na época das chuvas. Nossos ensaios se iniciaram no início do mês junho, condição marcada por temperaturas amenas e ausência de chuvas, e os resultados dos grupos controle se aproximam do estudo realizado por Cruz *et al.* (2020), demonstrando comportamento fisiológico dos espécimes não expostos, o que não foi observado naqueles expostos ao O_3 .

A figura 24 exhibe o percentual das fêmeas ingurgitadas em oviposição ao longo de todo o período de postura. Nele, pode-se perceber um comportamento distinto entre os grupos controles e aqueles expostos ao O_3 , que exibiram baixos percentuais de fêmeas ingurgitadas em oviposição quando expostas por 2 a 4 min ao O_3 , comparativamente aos grupos controles. Nesta mesma demonstração, foi possível identificar que os grupos expostos por 3 e 4 min alcançaram no máximo de 55% de fêmeas em ovipostura, enquanto aqueles expostos por 1 e 2 min chegaram a apresentar 100% de sua teleóginas em postura de ovos. Apesar dessa diferença, a redução no período de postura foi semelhante em todos os quatro grupos expostos ao O_3 (Figura 25B), sendo

menor e estatisticamente diferente ($p < 0,05$), quando comparado aos grupos controle, que se mantinham em elevado percentual de fêmeas em postura durante o tempo de avaliação.

O período de incubação (Figura 26A) e o percentual de eclosão da massa de ovos (Figura 26B) também foram avaliados. No entanto, não se observou diferença estatística ($p > 0,05$) entre o período de incubação dos ovos dos grupos expostos ao O_3 comparado aos grupos controles. Existindo diferença significativa ($p < 0,05$) somente entre o grupo exposto ao O_3 por 1 min e os demais grupos também expostos. O período de incubação observado nos cinco grupos experimentais esteve entre 49,5 dias (GO_304') e 50,7 (GO_301') dias. Condição semelhante foi observada por Oliveira e colaboradores em 2020, quando os grupos tratados com diferentes doses de acetilcarvacrol não apresentaram diferenças estatísticas com os grupos controles, o que não foi observado entre os grupos expostos às doses de 2,1 e 6,5 $\mu\text{L/mL}$. Em nenhum desses casos, esta variação interferiu nos demais resultados. O período para a eclosão das larvas foi apontado como sendo, em média, de quatro semanas – 28 dias – aproximadamente (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003), podendo apresentar variação segundo a temperatura e umidade. Acreditamos que o maior período de incubação observado em nossos resultados tenha sido influenciado pelo fato dos ensaios terem ocorrido no período de inverno, onde a média da temperatura e umidade são mais baixas, podendo apresentar um intervalo três vezes superior (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003).

Por outro lado, ao avaliar o percentual de eclosão (eclodibilidade) da massa de ovos, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre todos os grupos expostos ao O_3 por 1 a 4 min (média=89,6%, 48,2%, 53,8% e 38,6%), comparativamente ao grupo não exposto (GC; média=97,6%) (Figura 26B). Somente a partir da exposição realizada por 2 min observou-se diferenças estatísticas ($p < 0,05$) também quanto ao grupo exposto somente ao O_2 (GO_204' ; média=94,3%). Os resultados de eclodibilidade natural em *R. microplus*, observados por Ma *et al.* (2016) foram semelhantes ($96 \pm 4\%$) ao que observamos. No estudo de Brudniewski *et al.* (2020), observou-se pequena queda nos valores absolutos da taxa de eclodibilidade nos grupos cujas

teleóginas haviam sido imersas em compostos fitoterápicos, como o óleo de neem, extrato hidroalcoólico de citronela e extrato hidroalcoólico de noni, quando comparado ao grupo controle, apesar de não terem apresentado diferenças estatísticas. Já o acetilcarvacrol nas doses de 6,5 e 8,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ proporcionaram redução na eclodibilidade de ovos de fêmeas ingurgitadas *R. sanguineus* imersas por 5 min (OLIVEIRA *et al.*, 2020), correspondendo aproximadamente à redução de 74% e 83% da eclosão, respectivamente. Esta redução não foi observada por Pereira Junior *et al.* (2019) quando imergiram fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* por 5 min em solução de carvacrol, composto não acetilado do acetilcarvacrol. Adicionalmente, em nossa avaliação, a exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* por 1 a 4 min ao O_3 , além de reduzir a massa de ovos (Figura 21C), também foi capaz de reduzir o percentual de eclosão dos ovos produzidos quando comparado ao grupo não exposto (GC), registrando percentuais de redução de, aproximadamente, 45 a 60% na média de eclodibilidade nos tempos de exposição entre 2 e 4 min.

