



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DO FLUAZURON SOBRE OVOS, LARVAS E FÊMEAS
INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus*

FABRÍCIO NASCIMENTO GAUDÊNCIO

Sob a Orientação do Professor
Jairo Pinheiro da Silva

e Co-orientação da Professora
Isabele da Costa Angelo

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2016

595.42
G266e
T

Gaudêncio, Fabrício Nascimento,
1987-

Efeito do fluazuron sobre ovos,
larvas e fêmeas ingurgitadas de
Rhipicephalus microplus / Fabrício
Nascimento Gaudêncio - 2016.

86 f.: il.

Orientador: Jairo Pinheiro da
Silva.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Bibliografia: f. 60-69.

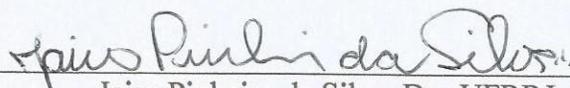
1. Carrapato - Reprodução -
Teses. 2. Carrapato - Comportamento
- Teses. 3. Inseticidas - Teses. 4.
Metabolismo energético - Teses. I.
Silva, Jairo Pinheiro da, 1969-.
II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FABRÍCIO NASCIMENTO GAUDÊNCIO

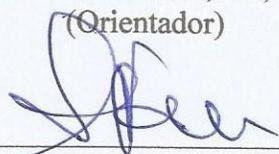
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 22/02/2016



Jairo Pinheiro da Silva, Dr., UFRRJ

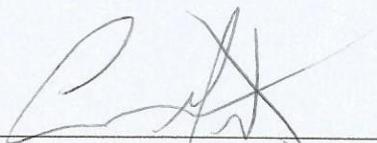
(Orientador)



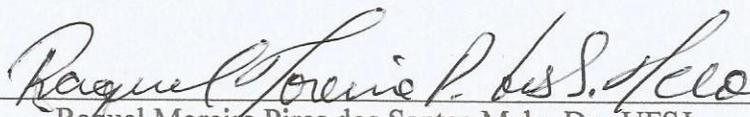
Adivaldo Henrique da Fonseca, Dr., UFRRJ



Yara Peluso Cid, Dr., UFRRJ



Caio Márcio de Oliveira Monteiro, Dr., UFJF



Raquel Moreira Pires dos Santos Melo, Dr., UFSJ

*Aos meus queridos pais
Jorge e Graça
dedico esta importante conquista
na minha vida.*

“Nem sempre o produto final é o mais importante.
Por vezes a riqueza se esconde é no processo das descobertas.
O resultado é quase nada
perto das oportunidades que o processo nos entrega.”
(Pe. Fábio de Melo)

AGRADECIMENTOS

Só tenho a agradecer aos muitos que, com a Graça de Deus, tive o prazer de ter sido apresentado. Uma verdadeira equipe, de excelentes colaboradores, que direta ou indiretamente participaram da concretização deste sonho. Aos meus pais e avó, Jorge, Graça e Maria, meus maiores torcedores, mentores e professores da vida. Às minhas irmãs e sobrinhos, Rita, Patrícia, Luciana, Guilherme e Pedro, pelo apoio sempre presente dentro da família. Afinal, família é tudo! Aos amigos de fora da Universidade, que mesmo sem dominarem o assunto, sempre se dispuseram, na medida do possível, a me ajudar e torceram por mais esta realização acompanhando toda a minha trajetória acadêmica: Helito Abreu, Dayane Ayade, Rafael Silveira, Vanessa Alves, Pedro Inácio, Leonardo Freitas, Júlio Lima, André Lima, Anselmo Ramos e toda a equipe dos veterinários da Clínica Veterinária Queimados. Obrigado pela paciência, pessoal! Aos amigos intérpretes da Pastoral dos Surdos, por serem ótimas válvulas de escape dos problemas e estresses da pesquisa acadêmica e também aos surdos, por me ensinarem, de uma perspectiva muito especial, uma nova forma de ver a vida. Aos muitos ajudantes que tive na Universidade, nos mais diferentes laboratórios e setores, agradeço de coração o companheirismo incondicional. A começar pelo laboratório que me acolheu com tanto carinho, chefiado pelo meu querido orientador Jairo Pinheiro da Silva. Agradeço aos amigos contemporâneos doutorandos e professores do laboratório: Victor Menezes, Vinícius Menezes, Mariana Lima, Mariana Seabra, Florence Gonçalves e Norma Almeida. Obrigado pela ajuda na bancada, dentro e fora do laboratório, e principalmente, pelos maravilhosos cafés no fim do dia.

Aos amigos de outros laboratórios, que no decorrer do curso de Doutorado, à medida que precisei, sempre se mostraram dispostos a colaborar: professor Aivaldo Henrique da Fonseca e sua excelente equipe de orientados e funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP): Jaqueline Valim, Bruna Baêta, Lucineia Costa, Matheus Cordeiro e Márcio Barizon. Aos amigos do LQEPV, onde minha vida acadêmica começou, que sob orientação do Professor Fabio Barbour Scott sempre foram, desde os tempos do meu Mestrado, grandes amigos e fiéis companheiros: Cristiane Nunes e Lílian Cristina (pela amizade dentro e fora do laboratório), Cássio Nascimento e Alexsandro (que me acompanharam no piloto da Tese), e Bárbara Rauta e Gabriela Ferreira, essa dupla a quem eu devo um agradecimento mais que especial por sua assistência à sanidade dos animais ao longo do período experimental. Ainda dentro do LQEPV, agradeço a Thaís Paes do laboratório de Farmacometria, a professora Yara Cid e aos amigos do setor de Análises Clínicas, Pedro Ivan (*in memoriam*), Maria Clara, Renata Assad, Diego Dias, Emanuele Cardoso e Alana Cristina. Um muito obrigado de coração também aos amigos que fiz no Laboratório de Controle Microbiano (LCM): Professora Patrícia Gôlo, Mariana Camargo, Simone Quinelato, Sabrina Resende, Wendell Perinoto, Michel Nogueira, Maria Clemente, Allan Felipe, Caio Balduino e Gisele Jones. E aos vizinhos do lado, também família W.O. Neitz: Marcus Pires, Maristela Peckle e companhia. Em especial, agradeço ao acolhimento da professora Vânia Bittencourt e da minha querida co-orientadora Isabele Angelo, sempre zelosa e atenciosa. Tenho muito a agradecer ao Pesquisador Dr. Guilherme Klafke também pela ajuda no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em Eldorado do Sul, RS, onde pude complementar minha pesquisa com a ajuda da equipe do laboratório. E é claro ao meu orientador Jairo Pinheiro da Silva, pelo acolhimento e cumplicidade durante todos esses anos. Tenho muito orgulho de ter dividido esses 4 anos com todos vocês. Dedico a vocês também essa conquista na minha vida. Muito obrigado a todos!

BIOGRAFIA

Fabrcio Nascimento Gaudêncio, filho de Jorge Moreira Gaudêncio e Maria das Graças Nascimento Gaudêncio, nasceu dia 9 de abril de 1987, na cidade de Belford Roxo, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o Ensino Fundamental no Centro de Educação Boa Esperança e, posteriormente, o Ensino Médio no Colégio EME, ambos no município de Nova Iguaçu.

No ano de 2004, ingressou no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica, graduando-se em setembro de 2009.

Durante a Graduação, sempre se interessou pela área de Análises Clínicas e, por isso, estagiou desde meados do curso até graduar-se, em laboratórios particulares de Análises Clínicas Veterinária: laboratório CELV, em Nova Iguaçu e Clínica Veterinária Queimados, no município de Queimados, RJ, uma vez que a Universidade não dispunha até então de laboratórios de análises clínicas com atividade de rotina.

s vésperas de concluir o curso de Medicina Veterinária, deu início  Especialização *lato sensu* em Análises Clínicas Veterinária pelo curso Qualittas de Pós-Graduação, recebendo a certificação de conclusão em 2011. Ao graduar-se, trabalhou no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ como patologista responsável pelo setor de Análises Clínicas do laboratório sob a orientação do professor Dr. Fabio Barbour Scott. L, exerceu atividades voltadas a testes de segurança clínica de produtos antiparasitários em diferentes espécies animais, além de realizar exames laboratoriais dos animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade.

Em 2010, foi aprovado no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado, na UFRRJ, sob orientação do professor Dr. Fabio Barbour Scott. Durante este período aprimorou seu conhecimento sobre os diferentes mecanismos de ao dos antiparasitários e seus efeitos sobre os animais tratados com os mais diversos princípios ativos. Em fevereiro de 2012, apresentou a Dissertação intitulada “Avaliação da segurança clínica e eficácia do coumafs no tratamento de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em cães infestados artificialmente”, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Em 2011, foi aprovado na seleção de Doutorado pela mesma Universidade, agora no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, sob a orientação do professor Jairo Pinheiro da Silva, tendo recebido a bolsa de estudos da Capes. Ao ingressar no Laboratório de Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas, Fabrcio participou de congressos nacionais e internacionais sempre voltando suas pesquisas ao estudo dos efeitos bioquímicos dos produtos antiparasitários no metabolismo de carrapatos. Cumpriu o estágio  docência na Disciplina de Patologia Clínica Veterinária durante o Doutorado, além de ter ministrado algumas aulas a convite dos professores da Disciplina. Na Pós-Graduação, ministrou aulas de Bioquímica Celular a convite de seu orientador Professor Jairo Pinheiro da Silva. Durante este período trabalhou ainda em parceria com os laboratórios LQEPV, LDP e o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em Eldorado do Sul, RS, com a colaboração do Dr. Guilherme Klafke. Após a qualificação do projeto de Tese, em julho de 2015, foi admitido para o cargo de professor nas disciplinas de Bioquímica Geral e Química Fisiológica para o Curso de Medicina Veterinária na Fundação Educacional Dom André Arcoverde, município de Valença, RJ.

RESUMO

GAUDÊNCIO, Fabrício Nascimento. **Efeito do fluazuron sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus***. 2016. 91p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os perfis metabólico-energético de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron. 6 bovinos foram estabelecidos e divididos em grupos controle e tratado, contendo 3 animais cada. Uma formulação comercial contendo o princípio-ativo fluazuron foi administrada por via tópica nos animais do grupo tratado. Fêmeas ingurgitadas foram coletadas em dias determinados: antes (dia 0) e após o tratamento dos animais (4, 8 e 15 dias). Após a coleta das fêmeas ingurgitadas, foram analisados os seguintes parâmetros biológicos: peso da fêmea ingurgitada, peso da quenógina, período de postura, peso da postura, índice de produção de ovos, eficiência reprodutiva, percentual de eclosão e índice nutricional. Foi avaliado também o perfil metabólico: na hemolinfa (concentração de glicose, proteínas totais e ácidos orgânicos - oxálico, pirúvico e láctico, atividade enzimática de LDH, ALT e AST), no corpo gorduroso (concentração de glicogênio e percentual de variação de lipídios neutros), nos ovos (concentração de glicose, proteínas totais, percentual variação de lipídios neutros e atividade enzimática de ALT e AST), e na cutícula das fêmeas ingurgitadas (percentual de variação de lipídios neutros). Num segundo momento, realizou-se teste de imersão de fêmeas ingurgitadas para posterior avaliação das atividades das enzimas carboxilesterases, monooxigenases (MFO) e glutationa-S-transferase (GST) em ovos e larvas de diferentes cepas: sensível (Porto Alegre, RS) e cepa resistente (Jaguar, RS) ao fluazuron. Avaliou-se também as enzimas de detoxificação no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de cepa sensível. Na análise dos resultados, todos os parâmetros apresentaram resultados inferiores, quando comparados ao grupo controle, em função da exposição ao fluazuron, exceto o peso da quenógina. Embora tenha sido observado um aumento na concentração de glicose hemolinfática no 8º dia e glicogênio no corpo gorduroso no 15º dia, não houve diferença significativa na comparação das médias entre controle e tratado dia-a-dia. A concentração do ácido láctico apresentou aumento progressivo significativo no grupo tratado ao longo do tempo em função do tratamento, indicando aumento do metabolismo anaeróbico. Não houve diferença significativa para as variações percentuais de lipídios neutros no corpo gorduroso, cutícula e ovos em nenhum dos dias de avaliação. Embora não tenha sido observada diferença significativa nas atividades das transaminases na hemolinfa, observou-se aumento significativo nos ovos após o tratamento no 8º dia. A atividade da MFO foi maior, na comparação entre as cepas resistente e sensível, nos ovos, e com relação às larvas; o aumento observado foi nas carboxilesterases da cepa resistente. Nas fêmeas, a MFO apresentou atividade elevada no corpo gorduroso em função da exposição ao fluazuron, principalmente no 4º dia no grupo tratado. Os aumentos na atividade das transaminases e das enzimas de detoxificação nas fêmeas ingurgitadas e nos ovos foram associados a possíveis danos celulares e à tentativa de metabolização do princípio-ativo testado. Pela primeira vez, foi realizado um estudo acerca dos efeitos metabólicos do fluazuron, enfocando diferentes aspectos bioquímicos, evidenciando que a sua eficácia está relacionada a diversas alterações metabólicas, levando a uma quebra da homeostase do carrapato.