A fim de se avaliar a produtividade de ovos a cada intervalo de avaliação durante o período de postura, comparou-se a razão existente entre o peso total da massa de ovos e a quantidade de fêmeas em ovipostura (Figura 27) de todos os grupos expostos entre 1 e 4 min, bem como seus respectivos controles. Nesta avaliação, os grupos controles apresentaram comportamentos semelhantes, apesar do grupo sem exposição (GC) ter apresentado registro da massa de ovos sempre superior em cada intervalo de avaliação, ambos os grupos apresentaram postura de ovos até 22 dias de observação. O grupo exposto por 1 min apresentou a segunda maior massa de ovos na primeira pesagem, ficando atrás somente do grupo controle não exposto (GC), caindo progressivamente até o décimo quarto dia. Os grupos expostos por 2 e 3 min apresentaram resultado crescente em suas pesagens de ovos até o sétimo dia, quando iniciaram a queda até o décimo sétimo dia para o primeiro e até o décimo quarto dia para o segundo. O grupo exposto por 4 min ao O_3 apresentou a mais baixa produção de ovos em todos os tempos, mantendo um comportamento estável até o sétimo dia, quando iniciou sua queda até o décimo quarto dia. Em termos gerais, todos os grupos apresentaram a maior concentração de sua postura de ovos nos

primeiros sete dias (77,8% a 94,2%), porém, os grupos expostos ao ozônio apresentaram média entre si de 91,4%, enquanto nos grupos controles foi de 78,5%. Ma *et al.* em 2016, registrou que picos normais na produção de ovos de *R. microplus* ocorriam entre 2 e 4 dias, finalizando em 10 dias a oviposição. Naquele experimento, os carrapatos foram mantidos em incubadora com temperatura, umidade e ciclo de luz regulados, diferentemente do que fizemos, onde os carrapatos foram coletados de animais naturalmente expostos e acompanhados sobre condições naturais de temperatura, umidade e luminosidade.

O IER (MÉLENDEZ *et al.*, 1998), IPO e IN (BENNETT, 1974), são cálculos frequentemente utilizados para avaliar diversos ensaios que visam a eliminação ou o controle de carrapatos. São obtidos a partir da massa de ovos, peso das fêmeas ingurgitadas antes e após a postura e percentual de eclodibilidade. Considerando a baixa massa de ovos e o percentual reduzido de eclodibilidade observados nos grupos expostos ao O₃ entre 1 e 4 min, os resultados do IER foram menores progressivamente conforme maior o tempo de exposição (IER=0,354 a 0,059). Todos estes grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) do grupo não exposto (GC; IER=0,585) e, a partir da exposição por 2 min (GO₃02'; IER=0,131), também apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle exposto somente ao O₂ (GO₂04'; IER=0,505) (Figura 23A). Esses resultados demonstram que os grupos expostos ao O₃, especialmente entre 2 e 4 min, tiveram sua eficiência reprodutiva reduzida comparativamente aos grupos controle. A eficiência reprodutiva após imersão em extrato hidroalcoólico de citronela foi observada (BRUDNIEWSKI *et al.*, 2020), no entanto, não se identificou diferenças estatísticas quando utilizado o óleo de neem e o extrato hidroalcoólico de noni.

Resultados semelhantes foram observados na avaliação do IN (Figura 23B), quando todos os grupos expostos ao O₃ por 1 a 4 min (IN=56,0 a 22,8) apresentaram um índice inferior e estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do grupo não exposto (GC; IN=79,2). E, do mesmo modo como visto anteriormente, os três grupos expostos entre 2 e 4 min também foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) e inferiores ao grupo exposto somente ao O₂ (GO₂04'; IN=71,5).

Progressiva redução nos valores absolutos também foram observados no IPO (Figura 23C). E, assim como visto no IER e IN, todos os grupos expostos ao O₃ entre 1 e 4 min (IPO=39,4 a 13,9) obtiveram resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$) e inferiores ao grupo não exposto (GC; IPO=60,6) e, somente o grupo exposto por 1 min não apresentou resultado estatisticamente diferente ($p>0,05$) do grupo tratado somente com O₂ (GO₂04'; IPO=54,1). A redução na média do IPO observada após exposição ao ozônio por 1 a 4 min variou de 35% a 77%. Silva *et al.* (2020) registraram, em uma avaliação de sensibilidade à campo em uma determinada propriedade, que a cipermetrina 20% e o amitraz 12,5% impediram a oviposição de teleóginas imersas por 5 min, entretanto, nesta mesma propriedade, o diclorvós 45% + cipermetrina 5%; cipermetrina 15%; deltametrina 2,5% não impediram, mas reduziram significativamente sua produção. Por outro lado, a imersão de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* por 5 min em soluções com acetilcarvacrol, um constituinte químico presente em espécies de plantas medicinais e aromáticas (KULISIC *et al.*, 2004), já apontado com alta eficácia contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (GONÇALVES *et al.*, 2019) e baixa toxicidade para mamíferos (ANDRE *et al.*, 2016), não influenciou o IPO nas doses 2,1, 3,5, e 6,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ comparativamente aos seus grupos controles, o que não ocorreu na dose de 8,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. É sabido que carrapaticidas sintéticos comerciais consagrados no controle do parasitismo por carrapatos em bovinos apresentam toxicidade (OLIVEIRA; PEDRASSANI, 2017), efeito em organismos não alvo (HURTADO; GIRALDO-RIOS, 2018; FURTADO *et al.*, 2013) e desenvolvimento de resistência (RECK *et al.*, 2014). Estes fatos podem explicar a variação nos resultados vistos por Silva *et al.* (2020). Somente na maior dose utilizada (8,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$), o acetilcarvacrol foi capaz de reduzir aproximadamente 52% o IPO em *R. sanguineus* e, como pode-se perceber, a exposição de *R. microplus* ao O₃ por 1 a 4 min foram estatisticamente menores ($p<0,05$) comparado ao grupo controle não exposto (GC), com redução média de 77% no IPO na exposição realizada por 4 min.

O conjunto desses resultados representados pelos índices e caracterizados pela visualização da dinâmica de oviposição (Figura 24) revelam de forma consistentemente a influência do O₃ sobre os parâmetros biológicos de

reprodutividade de carrapatos *R. microplus*, uma vez que não somente foi capaz de impactar em sua conversão nutricional, reduzindo o tempo de postura e a produção de ovos, como também tornando-os menos viáveis. Tais efeitos tóxicos produzidos pelo O₃ apontam para sua interferência sobre distintas vias metabólicas e fisiológicas, configurando seus benefícios para a realização de controle biológico nessa espécie.

As larvas carrapatos haviam sido expostas ao O₃ (SZABÓ *et al.*, 2009). Naquele trabalho, utilizou-se larvas de *R. sanguineus*, que foram expostas às mesmas massas de ozônio (3,45 mg, 6,90 mg e 10,35 mg) que a que haviam sido utilizadas em fêmeas ingurgitadas. Naquela avaliação, as larvas encontravam-se ingurgitadas, diferentemente daquelas que utilizamos, e os autores não identificaram alterações significativas nos parâmetros biológicos avaliados. Entendemos que, pelo mesmo motivo ocorrido em fêmeas ingurgitadas, a ausência de efeito sobre as larvas registrado por aqueles pesquisadores seja devido ao fato de terem utilizado uma dose muito reduzida de O₃. Nossos dados mostram um efeito acaricida proporcional à dose utilizada, configurando uma relação dose-dependente (Tabela 8 e Figura 28). As larvas foram expostas a nove doses entre 1.775 e 6.390 mg/L.min (Tabela 8), e apresentaram a DL₅₀ de 5.416 mg/L.min e DL₉₅ de 6.874 mg/L.min (Figura 28). Todas estas doses utilizadas apresentaram efeito acaricida imediatamente após a exposição, no entanto, requereu-se menores doses para apresentar os mesmos efeitos quando comparado às fêmeas ingurgitadas. Presumivelmente, isso se deve ao fato de as larvas possuírem uma constituição tegumentar distintas das fêmeas ingurgitadas (BEADLE, 1974), de forma que a presença de elevado número de canais cuticulares (HACHMAN; FILSHIE, 1982), principalmente na região dorsal (BEADLE, 1974), e sua respiração por difusão cuticular (SONENSHINE; ROE, 2014), possam ter possibilitado maior penetração do gás O₃ (e seus metabolitos) e, conseqüentemente, danos estruturais e moleculares permanentes, comprometendo sua sobrevivência.

Outras possibilidades se devem a espessura da cutícula muito maior em fêmeas ingurgitadas (FURLONG *et al.*, 2007; BEADLE, 1974) e a presença de diversos constituintes moleculares em superfície tegumentar, em especial

aqueles contendo hidrocarbonetos como os lipídeos (RENTHAL *et al.*, 2019). Ambas estas condições forneceriam maior resistência aos efeitos do O₃ quando comparado às larvas, requerendo maior dose para sua atividade acaricida.

As larvas de *R. microplus* também foram expostas ao O₃ através do óleo de girassol (Figura 29) ou água de osmose reversa (Figura 30), ozonizados. Nestes ensaios, grupos de larvas foram submersas em intervalos de cinco minutos, entre 5 e 30 min, e comparadas aos grupos controles utilizando o mesmo veículo ou carrapaticida convencional. Em todos estes dois formatos as soluções carrapaticidas convencionais utilizadas como controle foram o amitraz 12,5% e a deltametrina. Em ambos os grupos expostos às soluções carrapaticidas convencionais, a mortalidade alcançou 100% já no primeiro tempo de avaliação, em 5 min, não necessitando realizar nos demais tempos. O óleo de girassol ozonizado foi preparado por 2 h ou 4 h ozonização, enquanto a água de osmose reversa foi ozonizada por 2 h somente. A mortalidade foi registrada a partir da ausência de deslocamentos sobre a superfície do lenço de papel, mesmo que as larvas apresentassem movimentos de seus membros, do mesmo modo como por Singh *et al.* (2018).