Palavras-chave: benzoilfeniluréias, regulador de crescimento, metabolismo energético.

ABSTRACT

GAUDÊNCIO, Fabrício Nascimento. **Effects of fluazuron on eggs, larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus***. 2016. 91p. Thesis. (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The objective of this research was to evaluate the effect of the arthropod growth regulator fluazuron in the energetic metabolism of *Rhipicephalus microplus*. 6 stabled cattle divided into control and treated groups containing three animals each. A commercial formulation containing the active compound fluazuron was administered topically in the treated group. The engorged female ticks were collected from some days before (day 0) and after treatment of animals (4, 8, and 15 days). After collecting the engorged females, the following biological parameters were analyzed: weight of the engorged female, weight of the female after oviposition, laying period, laying weight, egg production rate, reproductive efficiency index, percentage of hatching and nutritional index. It was also evaluated the metabolic profile: in the hemolymph (concentration of glucose, total protein and organic acids - oxalic, pyruvic and lactic, enzymatic activity of LDH, ALT and AST); in the fat body (glycogen concentration and percentage of variation of neutral lipids); in eggs (concentration of glucose and total protein content, percentage change of neutral lipids and enzymatic activities of ALT and AST); and in the cuticle of engorged female ticks (percentage change of neutral lipids). Secondly, female immersion test was conducted to assess the activities of carboxylesterases enzymes, monooxygenases (MFO) and glutathione-S-transferase (GST) in sensitive strain of eggs and larvae (Porto Alegre, RS) compared with resistant strain (Jaguar, RS). It also assessed the detoxification enzymes in the fat body of engorged females of sensitive strain. The results showed that all the biological parameters showed lower results when compared to the control group after the exposure to fluazuron, except the weight of the female after oviposition. Although an increase was observed in the concentration of glucose in hemolymph on the 8th day and glycogen in the fat body in 15th day, there was no significant difference in the comparison of means between control and treated day-to-day. The concentration of lactic acid gradually increased in the treated group over time due to treatment, indicating increased anaerobic metabolism. There was no significant difference in the percentage change of neutral lipids in fat body, cuticle and eggs in any of the time intervals. No significant difference was observed in the activity of transaminases in the hemolymph, but it was observed in eggs after the treatment on the 8th day. The activity of MFO was higher in the comparison between the resistant and sensitive strains in eggs, but in larvae, the increase was observed in carboxylesterases in the resistant strain. In females, MFO showed high activity in the fat body as a function of fluazuron exposure, especially on day 4 in the treated group. Increases in transaminase activity and detoxification enzymes in females and eggs were associated with possible cell damage and trying to metabolism of active principle-tested. For the first time, a research about the metabolic effects of fluazuron has been conducted, focusing on different biochemical aspects, demonstrating that its effectiveness is related to a number of metabolic changes, leading to a parasite homeostasis breaking.

Key words: benzoylphenylureas, *growth regulator*, energetic metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Morando (2010) adaptado de Andreotti (2002). Fase parasitária: 1 = larva infestante realizando a fixação no bovino; 2 = ninfa; 3 = teleógina em estágio final de ingurgitamento. Fase de vida livre: 4 = teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5 = ovos, no solo, em período de incubação; 6 = larva, no solo, em período de incubação. Imagem sem escala de correspondência. 5
- Figura 2.** Biossíntese do polímero de quitina em insetos. Em insetos, o início acontece coma captação da trealose a partir da hemolinfa. Em seguida, ocorre a participação das organelas retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, com a posterior liberação das vesículas que irão se deslocar em direção às microvilosidades da membrana celular. Em carrapatos, a diferença é a captação direta da glicose da hemolinfa. (Fonte: PALLI; RETNAKARAN, 1999) 11
- Figura 3.** Fórmula estrutural do fluazuron ((3-[3-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridinyloxy)-4-chlorophenyl]-1-(2,6-difluorobenzoyl)-urea))(INCHEM, 2009). 15
- Figura 4.** Organograma das datas de infestação dos bovinos com larvas de *Rhipicephalus microplus* e as respectivas datas de coleta de fêmeas ingurgitadas para avaliação do metabolismo energético e protéico após exposição ao fluazuron. 18
- Figura 5.** Coleta de hemolinfa a partir da superfície dorsal da fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus microplus*. (A) Após leve perfuração da cutícula, a hemolinfa extravasa pela superfície dorsal. (B) A hemolinfa é coletada com auxílio de um tubo capilar, de acordo com Angelo et al., 2010. 20
- Figura 6.** Comparação entre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* do grupo (A) expostas ao fluazuron e (B) fêmeas ingurgitadas do grupo controle observadas em microscópio estereoscópico coletadas do chão das baias no oitavo dia de coleta após o tratamento dos bezerros. Notar a diferença no formato, tamanho e aspecto da superfície dorsal das fêmeas. Barra de escala representa 0,2 cm. 28
- Figura 7.** Variação do peso da fêmea ingurgitada (teleógina) (mg) (barras brancas) em relação ao peso da quenógina (barras pretas) em função do tempo de exposição ao fluazuron. CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). Média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. 31
- Figura 8.** Alterações no conteúdo de carboidratos em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em diferentes dias experimentais após a exposição ao fluazuron. (A) Concentração de glicose na hemolinfa ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) e (B) glicogênio (mg de glicose. g^{-1} de tecido, peso fresco) no corpo gorduroso. CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). Média \pm erro padrão da média acompanhadas por letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o teste de Dunn ($p > 0,05$). 36

Figura 9. Avaliação do metabolismo de carboidratos na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) (U.L^{-1}); (B) Concentração de ácido láctico (mM); (C) Concentração de ácido pirúvico (mM) e (D) Concentração de ácido oxálico (mM). CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). (A) Médias \pm desvio padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Tukey. (B), (C), (D). Médias \pm erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Dunn. 40

Figura 10. Variação percentual dos lipídios neutros presentes no corpo gorduroso de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. C (controle), T (exposto ao fluazuron). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). Cada grupo continha corpos gordurosos parietais de 10 fêmeas. Médias \pm erro padrão não diferiram significativamente entre as classes de lipídios avaliados ($p>0,05$) pelo teste de Dunn. 42

Figura 11. Cromatograma dos lipídios neutros presentes no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada lane na imagem representa um grupo experimental: 1 (controle 0); 2 (tratado 0); 3 (controle 4); 4 (tratado 4); 5 (controle 8); 6 (tratado 8). P (amostra padrão: $4 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO). Cada grupo continha corpos gordurosos parietais de 10 fêmeas. 43

Figura 12. Variação percentual dos lipídios neutros presentes na cutícula de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. C (controle), T (exposto ao fluazuron). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). Cada grupo continha macerado de cutículas pesando 66 mg. Médias \pm erro padrão não diferiram significativamente entre as classes de lipídios avaliados ($p>0,05$) pelo teste de Dunn. 45

Figura 13. Cromatograma dos lipídios neutros presentes na cutícula de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada lane na imagem representa um grupo experimental: 1 (controle 0); 2 (tratado 0); 3 (controle 4); 4 (tratado 4); 5 (controle 8); 6 (tratado 8). P (amostra padrão: $2 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). Cada grupo continha macerado de cutículas pesando 66 mg. 46

Figura 14. Avaliação das enzimas de detoxificação em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da glutathiona-S-transferase (GST) ($\mu\text{M}.\mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1}); (B) Atividade enzimática da monooxigenase (MFO) (μg citocromo C. μg^{-1} de proteína). (C) Atividade enzimática da α -esterase ($\text{nM}.\mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1}); (D) Atividade enzimática da β -esterase ($\text{nM}.\mu\text{g}^{-1}$ de proteína) CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). 0 (dia pré-tratamento), 4 e 8 (dias pós-tratamento). Médias \pm erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p>0,05$). 48

Figura 15. Avaliação de dano celular através do monitoramento das transaminases e proteínas totais da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) (U.L⁻¹); (B) Atividade enzimática da aspartatoaminotransferase (AST) (U.L⁻¹); (C) Concentração de proteínas totais na hemolinfa (g.L⁻¹). CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). 0 (dia pré-tratamento), 4 e 8 (dias pós-tratamento). Médias ± erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Dunn (p>0,05). 49

Figura 16. Avaliação da atividade das transaminases e proteínas totais dos ovos obtidos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* previamente expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) (U.L⁻¹); (B) Atividade enzimática da aspartatoaminotransferase (AST) (U.L⁻¹); (C) Concentração de proteínas totais na hemolinfa (g.L⁻¹). CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). 0 (dia pré-tratamento), 4 e 8 (dias pós-tratamento). Médias ± erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Dunn (p>0,05). 51

Figura 17. Variação percentual dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. C (controle), T (exposto ao fluazuron). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). A dosagem dos lipídios foi padronizada para 1 g de proteínas. Médias ± erro padrão não diferiram significativamente entre as classes de lipídios avaliados (p>0,05) pelo teste de Dunn. 53

Figura 18. Cromatograma dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada lane na imagem representa um grupo experimental: 1 (controle 0, 5º dia da oviposição); 2 (controle 0, 10º dia da oviposição); 3 (tratado 0, 5º dia da oviposição); 4 (tratado 0, 10º dia da oviposição); 5 (controle 4, 5º dia da oviposição); 6 (controle 4, 10º dia da oviposição); 7 (tratado 4, 5º dia da oviposição); 8 (tratado 4, 10º dia da oviposição). P (amostra padrão: 4 µg.µL⁻¹). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). A avaliação densitométrica dos lipídios foram realizadas com 1 g de proteínas..... 54

Figura 19. Cromatograma dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada lane na imagem representa um grupo experimental: 9 (controle 8, 5º dia da oviposição); 10 (controle 8, 10º dia da oviposição); 11 (tratado 8, 5º dia da oviposição); 12 (controle 15, 5º dia da oviposição); 13 (controle 15, 10º dia da oviposição); 14 (tratado 15, 5º dia da oviposição). P (amostra padrão: 4 µg.µL⁻¹). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). A avaliação densitométrica dos lipídios foram realizadas com 1 g de proteínas..... 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Comparação dos parâmetros biológicos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* dos grupos controle e exposto durante diferentes períodos de exposição ao fluazuron..... 33
- Tabela 2.** Faixa linear para as dosagens dos ácidos orgânicos dos padrões utilizados nas amostras de hemolinfa de fêmeas *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. 38
- Tabela 3.** Comparação das atividades enzimáticas de α e β -esterases, glutathiona-S-transferase e monooxigenase entre as cepas sensível (Porto Alegre) e resistente (Jaguar) em ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron 57
- Tabela 4.** Comparação das atividades enzimáticas de α e β -esterases, glutathiona-S-transferase e monooxigenase entre as cepas sensível (Porto Alegre) e resistente (Jaguar) em larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron..... 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos Gerais sobre <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.1.1 Ciclo de vida e biologia reprodutiva.....	3
2.1.2 Metabolismo de carboidratos em <i>Rhipicephalus microplus</i>	5
2.1.3 Metabolismo de lipídios em <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
2.1.4 Metabolismo de proteínas em <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
2.1.5 Composição da cutícula.....	9
2.1.6 Mecanismos de detoxificação e desenvolvimento da resistência aos xenobióticos ...	12
2.2 Acaricidas Inibidores da Síntese de Quitina.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local	17
3.2 Obtenção das Fêmeas Ingurgitadas, Observação da Macromorfologia e Formação dos Grupos Experimentais	17
3.3 Avaliação dos Parâmetros Biológicos de Fêmeas Ingurgitadas	18
3.4 Coleta de Hemolinfa de Fêmeas Ingurgitadas	18
3.5 Dissecção de Fêmeas Ingurgitadas	21
3.5.1 Obtenção dos corpos gordurosos.....	21
3.5.2 Obtenção das cutículas	21
3.6 Obtenção de Ovos.....	21
3.7 Teste de Imersão de Fêmeas Ingurgitadas	22
3.8 Testes Bioquímicos	23
3.8.1 Técnicas bioquímicas com espectrofotometria.....	23
3.8.1.1 Determinação da concentração de glicogênio em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	23
3.8.1.2 Determinação da concentração de glicose e proteínas totais e das atividades enzimáticas de ALT, AST e LDH em hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	23
3.8.1.3 Avaliação das enzimas de detoxificação no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e macerados de ovos e larvas	24
3.8.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	25
3.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	25