Nos ensaios com óleo de girassol ozonizado (Figura 29), todos os grupos apresentaram percentuais de mortalidade em todos os tempos de imersão avaliados. O óleo de girassol ozonizado por 2 horas teve melhor desempenho que os demais grupos imersos em óleo em todos os tempos, chegando a alcançar 92% de mortalidade em larvas imersas por 10 min. Já o óleo de girassol ozonizado por 4 h apresentou melhor efeito no tempo de 5 min, quando eliminou 67,1% das larvas. A partir desse tempo, seu efeito foi reduzindo progressivamente até 14,4% no tempo de 30 min, muito próximo ao valor (12%) observado no grupo controle utilizando óleo de girassol sem ozonização. Este grupo controle apresentou resultado inicial de 17,2% de mortalidade e caiu para 5,3% e 1,5% nos tempos de 10 e 15 min. Em teleóginas, o óleo poderia provocar asfixia nos carrapatos pelo bloqueio de seus espiráculos respiratórios (AGNOLIN *et al.*, 2014), no entanto, apesar dessa estrutura ser ausente em larvas, (SONENSHINE; ROE, 2014), seu efeito pode ter sido o mesmo ao impedir sua respiração por difusão cutânea, o que poderia explicar a presença de efeito

tóxico no grupo imerso em óleo de girassol sem ozonização. Este efeito foi maior naqueles grupos cujo óleo de girassol havia sido ozonizado, apontando que o contato direto do ozônio difundido sobre as larvas, ou pela presença de compostos formados a partir da ozonização, tenha desempenhado atividade acaricida.

Por outro lado, já se sabe que a variação de pH, temperatura ou a presença de espécies iônicas nas soluções influenciam na decomposição do ozônio (SOTELO et al., 1987), condições estas que podem ter se modificado durante exposições feitas por maiores intervalos de tempo, como 15 e 30 minutos. Além disso, é possível que o processo de ozonização do óleo por maior período tenha promovido oxidação excessiva de seus componentes a ponto de eliminar ou reduzir a presença dos compostos tóxicos para o carrapato.

Quanto aos grupos imersos em água de osmose reversa ozonizada ou não, ambos apresentaram efeito carrapaticida (Figura 30). A imersão de larvas em água de osmose reversa não ozonizada apresentou efeito superior à água de osmose reversa ozonizada, nos tempos 5, 10 e 30 min, chegando a alcançar efeito de 30% de mortalidade, aproximadamente. Por outro lado, a água de osmose reversa ozonizada apresentou mais que o dobro de mortalidade (26%) quando comparado ao grupo controle não ozonizado (12,3%), no tempo de 15 minutos. Apesar disso, nenhum efeito superior a 30% de mortalidade foi observado em qualquer tempo utilizando água de osmose reversa.

Larvas de *R. microplus* foram imersas por cinco minutos em compostos fitoterápicos como o óleo de neem, extrato hidroalcolico de citronela e extrato hidroalcolico de noni (BRUDNIEWSKI et al., 2020). Nesse mesmo trabalho, o extrato hidroalcolico de citronela foi o único composto fitoterápico que apresentou significativa mortalidade, e a cipermetrina foi a que apresentou a maior mortalidade.

Minho et al. (2020) observaram que 32 de 35 extratos vegetais não apresentaram efeito acaricida em larvas de *R. microplus* 24h após sua imersão. Apenas os extratos de *S. brasiliensis* (23,3%), *E. uniflora* (61,6%) e *S. lentiscifolius* (100%; dose 50 mg.mL) apresentaram efeito acaricida. Do mesmo modo, 11 óleos essenciais extraídos de espécies vegetais apresentaram

mortalidade entre 54% e 100% 24h após imersão das larvas de *R. microplus* (CHAGAS *et al.*, 2016). Todos estes compostos naturais possuem grande variação em sua composição e, portanto, podem apresentar grande variação em suas atividades, como é o caso do carvacrol e o timol, já tendo sido observado efeito acaricida para estes dois componentes em trabalhos anteriores (MENDES *et al.*, 2011; SCOLARICK *et al.*, 2012).

A avaliação dos efeitos de diferentes carrapaticidas comerciais em duas propriedades no estado de Rondônia demonstrou que após 24h da imersão de larvas por 5 min, compostos como diclorvós 45% + cipermetrina 5%; cipermetrina 15%; cipermetrina 20%; amitraz 12,5%; deltametrina 2,5%; fipronil 1% apresentaram efeito acaricida entre 45% à 100% (SILVA *et al.*, 2020). Devido as características físico-químicas do O₃, mencionadas anteriormente, nossos ensaios de imersão foram realizados a partir de metodologia diferente, com diferentes tempos de imersão e resultados registrados imediatamente após a exposição, não aguardando 24h para sua análise.

Quando submersos em água, carrapatos podem sobreviver por longos períodos, possivelmente devido a respiração por plastrão (SONENSHINE; ROE, 2014). Trata-se de uma fina camada de ar mantida por estruturas cuticulares entre o tegumento e a água, que pode permitir a extração de oxigênio da água mantendo sua respiração ativa (FILDEN *et al.*, 2011), no entanto, esta mesma interface ar-água, pode ter sido uma barreira de proteção aos efeitos acaricidas imediatos do ozônio difundido na água durante o período de exposição.

Protocolos experimentais *in vivo* foram realizados em um bovino e um equino, utilizando banhos com solução de óleo de girassol ozonizada por 4 h. O bovino recebeu duas aplicações em zero (0) e 21 dias, e foi acompanhado por 105 dias (Figura 14), enquanto o equino necessitou de três banhos, em zero (0), 21 e 56 dias, e foi acompanhado por 84 dias (Figura 17). Durante todo o período, registros fotográficos e avaliações visuais foram realizadas para estimar a infestação por carrapatos. No bovino, avaliações semanais duraram até o 42º dia, seguido por mais duas avaliações, uma no 70º dia e a última no 105 dia (Figura 14). Já o equino foi avaliado semanalmente durante os 84º dias (Figura 17). Ambos os animais se encontravam proporcionalmente bem infestados, o

bovino por *R. microplus* e o equino por *Dermacentor (A.) nitens* e *Amblyomma* spp..

Devido ao parasitismo ocorrer por espécies de carrapatos diferentes entre o bovino e o equino, a distribuição dos carrapatos sobre os animais testados também foi diferente (Figura 15 e 16), em consonância com a literatura (GARCIA *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019). Conforme pode ser notado nos resultados (Tabela 11 e Figuras 31 a 33), o parasitismo e a dermatite secundária foram reduzidos logo após o primeiro banho com óleo de girassol ozonizado no bovino, de forma que após 14 dias não mais se observava sinais de lesão de pele. No relato de Oliveira e col. (2014), a ausência de carrapatos e de lesões de pele em um cão que recebeu tratamento similar ao que utilizamos, ocorreu posteriormente ao segundo banho, realizado 20 dias após o primeiro. Essas diferenças podem ser relativas às diferentes espécies hospedeiras e parasitas, no entanto, há de se registrar os benefícios observados após aplicação do óleo de girassol ozonizado, seja pela redução das lesões de pele seja pela redução do parasitismo em ambas as espécies hospedeiras. Esse desempenho observado no bovino corrobora com o efeito acaricida *in vitro* do O₃ sobre *R. microplus*, observado a partir de sua mistura com o O₂ sobre fêmeas ingurgitadas (Tabela 5 a 7 e Figura 20) e através da imersão de larvas em óleo de girassol ozonizado (Figura 29).

De forma semelhante respondeu o equino após os banhos com óleo de girassol ozonizado (Tabela 12), reduzindo o grau de parasitismo a cada tratamento. Esta espécie hospedeira apresentava parasitismo por carrapatos das espécies *Dermacentor (A.) nitens* e *Amblyomma* spp., e notou-se maior dificuldade na manutenção do baixo parasitismo, quando comparado ao bovino. Diferentemente do observado no bovino, as baixas condições nutricionais em que se encontrava o equino durante os 30 dias iniciais de acompanhamento, pode ter elevado o desvio imunológico. Além disso, essa avaliação ocorreu entre setembro e dezembro, intervalo que compreendem meses observados como sendo de elevada infestação natural (LABRUNA *et al.*, 2002).

A recuperação da dermatite foi breve como visto no bovino, contudo a alopecia passou a ser revertida somente a partir do 28º dia (Figuras 34 a 36), semelhante ao observado no cão por Oliveira *et al.* (2014).

A figura 37 demonstra o desafio de controlar o parasitismo predominantemente por *Demacantor (A) nitens* na região perineal do equino. Apesar dessa região ser preferencial para o parasitismo por esta espécie (KOLLER *et al.*, 2017), é possível observar o efeito do óleo de girassol ozonizado, após sete dias de cada banho realizado (Dias 07, 28 e 63). Recentemente, foi relatada atividade acaricida da mistura O₂+O₃ sobre essas mesmas espécies de carrapatos. Em ambas se observaram considerável efeito logo após a exposição, alcançando 100% de letalidade em até 12 h (CASTRO *et al.*, 2020). Nesse mesmo relato, a exposição por 105 e 150 min feita em *Amblyomma* spp. demonstrou efeito dose-dependente. Nossos registros do efeito do óleo de girassol sobre o parasitismo por carrapatos no equino, condiz com os resultados relatados por Castro *et al.* (2020), havendo a necessidade de maiores dosagens para se obter o efeito acaricida para as espécies de carrapatos normalmente encontradas em equinos.

Os resultados observados *in vitro*, juntamente com o controle do parasitismo observado nas duas avaliações *in vivo*, reforçam a existência de atividade acaricida do ozônio, devendo novos ensaios serem realizados a fim de se alcançar o melhor protocolo ou metodologia.