3.9 Análises Estatísticas	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Macromorfologia das Fêmeas Ingurgitadas	27
4.2 Parâmetros Biológicos de Fêmeas Ingurgitadas	29
4.3 Metabolismo de Carboidratos nas Fêmeas Ingurgitadas	35
4.4 Metabolismo de Lipídios na Fêmea Ingurgitada	41
4.4.1 Corpo gorduroso parietal	41
4.4.2 Cutícula de fêmeas ingurgitadas	44
4.5 Atividades das Enzimas de Detoxificação no Corpo Gorduroso e Transaminases na Hemolinfa de Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	47
4.6 Perfil Bioquímico de Ovos	50
4.6.1 Atividade de transaminases e concentração de proteínas totais nos ovos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	50
4.6.2 Perfil lipídico de ovos	52
5 CONCLUSÕES.....	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	70
Anexo 1. Fórmulas dos parâmetros biológicos índice de produção de ovos (BENNETT, 1974), índice de eficiência reprodutiva (MELÉNDEZ et al., 1998) e índice nutricional (BENNETT, 1974).	71
Anexo 2. Protocolo para dosagem de proteína total pelo método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978).....	72
Anexo 3. Método de Nelson para desproteinização de amostras	73

1 INTRODUÇÃO

O “carrapato-do-boi” *Rhipicephalus microplus* representa um dos principais entraves à pecuária brasileira, ocasionando prejuízos econômicos de cerca de US\$ 3,24 bilhões/ano (GRISI et al., 2014). Esses valores são inerentes aos danos diretos e indiretos causados pela hematofagia deste parasito, tais como lesões no couro, predisposição a miíases secundárias, transmissão de agentes patogênicos, redução no ganho de peso, queda na produção de leite, gastos com acaricidas químicos e mão-de-obra para aplicação destes.

Durante muitas décadas, o mercado veterinário viu surgirem e caírem em desuso diversas formulações comerciais com princípios acaricidas, visando o controle desses ectoparasitos. O principal fator responsável pelas substituições dos produtos lançados no mercado é o desenvolvimento de resistência por parte do carrapato aos princípios ativos. Tal efeito é observado principalmente em decorrência do uso indiscriminado dos produtos na tentativa de controlar as infestações. Atualmente, os produtos que atuam diretamente em mecanismos fisiológicos específicos aos parasitos-alvo, que livrem ao máximo os hospedeiros e os seres humanos de possíveis efeitos adversos, além do meio-ambiente, são os mais estudados por pesquisadores e indústrias farmacêuticas.

Dessa forma, pesquisas voltadas ao conhecimento do metabolismo intermediário se fazem tão importantes para que se encontrem possíveis alvos farmacológicos que viabilizem a formulação de produtos antiparasitários. O metabolismo energético está entre as reações de maior importância e destaque, havendo uma relação direta com uma série de outras reações orgânicas.

Dentre os antiparasitários que atuam de forma mais específica nos parasitos-alvo, destacam-se os reguladores de crescimento de artrópodes (do Inglês, *Insect Growth Regulator*, IGR), princípios ativos cujos mecanismos de ação são melhor direcionados aos parasitos, com o objetivo de livrar ao máximo os hospedeiros de possíveis efeitos colaterais do uso do produto antiparasitário. Dentro dessa classe, o fluazuron é o mais utilizado no controle do carrapato bovino.

Embora se conheça muito a respeito da eficácia do fluazuron no controle de *R. microplus*, pouco se sabe a respeito dos efeitos biológicos e fisiológicos no carrapato decorrente do uso deste princípio ativo.

No que diz respeito às vias que regulam o metabolismo de carboidratos, diferentes enzimas das vias glicolítica, gliconeogênica e glicogênica em *R. microplus* já foram caracterizadas. Devido à importância dessas vias para a disponibilização de glicose, a interferência em alguma dessas rotas metabólicas pode ser letal para o desenvolvimento do carrapato ainda na fase de embrião, ou causar desequilíbrios homeostáticos já na fase adulta.

Sabendo-se da importância estrutural e também energética dos lipídios para o metabolismo e composição da cutícula dos carrapatos, um estudo acerca das possíveis alterações provocadas pela ineficiente síntese de quitina poderia também relacionar os efeitos deletérios dos IGRs a distúrbios na deposição de lipídios na cutícula e na mobilização energética, também fundamentais para o desenvolvimento embrionário.

Além disso, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de detoxificação enzimáticos em carrapatos mediante a exposição ao fluazuron, como a atividade das carboxilesterases, monooxigenases do citocromo P-450 e glutatona-S-transferase, enzimas importantes no processo de metabolização, detoxificação e desenvolvimento de resistência em carrapatos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo esclarecer pontos ainda obscuros acerca do mecanismo de ação dos inibidores da síntese de quitina, ao levantar a hipótese de uma possível

interferência em vias metabólicas alternativas ainda não confirmadas como “alvos” da ação deste antiparasitário regulador de crescimento, como as vias de metabolismo intermediário. Além disso, buscou-se identificar alterações quantitativas nos principais substratos energéticos endógenos (carboidratos e lipídios) utilizados pelos carrapatos, suas interações e as principais vias metabólicas para a excreção do fluazuron.

Como objetivo geral, buscou-se avaliar os perfis metabólicos-energéticos de carrapatos *R. microplus* expostos ao fluazuron. Os objetivos específicos foram: avaliar os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após exposição ao fluazuron; avaliar o metabolismo de carboidratos em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* através da concentração de glicose e LDH na hemolinfa, glicogênio no corpo gorduroso e ácidos orgânicos do ciclo de Krebs na hemolinfa; avaliar o perfil de lipídios neutros no corpo gorduroso, cutícula e ovos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*; avaliar a atividade das enzimas de detoxificação no corpo gorduroso das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*; comparar as atividades das enzimas de detoxificação em ovos e larvas das cepas sensível e resistente ao fluazuron e possíveis danos tissulares através da atividade das transaminases em hemolinfa e ovos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais sobre *Rhipicephalus microplus*

Existem cerca de 870 espécies de carrapatos descritas no mundo, todas agrupadas na subordem Ixodida (=Metastigmata), que se divide em três famílias. A família Ixodidae abrange os carrapatos popularmente conhecidos como “carrapatos duros”, com 685 espécies descritas, enquanto a família Argasidae, os “carrapatos moles”, tem descritas cerca de 185 espécies. A família Nuttalliellidae, com características morfológicas intermediárias entre as duas primeiras, é representada por uma única espécie, *Nuttalliella namaqua*, Bedford, 1931. Os ixodídeos e os argasídeos distribuem-se amplamente em todos os continentes, enquanto a última família é restrita a região afrotropical (PEREIRA et al., 2008).

O gênero *Rhipicephalus*, pertencente à família Ixodidae, tem pouco mais que 70 espécies reconhecidas no mundo. Estudos de filogenia molecular mostraram evidências de que o gênero inclui as cinco espécies de *Boophilus* (Curtice, 1891), sendo este agora considerado um subgênero de *Rhipicephalus*. Todas as espécies apresentam coloração castanha ou castanha avermelhada, escudo não ornamentado, olhos, rostro curto e base do capítulo hexagonal. Os machos possuem duas a quatro placas adanais, e alguns apresentam apêndice caudal (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

O carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini 1887), conhecido como “carrapato bovino”, é originário da Ásia, e foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais por meio da importação de gado para essas regiões. A introdução de raças europeias para outras regiões do mundo, contudo, defrontou-se com uma série de obstáculos, tais como adaptação dos bovinos às condições climáticas, além das doenças parasitárias, dentre elas a babesiose e a anaplasmose bovina, transmitidas por estes carrapatos (PEREIRA et al., 2008).

A importância econômica de *R. microplus* é de âmbito mundial, pois mais de 75% da população bovina é atingida por este parasito, sofrendo toda a seqüela de enfermidades e manifestando os sinais clínicos como anemias, perdas na produção de carne e leite, danos ao couro, etc. Situações que os identificam como o “inimigo número um” da produção bovina (CORDOVÉS, 1997). No Brasil, os gastos decorrentes de problemas causados por este parasito contabilizam prejuízos anuais de US\$ 3,24 bilhões (GRISI et al., 2014).

2.1.1 Ciclo de vida e biologia reprodutiva

Sendo esta espécie homoxena, seu ciclo evolutivo pode ser estudado em dois tempos: fase parasitária (que compreende as fases de larva a adulto no hospedeiro, até o momento em que as fêmeas ingurgitadas e fecundadas se desprendem) e fase não-parasitária (em que as fêmeas fecundadas, uma vez no ambiente, fazem a oviposição e, sob condições favoráveis, as larvas eclodem e permanecem no ambiente, terminando no momento em que estas encontram um hospedeiro, dando início à fase parasitária) (PEREIRA et al., 2008).

A primeira fase dura em média 22 dias e caracteriza-se por apresentar evoluções morfológicas sobre o hospedeiro, onde são discerníveis os estágios de larva, ninfa e adulto. Nesta fase, a dependência em relação ao hospedeiro e a necessidade de fixação em partes do corpo que permitam um maior índice de sobrevivência, fazem com que haja uma competição de ixodídeos por nichos similares (DE PAULA; FURLONG, 2002).

A larva infectante, quando entra em contato com o hospedeiro, busca fixar-se em regiões de seu corpo que favoreçam seu desenvolvimento, tais como: úbere, regiões do períneo, vulva e entre as pernas. Essas regiões preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura da pele, vascularização e temperatura, bem como pela dificuldade de acesso às lambidas do hospedeiro (PEREIRA, 2008; MORANDO; GELINSKI, 2010).

Após sete dias de sua fixação ocorre a muda das larvas para ninfas, e estas mudam para adultos com marcado dimorfismo sexual em aproximadamente oito dias. A fêmea após o acasalamento acelera sua alimentação até o ingurgitamento total, o que propicia sua queda ao solo, enquanto que o macho permanece no bovino à procura de novas fêmeas (MORANDO; GELINSKI, 2010).

Durante a cópula, machos e fêmeas unem-se justapondo as respectivas superfícies ventrais. Não dispondo de órgão copulador, o macho emprega seu hipostômio e quelíceras para dilatar o orifício genital feminino e, depois, para forçar a entrada parcial do espermatóforo, que é cortado com as quelíceras para que os espermatozoides possam penetrar. No interior do aparelho genital feminino os espermatozoides adquirem sua motilidade e fertilizam os ovos. Depois da fecundação, o ovário aumenta consideravelmente de tamanho, exibindo ovos em todos os estágios evolutivos (REY, 2008).

De um modo geral, os animais ovíparos possuem uma embriogênese independente de um aporte nutricional exógeno. Para este caso, os nutrientes maternos são depositados nos oócitos e estocados em grânulos. A maturação dos ovos ocorre durante a fase de pré-oviposição, caracterizada pelo aumento do tamanho do ovário. O período de desenvolvimento embrionário completo leva 21 dias (CAMPOS et al., 2006).

Após o amadurecimento dos ovos, a fêmea se prepara para a postura, flexionando o capítulo para o ventre do corpo, próximo a abertura genital. O órgão de Gené, uma estrutura em formato de vesícula, localizado entre a base do capítulo e o escudo, contém glândulas que liberam uma secreção serosa. A medida que os ovos saem pela abertura genital, eles são recebidos pelos lobos estendidos desta estrutura e são revestidos por essa secreção serosa, que protege os ovos da desidratação e permite a aderência da massa de ovos (BOOTH, 1989).