6. CONCLUSÃO

A terapia com ozônio apresentou efeito acaricida sobre carrapatos e pode se tornar uma importante estratégia para o controle do parasitismo, contribuindo para a produção e ao bem-estar animal.

O gás ozônio apresentou efeito acaricida dose-dependente imediatamente (5 min a 4 h) após sua exposição às larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Em fêmeas ingurgitadas o ozônio também demonstrou efeito acaricida tardio (de 12 h à 180 h).

Em larvas, o efeito acaricida imediato foi observado utilizando doses entre 1.775 e 6.390 mg/L.min, correspondendo às doses letais $DL_{50}= 5.416$ mg/L.min e $DL_{95}= 6.874$ mg/L.min. Em fêmeas ingurgitadas, doses entre 3.195 e 7.455 mg/L.min ($DL_{50}= 5.950$ mg/L.min e $DL_{95}= 7.187$ mg/L.min) corresponderam aos efeitos acaricidas imediatos, enquanto doses entre 355 e 2.130 mg/L.min ($DL_{50}= 1.120$ mg/L.min e $DL_{95}= 1.1673$ mg/L.min) foram responsáveis pelos efeitos acaricidas tardios.

Subdoses (71 e 284 mg/L.min) de ozônio também apresentaram efeito acaricida durante o período de produção e postura de ovos, reduzindo o índice de eficiência reprodutiva, índice de eficiência nutricional e índice de produção de ovos. Também promoveram a redução no período de postura e no percentual de eclosão de ovos, porém, não influenciaram o período de pré-postura e o período de incubação dos ovos. As subdoses entre 213 e 284 mg/L.min apresentaram melhor desempenho.

O óleo de girassol ozonizado por 2 h apresentou o melhor efeito acaricida, com 92% de mortalidade em imersão por 10 min, enquanto a imersão por 5 min promoveu mortalidade de, aproximadamente, 74% dos espécimes expostos.

Tanto o óleo de girassol ozonizado quanto a água de osmose reversa ozonizada não apresentaram efeitos acaricidas superiores aos carrapaticidas comerciais deltametrina e amitraz 12,5% nos testes *in vitro*.

O óleo de girassol ozonizado foi capaz de reduzir o parasitismo por carrapatos em um bovino e um equino. Novos estudos devem ser realizados com outros protocolos experimentais.

A água de osmose reversa ozonizada não apresentou efeito acaricida na metodologia utilizada e deve ser mais bem estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. R.; DELALIBERA JUNIOR, I.; PEREIRA, N. R. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response. **Ozone: Science & Engineering**, p. 1–10, 2020.

ABREU, M. R.; DELALIBERA JUNIOR, I.; PEREIRA, N. R. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) exposed to ozonated water: A control strategy. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 35, n. 1, p. 88-96, mar., 2021.

AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C.J.; PARRA, C.L.C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2014.

ANDRE, W. P. P.; RIBEIRO, W. L. C.; CAVALCANTE, G. S.; SANTOS, J. M. L.; MACEDO, I. T. F.; PAULA, H. C. B.; FREITAS, R. M.; MORAIS, S. M.; MELO, J. V.; BEVILAQUA, C. M. L. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Vet Parasitol**, v.218, p. 52–58, 2016.

ARAUJO, M. Ozonioterapia: Efectividad y riesgos. **Ministerio de Salud**. Chile, 2006.

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 Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 515– 526, 2005.

BATAKLIEV, T.; GEORGIEV, V.; ANACHKOV, M.; RAKOVSKY, S.; ZAIKOV, G. E. Ozone Decomposition, Review Article. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 47–59, 2014.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). II Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v.16, p.250-257, 1974.

BETANCOURT, J. Nueva vacuna para prevención y control de garrapatas en ganado. **Periódico El Agro**, v. 92, n. 6, 2017.

BOCCI, V. A. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 425–435, 2006.

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 **J. Econ. Entomol**, v. 104, n. 1, p. 308-316, 2011.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A.; BARBOSA, C. S. D. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89–96, 2011.

BRUDNIEWSKI, A.; VASCONCELOS, A. B.; BUCEK, E.; QUINTAL, A. P. N. Citronela, Neen e Noni no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vitro. **PUBVET**, v.14, n. 09, p.132, 2020.

CASTRO, R. A.; LIMA, C. J.; CARVALHO, H. C.; MOREIRA L.H. Técnica de ozonização em carrapatos (*Dermacentor (A.) nitens* e *Amblyomma* spp) de equinos. In: **XXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, Vitória, v. 1. p. 473-474, 2020.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada; CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. PIB do Agronegócio: Relatório completo. 15 Mar., 2022. Disponível em: https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_CNA_PIB_JAn_Dez_2021_Mar%C3%A7o2022.pdf. Acesso em: 20 de abril de 2022.

CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R ; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.3, p.427-432, 2016.