A teleógina inicia a postura em média, três dias após a queda no solo (FURLONG, 1993; PEREIRA, 2008). Em temperaturas ao redor de 28°C e umidade relativa de 85%, a postura e a eclosão ocorrem em aproximadamente 28 dias; larvas recém-eclodidas precisarão ainda de dois a três dias para o fortalecimento da cutícula e assim, migram para as pontas das folhas, onde podem localizar o hospedeiro pelo odor ou vibrações (FURLONG, 1993; MORANDO; GELINSKI, 2010). O peso total dos ovos, após o término da postura, equivale a 52% do peso vivo da teleógina (PEREIRA, 2008). A cada postura uma fêmea produz de 2.000 a 3.000 ovos (FURLONG, 1993).

O período de postura dos ovos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* pode durar em média 13 ± 5 dias (RAIA et al., 2012), 17 dias (GONZALES, 1975), podendo chegar de dois a três meses dependendo fundamentalmente das condições climáticas existentes (GONZALES et al., 1974).

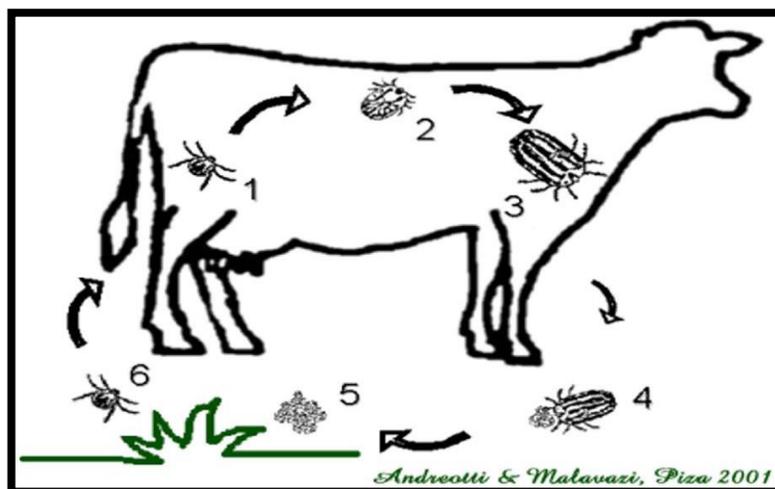


Figura 1. Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Morando (2010) adaptado de Andreotti (2002). Fase parasitária: 1 = larva infestante realizando a fixação no bovino; 2 = ninfa; 3 = teleógina em estágio final de ingurgitamento. Fase de vida livre: 4 = teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5 = ovos, no solo, em período de incubação; 6 = larva, no solo, em período de incubação. Imagem sem escala de correspondência.

2.1.2 Metabolismo de carboidratos em *Rhipicephalus microplus*

As atividades diárias dos artrópodes, tal como de outros animais, requerem um constante suprimento de energia. Por isso, os carrapatos da família Ixodidae, a qual pertence *R. microplus*, ingerem grandes volumes de sangue de seus hospedeiros, usando-o assim como fonte de nutrientes e substratos energéticos, aumentando centenas de vezes seu próprio peso durante o desenvolvimento (MORAES, 2007). A digestão do sangue ingerido pelo carrapato se divide em três fases, sendo duas etapas de digestão contínua e uma mais lenta. Todo o processo acontece de forma única, intracelularmente, nas células intestinais. Os componentes sanguíneos são absorvidos por endocitose mediada por receptores regulados pela proteína quinase C (GALAY et al., 2015).

Durante a alimentação, os carrapatos ingerem carboidratos, lipídios e proteínas de seus hospedeiros, substratos energéticos comuns e fundamentais para a maioria dos organismos vivos (NELSON; COX, 2008; GUIZZO et al., 2012). De um modo geral, a composição desses nutrientes em carrapatos é bem semelhante à dos insetos (GUDERRA et al., 2002). Porém, enquanto nos insetos a trealose é o carboidrato mais importante (SONENSHINE, 1991; NATION, 2002), nos carrapatos, a glicose é o carboidrato mais encontrado na hemolinfa (DEL PINO et al., 1989; SONENSHINE, 1991).

Nos ixodídeos, o órgão responsável pelas reservas energéticas é o corpo gorduroso, que além de estocar certos nutrientes, metaboliza hormônios, moléculas mensageiras essenciais e também resíduos a serem excretados, desempenhando função semelhante ao fígado dos vertebrados. Durante os períodos de não-alimentação, o corpo gorduroso tende a acumular grandes estoques de gotículas de gordura, tal como glicogênio e proteínas (SONENSHINE, 1991). O tipo celular mais abundante no corpo gorduroso são os trofócitos, também chamados erroneamente de adipócitos, já que estas células não acumulam somente lipídios, mas possuem um metabolismo complexo com estoque e síntese de proteínas e também carboidratos, como também demonstrado em insetos (ROMA et al., 2010). A enzima glicogênio-sintase-quinase-3

(E.C. 2.4.1.11), presente tanto em vertebrados quanto em invertebrados é a enzima responsável pela metabolização do glicogênio estocado em glicose através da inibição por fosforilação da glicogênio sintase em carrapatos (LOGULLO et al., 2009).

Graças ao sistema circulatório aberto dos carrapatos, a hemolinfa, que banha os órgãos internos, distribui pelo corpo os nutrientes para que possam chegar às células e garantir assim o desempenho de suas funções (SONENSHINE, 1991). A glicose, entretanto, não é apenas um excelente combustível para energia do organismo, ela também representa um precursor altamente versátil, capaz de suprir uma enorme variedade de intermediários metabólicos para reações de biossíntese (NELSON; COX, 2011), como na biossíntese de quitina nos artrópodes (COHEN, 1987; MERZENDORFER, 2011). Além disso, ela pode ser estocada nas células na forma de polissacarídeo, ser oxidada em composto de três carbonos (ácido pirúvico), via glicólise, para que se obtenha ATP e intermediários metabólicos ou oxidada pela via da pentose-fosfato (NELSON; COX, 2008).

Durante toda a vida do carrapato, diferentes vias metabólicas e diferentes substratos são mobilizados para atender demandas energéticas específicas enquanto o carrapato se desenvolve desde a embriogênese até a fase adulta (CAMPOS et al., 2006; SEIXAS et al., 2012). No metabolismo dos açúcares, diferentes enzimas das vias glicolítica, gliconeogênica e glicogênica de *R. microplus* já foram caracterizadas. Devido à importância das vias para a disponibilização de glicose, a interferência em alguma dessas rotas metabólicas pode ser letal para o desenvolvimento do embrião (GUIZZO et al., 2012).

O desenvolvimento embrionário requer diferentes substratos como as proteínas, carboidratos, lipídios, dentre outras moléculas. Estes componentes são estocados em organelas chamadas de grânulos da gema. A vitelogênese (o acúmulo de gema) é um processo no qual tecidos ovarianos e extraovarianos produzem precursores proteicos que serão acumulados dentro dos oócitos. Uma vez concluída a vitelogênese, os ovos vão conter os nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário que vai ocorrer fora do organismo materno (SEIXAS et al., 2012). No início da embriogênese, observa-se um aumento no conteúdo de glicose e glicogênio nos ovos de *R. microplus*, devido a um aumento na atividade das enzimas relacionadas a gliconeogênese e via glicolítica. Observou-se, contudo, que há um decréscimo nas concentrações de glicose e glicogênio do primeiro ao sexto dia do desenvolvimento embrionário à medida que os eventos da embriogênese acontecem. Em seguida, depois do sexto dia, após a formação do blastoderma, novamente há um aumento na concentração desses substratos (MORAES, 2007).

Posteriormente, durante a segmentação, os carboidratos são os substratos mais utilizados para o desenvolvimento embrionário do carrapato (CAMPOS et al., 2006; GUIZZO et al., 2012), denotando uma dinâmica energética e de biossíntese com comportamentos metabólicos bem particulares ao longo da embriogênese.

A celularização é um processo dirigido tipicamente pela fêmea, durante a oogênese, através da deposição de substratos energéticos nos oócitos. Por outro lado, a segmentação é um processo dependente das reservas do zigoto, sendo consequente da síntese de componentes gerados pelo embrião (CAMPOS et al., 2006).

Após a eclosão, na fase de larva, a via das pentoses representa 20% do total do catabolismo da glicose, enquanto que, comparativamente, nas fêmeas ingurgitadas, nas 24 horas finais da alimentação e período de pré-oviposição, a proporção do ciclo das pentoses aumenta para mais de 50%, retornando a 20% no fim do estágio de oviposição. Estas mudanças são atribuídas à importância do ciclo das pentoses nos processos de biossíntese, que alcançam seus picos durante a vitelogênese, no período de pré-oviposição (TATCHELL; SCHUNTNER, 1972).

Em organismos aeróbios, a glicose e outros açúcares, ácidos graxos e a maioria dos aminoácidos são no final oxidados a CO₂ e H₂O pelo ciclo do ácido cítrico e pela cadeia respiratória. Porém, este ciclo não possui apenas uma função catabólica, mas apresenta a característica de ser uma via anfibólica, ou seja, que serve para processos catabólicos e anabólicos. Além do papel no catabolismo oxidativo, a via fornece precursores para muitas outras vias de biossíntese. O α -cetoglutarato e o oxaloacetato podem, por exemplo, serem precursores de aminoácidos, assim como servirem para a síntese de nucleotídeos. O oxaloacetato pode também ser convertido a glicose através da gliconeogênese (NELSON; COX, 2011), sendo composta por reações anapleróticas, as quais podem abastecer outras vias metabólicas com substratos que as mantêm ativas.

O ácido pirúvico também pode seguir por dois caminhos distintos: ser convertido a glicose e glicogênio, via gliconeogênese, ou oxidado para a produção de acetil-CoA para a produção de energia. Um terceiro destino para o ácido pirúvico é a redução a ácido láctico por meio da fermentação láctica, quando em baixa concentração de oxigênio para suprir o ciclo do ácido cítrico (NELSON; COX, 2011), garantindo a liberação de energia e a reoxidação do NADH.H⁺ citossólico. Tais reações já foram descritas em outros invertebrados que não carrapatos, como no caso de moluscos *Biomphalaria glabrata* infectados por nematoides *Angiostrongylus cantonensis*, onde a infecção pelo parasito aumentou a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) (E.C. 1.1.1.27) (que catalisa a conversão do ácido pirúvico a ácido láctico), associado a uma diminuição na concentração do ácido pirúvico e um aumento nos níveis de ácido láctico na hemolinfa de moluscos, confirmando a aceleração do metabolismo anaeróbio, necessário pelo hospedeiro para obter energia (TUNHOLI-ALVES et al., 2014).

2.1.3 Metabolismo de lipídios em *Rhipicephalus microplus*

Lipídios são compostos orgânicos caracterizados por suas propriedades hidrofóbicas e sua ampla diversidade molecular (MARECHAL et al., 2011; NELSON, COX, 2011). Atuando como importantes substratos energéticos ou componentes celulares, os lipídios encontrados nos carrapatos são os mesmos de outros tecidos animais, como os fosfolipídios, esteróis, acilgliceróis, colesterol livre, colesterol esterificado e ácidos graxos livres (SONENSHINE, 1991). Em insetos, dentre o total de lipídios circulantes presentes na hemolinfa, 70% correspondem a lipídios neutros, enquanto que 30% correspondem a fosfolipídios (BENNETT; SHOTWELL, 1972).

Os lipídios também atuam como segundos mensageiros em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo o sistema imune (CABRAL, 2005) e também na regulação da temperatura corporal (DAVIS, 1974). Tal como apontado por Svoboda et al. (1975), a utilização de esteroides por artrópodes é um ponto dentro do assunto do metabolismo no qual estas espécies diferem muito dos vertebrados.

Pesquisas prévias realizadas por muitos autores já conseguiram caracterizar as diferentes classes de lipídios neutros observados em ovos, hemolinfa e corpo gorduroso de fêmeas de diferentes espécies de carrapatos através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD, do Inglês *Thin Liquid Chromatograph*, TLC) (IWUALA et al., 1979; ANGELO et al., 2010; ANGELO et al., 2013).

No sangue do hospedeiro existe uma variedade de componentes esteroides, porém, quantitativamente, o colesterol é de longe o mais importante para o parasito (CHERRY, 1976). Os ésteres de colesterol são muito importantes para os carrapatos pois participam da síntese de feromônios, além de comporem a maior parte da cutícula em algumas espécies (SOBBHY et al., 1994).

À medida que cessa o período final de ingurgitamento e oviposição, torna-se possível medir o colesterol acumulado durante a vida parasitária e a distribuição para os ovos e tecidos da fêmea, sua conversão e produtos de degradação (CHERRY, 1976). O conteúdo lipídico das fêmeas aumenta de 22 a 63 microgramas do conteúdo total de lipídios por carrapato durante a fase de alimentação (SONENSHINE, 1991).

Segundo Cherry (1976), quanto maior o peso da teleógina no momento da oviposição, maior será o teor de colesterol em seus ovos, pois o teor de colesterol na fêmea está intimamente relacionado ao seu peso e conseqüentemente, ao teor de colesterol dos ovos, que ao final do processo de oviposição, recebem cerca de um terço do colesterol da fêmea ingurgitada.

Durante o desenvolvimento embrionário, mesmo os lipídios sendo metabolizados para a formação do blastoderma celular, mais da metade do total de lipídios presentes nos ovos é consumida até a eclosão, sugerindo que esse seja um substrato importante para a obtenção de energia no estágio larval do carrapato até que o mesmo encontre seu hospedeiro e inicie a alimentação (GUIZZO et al., 2012). Os níveis de ésteres de colesterol, diacilglicerol e triacilgliceróis são os que apresentam os maiores decréscimos à medida que progride a oviposição (IWUALA et al., 1979).

Além disso, Lees e Beament (1948) já demonstraram que a eficiência da camada de cera protetora que reveste os ovos dos carrapatos, conferida pelo órgão de Gené, tem grande importância sobre a embriogênese e conseqüentemente, sobre a eclodibilidade larval, pois oferece uma proteção contra a perda de água. Os ovos recém ovipostos sem o contato subsequente com o órgão de Gené, são altamente permeáveis à água e dessecam rapidamente em meio árido.

Tal como para o estoque de glicogênio, o corpo gorduroso também é um importante órgão de armazenamento de lipídios em carrapatos atuando como um análogo ao tecido adiposo dos vertebrados (SONENSHINE, 1991). Nos insetos, os lipídios são estocados no corpo gorduroso na forma de triacilgliceróis (TAG), os quais são armazenados para uma posterior utilização (PONTES et al., 2008).

Acredita-se que a porção lipídica da cutícula funcione como a principal rota para a remoção de metabólitos lipídicos, principalmente o colesterol em *R. microplus* (CHERRY, 1976). Muitos insetos, de acordo com características do metabolismo próprias de cada espécie, e também seu comportamento circadiano, podem apresentar diferenças quanto à deposição de lipídios na cutícula em função da ação dos hormônios que regulam a muda e o amadurecimento sexual (MORITA et al., 1999).

2.1.4 Metabolismo de proteínas em *Rhipicephalus microplus*

O conhecimento sobre as proteínas que predominam na hemolinfa de carrapatos é mínimo, quando comparado aos insetos. A proteína hemolinfática mais estudada em carrapatos é a vitelogenina (Vg), sintetizada pelo corpo gorduroso da fêmea após se alimentar de sangue. Ela é liberada na hemolinfa e absorvida para o desenvolvimento dos oócitos na forma de vitelina. Além desta, outras proteínas hemolinfáticas importantes em carrapatos são as proteínas carreadoras (CP, responsável pelo transporte de colesterol, fosfolipídios, monoacilgliceróis, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, carboidratos e heme; a proteína HeLp, uma lipoproteína responsável por auxiliar no transporte de heme; e em menor proporção, outras proteínas, como macroglobulinas, lectina, proteínas antimicrobianas, ligantes de hormônio juvenil e esterases de hormônio juvenil) (GUDERRA et al., 2002).

Embora o conteúdo total de proteínas permaneça inalterado ao longo do desenvolvimento embrionário, desde a oviposição até a eclosão, observa-se uma redução de 15% no conteúdo de vitelina antes da celularização (CAMPOS et al., 2006).

Após a formação do blastoderma celular, evento que ocorre entre o quarto e o sexto dia da embriogênese, inicia-se o catabolismo de aminoácidos para a síntese de glicose através da gliconeogênese, de forma que, ao final do desenvolvimento embrionário são encontradas grandes concentrações de guanina nos ovos, provenientes da metabolização dos aminoácidos. O aminoácido aspartato através da ação da aspartato aminotransferase (AST) (E.C.2.6.1.1) é convertido em oxalacetato, metabólito que será dirigido para a via da gliconeogênese. Com isso, a AST tem sua atividade aumentada progressivamente após a formação das células embrionárias à medida que a via da gliconeogênese torna-se mais ativa (GUIZZO et al., 2012). Contudo, mediante uma lesão celular, pode haver o extravasamento celular, com consequente aumento na atividade das aminotransferases na hemolinfa, como já demonstrado em carrapatos *R. microplus* (ANGELO et al., 2015) e também em outros invertebrados (TUNHOLI et al., 2011), já que estas enzimas estão presentes na maioria das células eucarióticas (NELSON; COX, 2011; GUIZZO et al., 2012). Também chamadas de transaminases, as aminotransferases realizam a transferência de um grupo α -amino para o carbono α de um cetoácido, liberando um α -cetoácido, análogo ao aminoácido ou vice-versa. O resultado da reação de transaminação é a coleta de grupos amino, na forma de L-glutamato, a partir de um aminoácido. O glutamato então passa a atuar como um doador de grupos amino para vias biossintéticas ou para vias de excreção. A nomenclatura das diferentes transaminases varia em função do doador do grupamento amino. As mais comuns são a alanina aminotransferase (ALT) (E.C. 2.6.1.2) e AST (NELSON; COX, 2011).

2.1.5 Composição da cutícula

O exoesqueleto de carrapatos é bem similar ao de outros artrópodes, servindo como uma proteção primária à perda hídrica, além de proteção mecânica a outros danos (SONENSHINE, 1991). A natureza do exoesqueleto tem profunda implicação para o crescimento, respiração, locomoção e, também para o desenvolvimento de produtos químicos que possam penetrar no tegumento e serem utilizados como agentes de controle (KLOWDEN, 2007). A cutícula serve de ancoragem aos músculos esqueléticos e protege contra danos físicos, penetração de patógenos e dessecação (KRAMER; KOGA, 1986). As proteínas e a quitina interagem para permitirem a função mecânica da cutícula conferindo a força e a dureza do exoesqueleto, enquanto que os lipídios proveem a proteção e a comunicação e estão localizados principalmente nas camadas mais externas da cutícula (KLOWDEN, 2007). As cutículas ventrais de diferentes espécies de artrópodes possuem diferentes propriedades estruturais para permitir o alongamento em função da necessidade e grau de distensão necessários. Em carrapatos, a distensão ventral está muito relacionada à acomodação da ingestão de sangue (HACKMAN; GOLDBERG, 1987).

A cutícula consiste basicamente em duas regiões: a epicutícula, uma camada fina (cerca de 1 – 2 micrômetros de espessura) composta por diferentes substâncias e a procutícula, compondo uma região bem mais fina formada por proteínas e quitina. A epicutícula é totalmente desprovida de quitina e não é reabsorvida no processo de ecdise. Em carrapatos ixodídeos, ela compreende três camadas distintas: a camada mais interna, densa e homogênea, de aparência estriada, a segunda camada, composta por lipoproteínas e por último, uma camada cerosa, composta por lipídios produzidos por secreções das glândulas dérmicas (SONENSHINE, 1991).

Os principais componentes da cutícula de todos os artrópodes são proteínas e quitina. Os lipídios também são muito importantes, porém estão em menor proporção que as proteínas e a

quitina. Em carrapatos, a quitina e as proteínas correspondem a cerca de 90% ou mais da composição da cutícula. A quitina está presente na forma de microfibrilas numa matriz proteica, cerca de 4 a 12% do total conteúdo da cutícula. Embora possua uma longa organização polimérica, com frequentes ligações cruzadas, garantindo uma certa resistência a cutícula, a quitina por si só, não é a única responsável pelo endurecimento da cutícula (SONENSHINE, 1991).

As proteínas são as responsáveis pelo endurecimento da cutícula em carrapatos, tal como nos demais artrópodes. Na epicutícula, as proteínas ocorrem na forma de lipoproteínas que ajudam a conferir a coloração amarelada a âmbar característica dessa camada. A quitina é um aminopolissacarídeo homopolímero de ligações β -1,4 de unidades de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) (COHEN, 1987; PALLI; RETNAKARAN, 1999). Sua síntese envolve múltiplas atividades celulares, começando na biotransformação de simples metabólitos até culminar na emergência de um polímero a ser liberado pela membrana celular (COHEN, 1987). Tanto nos carrapatos quanto em fungos, a via comum de síntese da quitina envolve um número definido de reações enzimáticas que convertem diferentes açúcares em polímeros de GlcNAc. A fonte de açúcar é a glicose ou os compostos de estocagem, glicogênio ou trealose (KRAMER; KOGA, 1986; MERZENDORFER, 2011).

Inicialmente, unidades de glicose são convertidas em GlcNAc, ligadas a uridina trifosfato (UTP); transportadas na célula combinadas ao dolicol fosfato; polimerizada em quitina, e depois, ligadas covalentemente a proteínas para formar microfibrilas de quitina na cutícula (PALLI; RETNAKARAN, 1999) (Figura 2). O substrato imediato para polimerização, 5'-uridina difosfo-N-acetil-D-glicosamina (UDP-GlcNAc) é um metabólito final de uma cascata de transformações bioquímicas citoplasmáticas (COHEN, 1987).

A enzima ligada à membrana, quitina sintase (QS) [UDP-2-acetamido-2-deoxi-D-glicose: quitina 4- β -acetamidodeoxiglicosiltransferase (EC 2.4.1.16)], é a enzima chave na formação da quitina, pois é ela que catalisa a formação de quitina a partir de UDP-GlcNAc. A QS é membro de uma classe de enzimas, conhecidas como polimerizadoras – glicosiltransferases, responsáveis pela síntese de outros importantes biopolímeros como a celulose e hialuronan (CHANG; MOSQUIT; FINNEY, 2004). Seu grau de atividade enzimática é possivelmente regulado pela presença de UDP-GlcNAc, magnésio e GlcNAc no sítio de polimerização (COHEN, 1987).