CRUZ, B. C.; LIMA MENDES, A. F.; MACIEL, W. G.; SANTOS, I. B.; GOMES, L. V. C.; FILIPPELLI, G.; TEIXEIRA, W. F. P.; FERREIRA, L. L.; SOARES, V. E.; LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J.; OLIVEIRA, G. P. Biological parameters for *Rhipicephalus microplus* in the field and laboratory and estimation of its annual number of generations in a tropical region. *Parasitol Res*, v. 119, p. 2421–2430, 2020.

FIGUEIREDO, T. F. B. 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. **Dissertação de Mestrado**, 2015.

FIGUEIREDO, T. F. B.; LIMA J. C.; FERNANDES, A. B.; ZÂNGARO, R. A.; MENDES, A. L. S.; MOREIRA, L. H. Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) Females During the Pre-Laying Period. **Ozone: Science & Engineering**, p. 1–8, 2018.

FILDEN, L. J.; KNOLHOFF, L. M.; VILLARREAL, S. M.; RYAN, P. Underwater survival in the dog tick *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae). **Journal of Insect Physiology**, v.57, p. 21-26, 2011.

FONSECA, P. M. M.; FEITOSA, L. S.; FERNENDES, A. B.; ZÂNGARO, R. A.; Miyakawa, W.; LIMA, C. J. Disinfection of Dental Instruments Contaminated with Streptococcus Mutans Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound. **Ozone: Science & Engineering** v. 37, p. 85–89, 2015.

FURLONG, J. Carrapatos: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. **Comunicado técnico 36**. Embrapa – Juiz de Fora – MG, 2003.

FURTADO, F. N.; SILVA, V. A. R.; PEREIRA, J. R.; AKISUE, G.; COÊLHO, F. A. S.; COÊLHO, M. D. G. Avaliação in vitro do potencial acaricida do óleo essencial de *Tagetes minuta* frente à *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Biociências**, v. 19, p. 104-110, 2013.

GARCIA, C. A.; FARIA, A. B.; ROSSI, D.A. Esterilização Da Microbiota Bacteriana Do Idiossoma De *Boophilus Microplus* Pelo Gás Ozônio. In: XXXI Congresso Brasileiro De Medicina Veterinária, 2004, SÃO LUÍS - MA. **Anais Do XXXI Congresso Brasileiro De Medicina Veterinária**. São luís – MA, 2004.

GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. S.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In:

Andreotti, R.; Garcia, M.V.; Koller, W.W. **Carrapatos na Cadeia Produtiva de Bovinos**. Brasília – DF, Embrapa, 2019.

GAXIOLA-CAMACHO, S.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; PORTILLO-LOERA, J.; VÁZQUEEZ-PELÁEZ, C.; MARTÍNEZ-QUINTERO, M.T.; CRUZ-ROSARIO, R. Comparison of efficiency and reproductive aptitude indexes between reference and field strains of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, in: Sinaloa, Mexico. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 18, n. 4, p. 9–13, 2009.

GONÇALVES, R. R. P.; PECONICK, A. P.; THOMASI, S. S.; KONIG, I. F. M.; GOMES, S. L.; REMEDIO, R. N. Acaricidal activity and effects of acetylcarvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) engorged female ticks (Acari: Ixodidae). **Int J Acarol**, v. 45, p. 404–408, 2019.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CAÇADO, P. H. D.; LÉON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23, n.2, p. 150-156, 2014.

HURTADO, O. J. B.; GIRALDO-RIOS, C. Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals, **Ticks and Tick-borne Diseases**, nov. 2018.

HUSAIN, M.; RASOOL, K. G.; TUFAIL, M.; ALHAMDAN, A. M. A.; MEHMOOD, K.; ALDAWOOD, A. S. Comparative Efficacy of CO₂ and Ozone Gases *Against Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae Under Different Temperature Regimes **J. Insect Sci**, v. 15, n. 1. p. 126, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal. Tabelas 202. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em: 28 de maio de 2023.

IMEA - Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária. **Custo de Produção, Bovinocultura de Corte, Ciclo Completo, Mato Grosso**. 17/01/2023. Disponível em: <https://www.imea.com.br/imea-site/relatorios-mercado-detalle?c=2&s=696277432068079616>. Acesso em 16 de abril de 2023.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1-10, 2006.

KASAIJA, P. D.; ESTRADA-PENA, A.; CONTRELAS, M. KIRUNDA, H.; FUENTE, J. Cattle ticks and tick-borne diseases: a review of Uganda's situation. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.2, 2021.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. **Ozônio e radiação UV-B**. São Jose dos Campos: Transtec, p. 66, 1995.

KOLLER, W. W.; RODRIGUES, V. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Biologia e controle de *Dermacentor nitens*: o carrapato-da-orelha-do-cavalo. **Embrapa**: Brasília- DF, 2017.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chem**, v. 85, p. 633–640, 2004.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, J.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet Parasitol**. v. 19, n. 1, p. 65-77, Apr., 2002.

MA, M.; CHEN, Z.; LIU, A.; REN, Q.; LIU, J.; LIU, Z.; LI, Y.; YIN, H.; GUAN, G.; LUO, J. Biological Parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Fed on Rabbits, Sheep, and Cattle. **Korean J Parasitol**, v. 54, n. 3, p. 301-305, 2016.