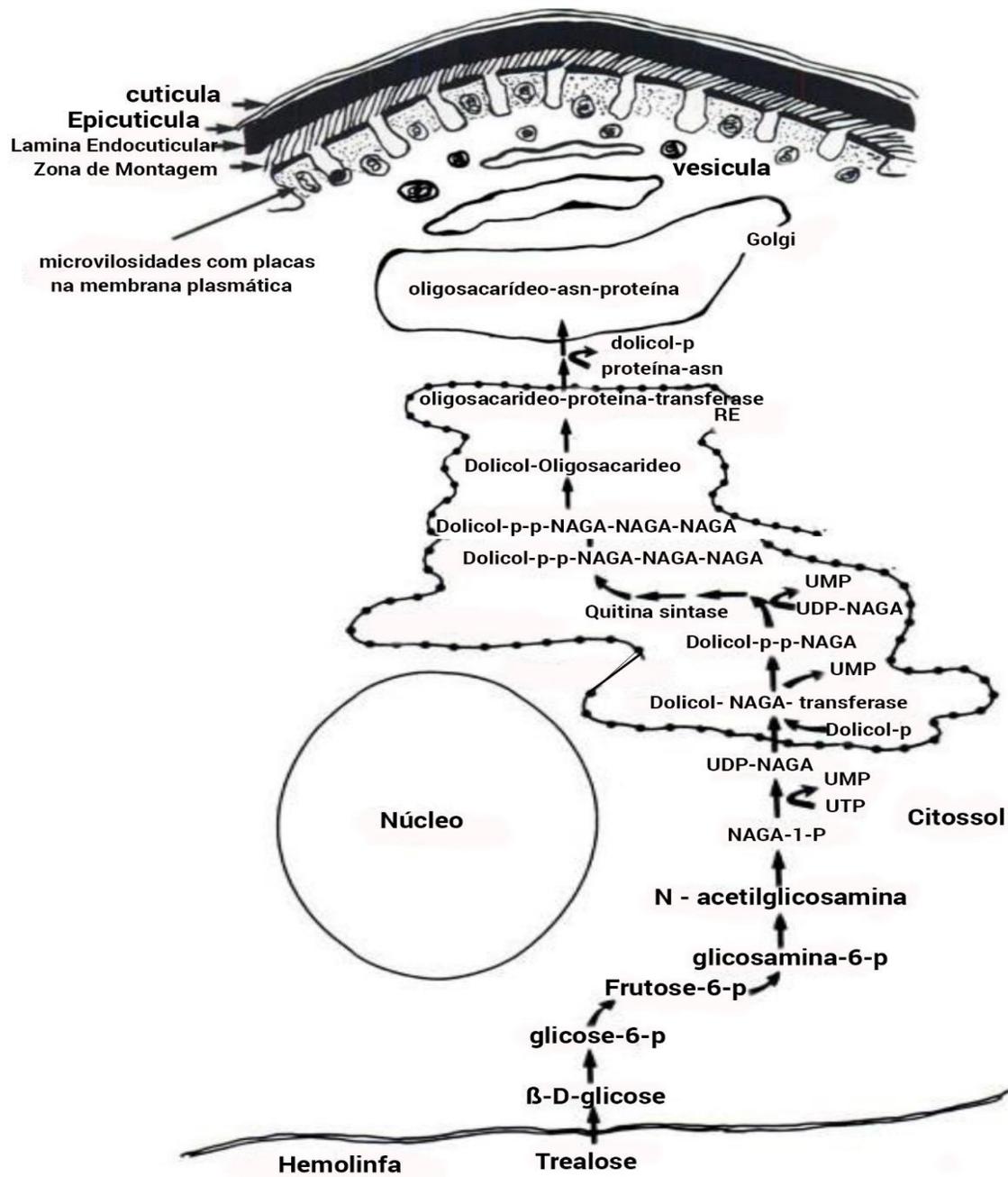


Figura 2. Biossíntese do polímero de quitina em insetos. Em insetos, o início acontece como captação da trealose a partir da hemolinfa. Em seguida, ocorre a participação das organelas retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, com a posterior liberação das vesículas que irão se deslocar em direção às microvilosidades da membrana celular. Em carrapatos, a diferença é a captação direta da glicose da hemolinfa. (Fonte: PALLI; RETNAKARAN, 1999)

A síntese de quitina ocorre durante a embriogênese, ecdise e ingurgitamento de todos os instares (MELO, 2007). A cutícula é a primeira barreira contra a perda rápida de água por carrapatos e nesse ponto, os lipídios presentes na superfície externa desempenham um papel fundamental nesse processo. Os lipídios, presentes na camada mais externa da epicutícula, são provenientes primariamente de secreções das glândulas dérmicas (SONENSHINE, 1991).

Sabe-se que nos insetos, o revestimento ceroso da cutícula é muito importante para impedir a perda hídrica, proteger de danos abrasivos, servindo como uma barreira a penetração de microorganismos, além de interferir na absorção de inseticidas e outras substâncias eventualmente presentes no ambiente. Os lipídios cuticulares também atuam como feromônios em muitos casos (BLOMQUIST; JACKSON, 1979).

Em estudos realizados com *Dermacentor variabilis* (Say, 1821), foram mensurados os conteúdos lipídicos cuticulares através de uma extração com clorofórmio e metanol a partir de fêmeas alimentadas e não alimentadas usando análises gravimétricas e CCD. Através desse estudo sobre lipídios neutros, demonstrou-se haver nas amostras esteróis, triacilgliceróis, ácidos graxos, metil ésteres dentre outros ésteres. Ácidos graxos livres resultantes da decomposição de metil ésteres também foram detectados. Os triacilgliceróis estavam presentes em grande quantidade. O colesterol e o éster de colesterol foram os componentes da classe éster esterol/esteril mais abundantes presentes nas amostras. A maior fração dos lipídios cuticulares observada foi de colesterol, do qual 75% era esterificado (SONENSHINE, 1991).

Estes achados revelam que as composições lipídicas dos carrapatos variam significativamente do que é observado em insetos, no qual há um prevaletimento de longas cadeias de hidrocarbonetos. Um melhor entendimento acerca da composição lipídica cuticular permite um melhor entendimento das capacidades de regulação da perda de água (SONENSHINE, 1991) e do controle da temperatura crítica pelo carrapato, como demonstrado no carrapato do coelho *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) (DAVIS, 1974).

2.1.6 Mecanismos de detoxificação e desenvolvimento da resistência aos xenobióticos

A resistência se define em linhas gerais como uma “falha” de uma droga no controle de um parasitismo, o que em termos formais se traduziria em “uma habilidade de uma cepa ou linhagem de parasitos sobreviver e/ou se multiplicar independentemente da administração e absorção de uma droga dada em dose igual ou maior à usualmente recomendada, porém dentro dos limites de tolerância” (ABAS et al., 2014).

Dentre os fatores que propiciam ao desenvolvimento da resistência destacam-se: fatores genéticos (a dominância de alelos para resistência), fatores relacionados à natureza da droga e administração da mesma (possibilidade de desenvolvimento de resistência cruzada com outros princípios-ativos, *clearance* por parte do hospedeiro e uso inadequado em subdoses) e fatores biológicos inerentes à relação hospedeiro-parasito e comportamentais do parasito (ex. a seleção realizada pela imunidade do próprio hospedeiro atrapalharia no sucesso da população dos parasitos resistentes em se desenvolverem e se multiplicarem e a migração no meio ambiente) (ABAS et al., 2014).

O uso excessivo e indiscriminado de ectoparasiticidas tem levado ao desenvolvimento da resistência a pesticidas em artrópodes (WANG et al., 2014; RECK et al., 2014). Tal resistência tem representado um entrave aos programas de controle da população de artrópodes vetores. Por isso, o conhecimento sobre os mecanismos bioquímicos que geram a resistência aos inseticidas se tornaram a base para os programas de manejo integrado de pragas (WANG et al., 2014). Os bioensaios são essenciais no diagnóstico da resistência em *R. microplus* e os ensaios enzimáticos

nos permitem avaliar o perfil da população em estudo, atuando assim como um complemento no estudo do manejo da resistência aos princípios-ativos (MENDES et al., 2001).

Os mecanismos de resistência são geralmente baseados em suas propriedades bioquímicas/fisiológicas, ou ainda nos mecanismos de resposta ao pesticida (a interação com um sítio-alvo) ou o decréscimo na exposição ao produto antiparasitário (penetração, distribuição, metabolismo e excreção) (FURLONG; SALES, 2007; WANG et al., 2014).

Os artrópodes são conhecidos por terem três vias metabólicas para detoxificação de compostos xenobióticos: (i) carboxilesterases, (ii) monooxigenases do citocromo P450 e (iii) glutathiona-S-transferase (GST) (E.C. 2.5.1.18) (DUSCHER et al., 2014). Ensaio bioquímico com diferentes populações de carrapatos e também com insetos demonstraram ocorrer elevação das atividades destas enzimas em cepas resistentes quando comparadas a cepas sensíveis (FREITAS et al., 2007; ENAYATI et al., 2009; ENAYATI et al., 2010; BARROS et al., 2013; WANG et al., 2014) associando o desenvolvimento da resistência a uma maior atividade dessas enzimas.

As carboxilesterases são geralmente estudadas em dois grandes grupos: α -esterases e β -esterases, podendo ser observadas diferenças na atividade de apenas de uma dessas classes mediante efeito da exposição a determinado xenobiótico, como observado por Mendes et al. (2001). Estes autores observaram que a exposição de cepa resistente de *R. microplus* a deltametrina resultou em um aumento na atividade de α -esterases. Porém, as β -esterases não apresentaram alteração na sua atividade. As esterases também são conhecidas por participarem da metabolização de análogos do hormônio juvenil, sendo mais atuante no processo que as monooxigenases (HODGSON, 1983). O aumento da atividade das esterases também foi associado ao desenvolvimento de resistência ao propetanfós e cipermetrina por *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878) (ENAYATI et al., 2009; ENAYATI et al., 2010).

A família GST representa um grupo de isoenzimas multifuncionais encontradas em todos os eucariotos. Suas estruturas e propriedades bioquímicas a classificam como sendo uma enzima microsomal, dividida em várias classes: Alfa, Mu, Pi, Teta, Ômega, Sigma e Zeta (HE et al., 1999; FREITAS et al., 2007), com a classe Epsilon presente nos insetos (DING et al., 2003). O aumento da atividade da GST está relacionado à presença de moléculas que causam estresse oxidativo (FREITAS et al., 2007). O mecanismo envolvendo a GST se baseia na ligação da glutathiona ao composto xenobiótico, tornando-o mais hidrossolúvel. As moléculas assim, podem facilmente ser transportadas para fora da célula através da ajuda de proteínas transportadoras, num processo que envolve a hidrólise do ATP. A GST está relacionada ao desenvolvimento de resistência à permetrina em *R. microplus* (HE et al., 1999) em *R. sanguineus* (DUSCHER et al., 2014) e ao princípio-ativo ciflumetofen em *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval, 1867) (WANG et al., 2014).

Citocromo P-450 compreende um grupo de enzimas que representam parte de um sistema de monooxigenases presente em diversos seres vivos, como animais, plantas e microrganismos. Catalisam uma série de reações oxidativas incluindo a metabolização de xenobióticos em reações de monoxigenações. Em insetos, estão presentes nos túbulos de Malpighi, intestino e corpo gorduroso (HODGSON, 1983). Barros et al. (2013) relataram que a resistência da mosca do chifre *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) a cipermetrina estaria associada principalmente ao aumento na atividade das monooxigenases e, secundariamente a redução da sensibilidade do sítio-alvo ao princípio-ativo.

O teste de imersão de adultos (*adult immersion test*, AIT) com dose de discriminação tem sido recomendado como um ensaio preliminar para o diagnóstico de resistência (RECK et al., 2014). É um bioensaio aplicado em fêmeas ingurgitadas de carrapatos, descrito por Drummond et

al. (1973), recomendado pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e utilizado para determinar a eficácia relativa de acaricidas contra os carrapatos (ANDREOTTI, 2010).

2.2 Acaricidas Inibidores da Síntese de Quitina

No histórico do combate contra *R. microplus*, do início do século XX até nossos dias, observa-se o surgimento de carrapaticidas com eficácia cada vez maior. Entretanto, tal eficácia, por si só, mostra-se insuficiente para evitar o prejuízo causado por esses ixodídeos. O conhecimento de uma melhor estratégia para combate mostra-se necessária, sendo adquirida por meio da busca de melhores informações acerca da biologia desse parasito, sabendo onde e como ele vive e quais são as suas estratégias de sobrevivência e seus pontos fracos. A obtenção e a fixação desses conhecimentos conduzem naturalmente o estudo para o que já se sabe ou ainda se ignora no que tange à ecologia e epidemiologia de *R. microplus* (PEREIRA et al., 2008).

Desde meados do século XIX, quando a “indústria do gado” estava começando a se desenvolver em muitos países tropicais subtropicais, os carrapatos se tornaram um grande problema econômico para os pecuaristas e, conseqüentemente, medidas de controle começaram a ser desenvolvidas (GRAF et al., 2004).

O controle químico por uso de acaricidas sintéticos, representado por uma grande variedade de princípios ativos existentes no mercado, tem sido a principal alternativa para minimizar as perdas econômicas referentes à infestação por estes ectoparasitos, apesar do alto custo na aquisição dos produtos, do treinamento de mão-de-obra para aplicação e a contaminação ambiental, somada aos riscos para a saúde humana pela exposição a estes (OLIVEIRA et al., 2014).

Até meados do século XX, os meios disponíveis para o controle do carrapato eram muito limitados. Os principais produtos utilizados eram os derivados de arsênio, caracterizados por sua baixa eficácia e efeito residual e sua toxicidade elevados. Com a descoberta das propriedades inseticidas do DDT em 1939 e o desenvolvimento posterior de pesticidas orgânicos, a situação melhorou dramaticamente para os criadores de gado em todo o mundo. O controle químico de carrapatos pôde então aproveitar o grandioso desenvolvimento industrial de inseticidas e acaricidas. Todas as principais categorias de inseticidas: organoclorados, organofosforados, amidinas, piretróides e os reguladores de crescimento deram à luz produtos eficazes no controle de carrapatos (GRAF et al., 2004).

Os reguladores de crescimento são caracterizados por não necessariamente matarem os artrópodes diretamente, mas, por interferirem em alguma via do processo de crescimento e desenvolvimento destes. Eles agem principalmente no desenvolvimento embrionário, larval, e ninfal de insetos e carrapatos, ao interferirem na metamorfose e reprodução (GRAF, 1993).

Um dos maiores grupos de reguladores de crescimento que merecem atenção especial é o grupo das benzoilfeniluréias, conhecidas por inibirem a ação da quitina sintase (ECK, 1979). Os princípios ativos deste grupo utilizadas no controle do carrapato são fluazuron e diflubenzuron (FURLONG, 2007). Em adição à inibição direta da enzima, vários outros modos de ação tem sido sugeridos para as benzoilfeniluréias como (i) inibição do transporte de UDP-GlcNAc através das biomembranas, (ii) inibição da protease que ativa a quitina sintase, (iii) bloqueio do metabolismo da ecdisona, resultando em acúmulo da ecdisona, o qual estimula a quitinase e degrada a quitina recém-formada, (iv) bloqueio da conversão da glicose a frutose 6-fosfato, (v) bloqueio da atividade da QS por um metabólito ativo da benzoilfeniluréia e (vi) bloqueio da ligação da quitina à proteínas cuticulares (PALLI; RETNAKARAN, 1999).

As primeiras moléculas do grupo benzoilfeniluréia foram destinadas ao mercado agrícola para controle de ácaros e lagartas. A primeira molécula a ser apresentada foi o diflubenzuron (1975) e posteriormente vieram triflumuron (1979), teflubenzuron (1983), flufenoxuron (1986), flucicloخورon (1988), lufenuron (1989), fluazuron (1992), clorfluazuron (1994), hexaflumuron (1995) e novaluron (1996) (SOUZA, 2009).

O fluazuron (3-[3-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridinyloxy)-4-chlorophenyl]-1-(2,6-difluorobenzoyl)-urea) (NOVARTIS®) é um representante da classe das benzoilfeniluréias. Ele não atua no sistema nervoso dos parasitos, como muitos outros parasiticidas: as fêmeas de carrapatos que absorvem o fluazuron ao se alimentarem de sangue mostram sinais de dificuldade para se ingurgitarem e os ovos liberados não dão origem a larvas viáveis. Os machos que absorvem o produto não são visivelmente afetados pelo composto. O fluazuron interrompe o ciclo de vida dos carrapatos imaturos ao interferir na formação da cutícula durante o ingurgitamento e muda. Ele foi o primeiro regulador de crescimento a ser registrado para o controle de carrapatos ixodídeos. Quando aplicado na forma *pour-on*, oferece longa proteção contra carrapatos homoxenos (NOVARTIS).

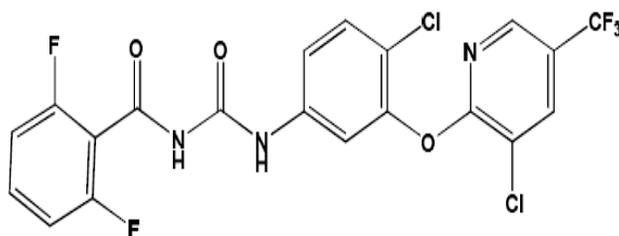


Figura 3. Fórmula estrutural do fluazuron ((3-[3-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridinyloxy)-4-chlorophenyl]-1-(2,6-difluorobenzoyl)-urea))(INCHEM, 2009).

Vários autores já comprovaram a eficácia do fluazuron sobre carrapatos *R. microplus* (BULL et al., 1996; CITRONI et al., 1999), *R. sanguineus* (MELO, 2007; OLIVEIRA et al., 2012), além de outros ectoparasitos como o ácaro causador de sarna *Sarcoptes scabiei* em suínos (PASAY et al., 2012) e a pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães (VIEIRA, 2009). Porém, relatos de resistência a este princípio-ativo já foram relatados em *R. microplus* (RECK et al., 2014).

Por serem mais específicos, esses compostos possuem risco de contaminação ambiental reduzido e também não agem sobre os vertebrados, que não dependem de estruturas quitinosas (OLIVEIRA, 2012). De maneira semelhante aos derivados das lactonas macrocíclicas, o fluazuron também não pode ser utilizado nos animais em lactação (FURLONG et al., 2007).

Calligaris et al. (2013) descreveram algumas alterações ultraestruturais observadas em fêmeas de *R. sanguineus* expostas ao princípio-ativo fluazuron. Dentre as alterações, observou-se: hipostômio e quelícera menores, escudo menos esclerotizado, sensila e poros menores, ausência de ranhuras dorsais e das estrias marginais e cervicais, festões e placa anal com danos. Os autores consideraram que tais alterações teriam importante papel para a sobrevivência dos carrapatos e que isso poderia comprometer parcial ou totalmente o desenvolvimento das ninfas e a emergência dos adultos após a muda.

A *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2004) com base em estudos de resíduos de drogas veterinárias em animais e alimentos, estabeleceu as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fluazuron em diferentes espécies animais.

O fluazuron é lentamente absorvido e distribuído pelos tecidos. Fluazuron radio lábil foi inicialmente observado no plasma 16 h após o tratamento e os níveis plasmáticos permaneceram constantes entre os dias 9 e 35 após o tratamento. Em seguida, diminuíram com uma meia-vida de eliminação de 73 dias (WHO, 2012).

Segundo Thomas et al. (1992 apud FAO, 2004) na aplicação do fluazuron em dose única de administração ($2,5 \text{ mg. kg}^{-1}$) pela via *pour-on* (sobre a pele, na altura da cernelha, seguindo pela coluna vertebral do animal até a base da cauda) detectou-se o princípio ativo no plasma na concentração de $10 \pm 3 \text{ } \mu\text{g. L}^{-1}$ e $1,6 \text{ mg. kg}^{-1}$ no tecido adiposo em estudo que levou 84 dias. O composto inicial e seu metabólito ativo possuem alta afinidade pelo tecido adiposo, havendo alta deposição do composto no local de aplicação.

Resíduos de fluazuron também foram detectados através de técnicas de Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência (CLAE-UV) em musculatura esquelética, fígado, rins e tecido adiposo, após via de aplicação *pour-on*, em vários estudos relatados no documento da FAO (1998), os quais concluem que o nível de resíduos nos tecidos, embora fique por curto período de tempo, são diretamente relacionados a dose do composto aplicado.

Baseado no padrão de excreção do fluazuron pelas fezes, cerca de $2/3$ da dose aplicada foi excretada sob a forma do metabólito, enquanto que $1/3$ foi excretado na forma inalterada. O metabolismo do fluazuron se baseia na clivagem da ponte de bezoilureia, seguido de reações de hidroxilação do metabólito no anel fenil, levando a formação do composto que é eliminado principalmente pelas fezes (FAO, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Esta pesquisa foi conduzida nas dependências do Laboratório de Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (DCFis, ICBS), Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), Laboratório de Controle Microbiano (LCM) Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) e Central Analítica do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas. Todos os laboratórios estão localizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ (latitude: 22° 44' 38" S; longitude: 43° 42' 27" W e altitude: 26m).

A etapa de avaliação das enzimas de detoxificação foi realizada no Laboratório de Parasitologia Veterinária, no Instituto de Pesquisas Desidério Finamor, em Eldorado do Sul, RS (latitude: 30° 05' 02" S; longitude: 51° 36' 58" W e altitude: 19m).

3.2 Obtenção das Fêmeas Ingurgitadas, Observação da Macromorfologia e Formação dos Grupos Experimentais

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-UFRRJ), sob o protocolo número: 023/2015.

Foram utilizados seis bovinos machos (mestiço de *Bos taurus taurus* e *Angus*), com idade variando entre seis meses a um ano, infestados com larvas oriundas de 1g de ovos (aproximadamente 2500 larvas) de carrapatos da espécie *R. microplus*, obtidos da colônia experimental do LDP. Os bezerros foram mantidos em baias individuais nas dependências da UFRRJ e alimentados com volumoso e concentrado e água *ad libitum* ao longo do estudo.

As infestações aconteceram em quatro dias (dia -21, -17, -13 e -6) antes do tratamento dos bezerros com fluazuron. O dia 0 (zero) foi o dia do tratamento dos bezerros do grupo exposto. Ao completar 21 dias após cada infestação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas do chão das baias (dia 0, antes da aplicação do fluazuron, +4, +8 e +15).

Após a coleta das fêmeas, as mesmas foram analisadas quanto a sua macromorfologia e possíveis alterações macroscópicas em função da exposição ao fluazuron.

Três animais foram utilizados como grupo controle, recebendo água destilada como tratamento, e três foram tratados com o produto comercial Acatak[®] (princípio-ativo: fluazuron) na dose recomendada pelo fabricante (2,5 mg.kg⁻¹; 10 mL de Acatak para cada 100 kg de peso vivo) pela via de administração tópica (*pour-on*). Em resumo, a Figura 4 apresenta as datas de infestação e suas respectivas datas de coleta das fêmeas no chão da baia após cessado o período de hematofagismo sobre o animal.

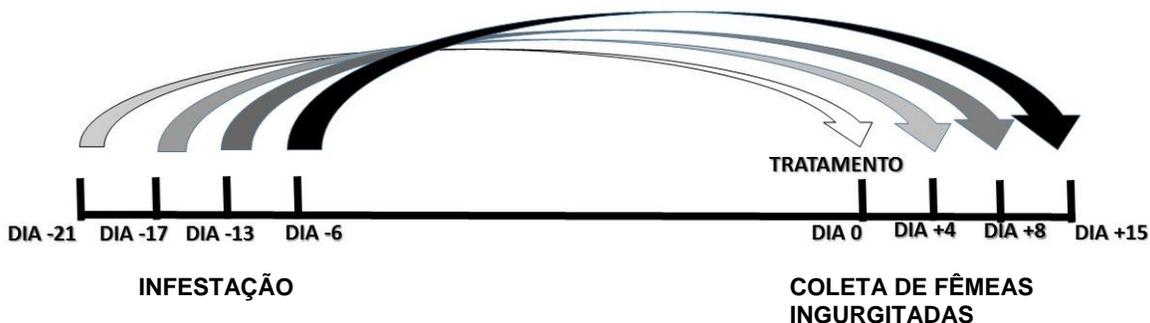


Figura 4. Organograma das datas de infestação dos bovinos com larvas de *Rhipicephalus microplus* e as respectivas datas de coleta de fêmeas ingurgitadas para avaliação do metabolismo energético e protéico após exposição ao fluazuron.

Para a realização dos testes de imersão (*in vitro*), utilizou-se fêmeas ingurgitadas provenientes da colônia experimental mantida no LQEPV (cepa sensível, Porto Alegre) e fêmeas ingurgitadas obtidas do Laboratório de Parasitologia Animal do IPVDF (cepa resistente, Jaguar).

3.3 Avaliação dos Parâmetros Biológicos de Fêmeas Ingurgitadas

Para a avaliação dos parâmetros biológicos, 15 fêmeas ingurgitadas provenientes de cada grupo experimental (controle e tratado) dos quatro dias de coleta, foram pesadas individualmente e acondicionadas em placas de Petri, fixadas em posição dorsal com auxílio de fita adesiva e mantidas em estufa do tipo BOD, na temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 5\%$ para acompanhamento diário da postura (até que fosse observada a ausência de postura da fêmea). Não houve manutenção de fotoperíodo. Ambos os grupos foram alocados de forma homogênea com relação ao peso médio das fêmeas recuperadas.

Diariamente foram registrados os seguintes parâmetros biológicos: peso da postura diária de cada fêmea, período de postura (dias que compreendem o intervalo do primeiro ao último dia da postura), índice de produção de ovos (segundo BENNETT, 1974), índice de eficiência reprodutiva (segundo MELÉNDEZ et al., 1998), índice nutricional (segundo BENNETT, 1974) e percentual de eclosão (estimativa visual percentual da quantidade de larvas eclodidas em relação à massa total de ovos de cada fêmea). Ao final do período de postura, após 3 dias consecutivos sem oviposição, as fêmeas foram pesadas novamente para a obtenção do peso das quenóginas. As fórmulas referentes aos índices de produção de ovos, eficiência reprodutiva e nutricional estão no Anexo 1.