MELÉNDEZ, R. D.; CORONADO, A.; MUJICA, F.; CERUTTI, F.; MOSQUERA, O. Levels of natural resistance two *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Corora breed bulls. **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 3, p. 691-696, 1998.

MENDES, A. S.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O., MATURANO, R.; BRITO, F.C.; MASSONI, T. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol**, v. 183, p. 136–139, 2011.

MINHO, A. P.; DOMINGUES, L. F.; GAINZA, Y. A.; FIGUEIREDO, A.; BOLIGON, A. A.; DOMINGUES, R.; CHAGAS, A. C. S. In vitro screening of plant extract on *Haemonchus contortus* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Essential Oil Research**, v.32, p.269-278, 2020.

MOREIRA, L. H.; FIGUEIREDO, T. F. B.; ALVES, L. P.; FERNANDES, A. B.; ZÂNGARO, R. A.; MENDES, A. L. S.; GAUDÊNCIO, F. N.; LIMA, C. J. Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. **Ozone: Science & Engineering**, p.183-190, 2017.

NOGALES, C. G.; FERRARI, P. H.; KANTOROVICH, E. O.; LAGE-MARQUES, J. L. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.9, n.4, Mai., 2008. Disponível em: www.thejcdp.com. Acesso em: 03 agosto 2018.

OLIVEIRA, H. H.; LIMA, C. J.; FERNANDES, A. B.; ZÂNGARO, R. A.; MOREIRA, L. H. Uso De Óleo Ozonizado No Tratamento Tópico De Infestação Por Carrapato Em Cão - Relato De Caso. **Revista Brasileira De Medicina Veterinária**, v. 36, n. 4, p. 405–408, 2014.

OLIVEIRA, M. K. F.; PEDRASSANI, D. Extrato hidroalcoólico de eucalipto, *Eucalyptus dunnii*, no controle do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Acad. Ciênc. Anim**, v. 15, p. 41-48, 2017.

OSMAN, K. A. Production of date palm fruits free of acaricides residues by ozone technology as post-harvest treatment. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. 6, p. 3322–3335, Jun., 2015.

PASSOS, T. M.; MOREIRA, L. H.; MOREIRA, L. M.; ZÂNGARO, R. A.; SANTOS, R. S.; FERNANDES, F. B.; LIMA, C. J.; FERNANDES, A. B.; Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the Elimination of *Giardia* Spp. Cysts from Wastewater. **Ozone: Science & Engineering**, v. 36, n. 2, p. 138–143, 2014.

PEREIRA JUNIOR, A. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; DAEMON, E.; PECONICK, A. P.; LIMA-SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R.; BRAGA, A. S.; LARA, L. J.; REMEDIO, R. N. Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction. **Nat Prod Res Article in Press**. v. 34, n. 23, p. 3428-3431, 2019, Epub.

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

RODRIGUES, V.S.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; ANDREOTTI, R. Carrapatos em cavalos: *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*. In: *Andreotti, R.; Garcia, M.V.; Koller, W.W. Carrapatos na Cadeia Produtiva de Bovinos*. Brasília – DF, Embrapa, 2019.

ROSADO, A. F.; FARONI, L. R. A.; URRUCHI, W. M. I.; GUEDES, R. N. C.; PAES, J. L. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 282–285, 2008.

SCOLARICK, M. G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitol. Res.** v.110, p. 645–648, 2012.

SILVA, R.; SANTOS, M. P. A.; FIGUEIREDO, M. A. P. Avaliação comparativa *in vitro* da sensibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas comercializados no município de rolim de moura, Rondônia, Brasil. **ARS Veterinaria**, v.36, n.3, p.163-168, 2020.

SINGH, N. K.; MILLER, R. J.; KLAFKE, G. M.; GOOLSBY, J. A.; Thomas, D. B.; Leon, A. A. P.; *In vitro* efficacy of a botanical acaricide and its active ingredients against larvae of susceptible and acaricide-resistant strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis.** v.9, p. 201–206, 2018.

SOTELO, J. L.; BELTRAN, F. J.; BANITEZ, F. J.; BELTRAN-HEREDIA, J. Ozone Decomposition in Water: Kinetic Study. **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 26, p. 39-43, 1987.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; SILVA, G. N.; GUEDES, R. N. C.; Ozone Toxicity and Walking Response of Populations of *Sitophilus zeamais*

(Coleoptera: Curculionidae). **J. Econ. Entomol**, v.105, n. 6, p. 2187-2195, 2012.

SZABÓ, M. P. J.; GARCIA, C. A.; SILVA, T. L.; OLEGÁRIO, M. M. M.; CAMPOS, V. A.; CASTRO, I. P. Efeito acaricida da mistura oxigênio - ozônio sobre o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. **Vet. Not.**, v.15. n.2, jul./dez. 2009.