3.4 Coleta de Hemolinfa de Fêmeas Ingurgitadas

Noventa fêmeas ingurgitadas de ambos os grupos controle e tratado nos quatro dias de coleta das foram destinadas para coleta de hemolinfa e análises bioquímicas. Para a etapa de coleta de hemolinfa e dissecação das fêmeas ingurgitadas, padronizou-se o peso das fêmeas utilizadas entre 200 e 350 mg.

As fêmeas ingurgitadas foram levadas ao laboratório, lavadas com água potável e depois, realizou-se assepsia da cutícula com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%. Para a coleta da hemolinfa, perfurou-se a superfície dorsal da cutícula das fêmeas com auxílio de agulha de insulina 0,3 mm. Com uma suave pressão sobre o corpo do carrapato, a hemolinfa pôde ser coletada com um capilar de vidro 0,3 mm acoplado a uma borracha flexível (Figura 5). As

amostras foram colocadas em microtubos contendo 30 μL de coquetel de inibidores de protease (Inhibit® Sigma-Aldrich) e 82 μL de solução salina (NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM) acrescido de feniltiuréia e mantidas no gelo durante toda a coleta. Após a coleta, a hemolinfa foi centrifugada a 5040 \times g durante 10 minutos a 4 °C e o plasma da hemolinfa mantido a -80 °C até a realização das análises (ANGELO et al., 2010).

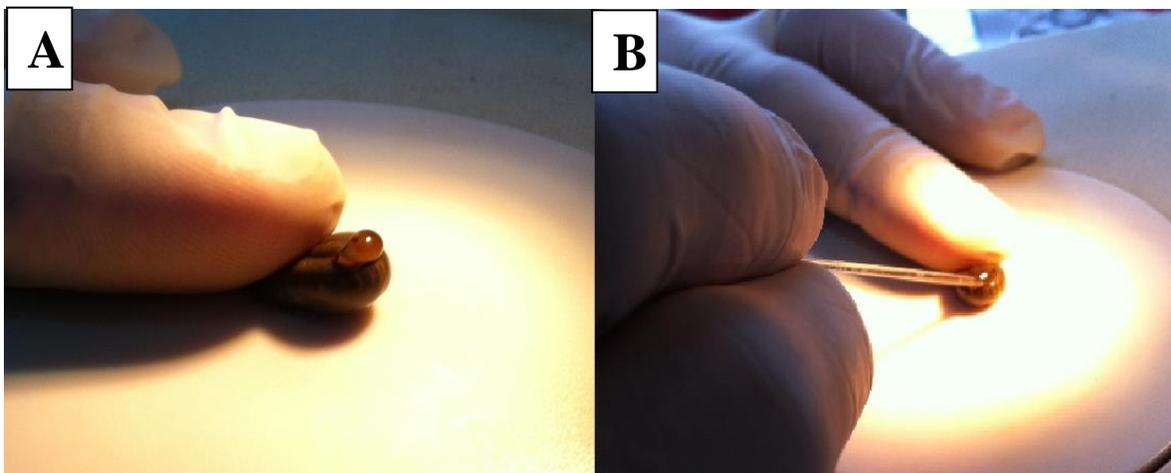


Figura 5. Coleta de hemolinfa a partir da superfície dorsal da fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus microplus*. (A) Após leve perfuração da cutícula, a hemolinfa extravasa pela superfície dorsal. (B) A hemolinfa é coletada com auxílio de um tubo capilar, de acordo com Angelo et al., 2010.

3.5 Dissecção de Fêmeas Ingurgitadas

Logo após a coleta de hemolinfa, as fêmeas foram mantidas em gelo para a obtenção do corpo gorduroso parietal e cutícula.

Para esta etapa, a porção anterior da fêmea ingurgitada foi removida com uma lâmina de bisturi e todo o conteúdo interno foi removido após uma leve pressão em meio contendo tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 a 4 °C. Realizou-se a ablação longitudinal lateral na cutícula das fêmeas para que se pudesse em seguida, realizar a coleta do corpo gorduroso parietal.

3.5.1 Obtenção dos corpos gordurosos

Os corpos gordurosos de 30 fêmeas por grupo (controle e tratado), em cada data experimental, foram coletados e separados em três alíquotas de 10 corpos gordurosos em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) a 4 °C. Os corpos gordurosos foram removidos dos carrapatos com o auxílio de uma pinça e microscópio estereoscópico. Em seguida, foram lavados e armazenados em microtubos a -80° C até a realização das análises. Para a realização das análises bioquímicas, os corpos gordurosos foram homogeneizados em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) a 4 °C usando um homogeneizador Potter-Elvehjem com pistilos de plástico acoplados, de acordo com Angelo et al. (2013).

3.5.2 Obtenção das cutículas

Após a remoção dos corpos gordurosos, as cutículas foram limpas de qualquer resíduo de sangue ou órgãos, abertas longitudinalmente e colocadas em papel absorvente sobre a bancada para secagem ao ar. Em seguida, foram feitas três alíquotas em microtubos na quantidade de 10 cutículas por alíquota para a realização da extração de lipídios.

Para a extração dos lipídios, macerou-se as cutículas em nitrogênio líquido com ajuda de um gral e pistilo até que ela se tornasse pó. Em seguida, o macerado contendo 10 cutículas foi pesado, e para a formação dos grupos, pesos aproximados (60 g) foram usados para a extração dos lipídios neutros.

3.6 Obtenção de Ovos

Para a obtenção dos ovos, após a assepsia da cutícula, 20 fêmeas ingurgitadas foram mantidas (conforme descrito no item 3.3) em placas de Petri e incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ até o final da postura. Os ovos foram separados e imediatamente congelados no quinto dia de postura para padronização do status nutricional dentro do período de postura da fêmea e do tempo de desenvolvimento embrionário. Em seguida, foram homogeneizados e congelados para as posteriores análises bioquímicas. Os ovos foram estocados em microtubos e congelados a -80°C para as análises das composições de lipídios neutros (por CCD), ALT, AST e proteínas totais. Tais análises bioquímicas foram realizadas em homogenatos dos ovos, obtidos a partir da maceração de 50 mg de ovos em 1 mL de água destilada.

Na obtenção dos ovos, não foram utilizados os ovos encarquilhados (escurecidos e inviáveis) para a realização dos testes bioquímicos.

3.7 Teste de Imersão de Fêmeas Ingurgitadas

Para a avaliação das enzimas de detoxificação, as fêmeas ingurgitadas foram remanejadas em 4 grupos experimentais, cada qual contendo 10 espécimes. Todo o experimento foi realizado em triplicata, totalizando 120 fêmeas ingurgitadas, provenientes de bezerros mantidos na colônia experimental do LQEPV (cepa sensível, Porto Alegre, RJ) e da colônia experimental mantida no Laboratório de Parasitologia Veterinária do IPVDF (cepa resistente, Jaguar, RS).

O teste de imersão seguiu o Guia de Manejo Integrado e Controle de Pragas em Ruminantes, preconizado pela FAO (FAO, 2004). Após o teste de imersão, as fêmeas foram colocadas em placas de Petri presas por suas superfícies dorsais para posterior recolhimento da postura e utilização de ovos e larvas.

Foram realizados testes bioquímicos enzimáticos de ovos (ovos do quinto dia de postura, para padronização do status nutricional e biológico do ovo) e de larvas com idade entre 14 e 16 dias (provenientes dos ovos do intervalo do primeiro ao quarto dia de postura). Este mesmo teste foi realizado com uma cepa resistente (cepa Jaguar, RS) para que fosse feito ao final, uma comparação entre o comportamento enzimático das duas cepas.

Com base no estudo desenvolvido por Reck et al. (2014) no qual alguns parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas foram avaliados em cepa resistente comparativamente à cepa sensível ao fluazuron após teste de imersão, no presente estudo, foram avaliados os efeitos do fluazuron sobre as atividades das enzimas de detoxificação seguindo-se o mesmo protocolo no teste de imersão.

Para a realização do teste de imersão, o princípio-ativo fluazuron em pó (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, USA) foi diluído em água estéril miliQ e acetona contendo Triton X-100 a 2% (Merck, Darmstadt, Alemanha) para produzir uma solução-mãe de fluazuron a 1.000 ppm. A partir desta solução-mãe de fluazuron, foi realizada uma nova diluição em água estéril miliQ para que se obtivesse a concentração final de 50 ppm de fluazuron (RECK et al., 2014).

Segundo Reck et al. (2014), na concentração de 50 ppm é possível facilmente observar a influência do fluazuron nos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas expostas a este princípio-ativo, logo, no presente estudo foi utilizada a mesma concentração.

Após o tempo de imersão de um minuto, os carrapatos foram secos e presos em placas de Petri por suas superfícies dorsais e incubados em BOD a $27^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ a 80% de umidade relativa para acompanhamento da postura.

3.7.1 Obtenção de ovos e larvas para avaliação das enzimas de detoxificação

Pools de ovos de cada grupo foram coletados no quinto dia de postura e congelados a -80°C para avaliação da atividade enzimática nos ovos. De acordo com Bennet (1974), ovos do quinto dia de postura de *R. microplus* apresentam o maior percentual de eclosão quando comparados aos ovos postos em outros dias.

As massas de ovos do primeiro ao quarto dia foram separadas em porções em pequenos recipientes de vidros com rolhas de algodão para acompanhamento da eclosão das larvas. À medida que as larvas chegavam a idade de aproximadamente 14 a 16 dias, foram congeladas para as posteriores análises bioquímicas (RECK et al., 2014).

3.8 Testes Bioquímicos

3.8.1 Técnicas bioquímicas com espectrofotometria

3.8.1.1 Determinação da concentração de glicogênio em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

O conteúdo de glicogênio presente nos corpos gordurosos de fêmeas foi determinado através do método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Os resultados foram expressos em mg de glicose. g⁻¹ de tecido, peso fresco (PINHEIRO; GOMES, 1994). De acordo com a metodologia, 1 g de tecido foi homogeneizado em solução contendo 10% de ácido tricloroacético (TCA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.935xg por 5 minutos para a coleta dos sobrenadantes. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro, o filtrado foi aquecido a 45 °C por 15 minutos e ao filtrado foi adicionado etanol absoluto gelado na proporção de 2 mL de etanol:1mL de filtrado. A mistura foi centrifugada a 17.300xg por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado (*pellet*) foi ressuscitado em 10 mL de água destilada e mantido a -20° C até sua utilização. A 1 mL do ressuscitado foi adicionado 1 mL de HCl 1 M em tubos com tampa de rosca de baquelite e os tubos mantidos em banho-maria fervente por 30 minutos. O hidrolisado ácido foi alcalinizado pela adição de NaOH 3 M. À uma alíquota de 1 mL do hidrolisado alcalino foi adicionado 1 mL de reagente ácido 3,5 DNS e a mistura aquecida por 5 minutos em banho-maria fervente. Posteriormente, o tubo teve seu volume completado a 15 mL com água destilada e a absorbância lida em espectrofotômetro em 535nm.

3.8.1.2 Determinação da concentração de glicose e proteínas totais e das atividades enzimáticas de ALT, AST e LDH em hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Para a análise dos parâmetros concentração de glicose e proteínas totais, atividade enzimática de ALT, AST e LDH, foi utilizado o analisador bioquímico automatizado A15 (Biosystems®), realizando-se uma diluição da amostra matriz centrifugada, sem células, na proporção de 1:1 com água Milli-Q.

Na determinação de glicose, 3 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente de cor (fosfato 100 mmol.L⁻¹, fenol 5 mmol.L⁻¹, glicose oxidase 10 U.mL⁻¹, peroxidase 1 U.mL⁻¹, 4-aminoantipirina 0.4 mmol.L⁻¹, pH 7,5), e o produto da reação de oxidação 4-aminoantipirina foi mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 510 nm (TRINDER, 1969). Os resultados foram expressos em mg.dL⁻¹.

Para a determinação da concentração de proteínas totais, 4 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente de cor (acetato de cobre 6 mmol.L⁻¹, iodeto de potássio 12 mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 1,15 mol.L⁻¹). O padrão usado foi albumina sérica bovina, na concentração de 50 g.L⁻¹. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm, e os resultados expressos em g.L⁻¹ (GORNALL et al., 1949).

Para a avaliação da atividade enzimática de ALT, 25 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente (Tris 150 mmol.L⁻¹, L-alanina 750 mmol.L⁻¹, desidrogenase láctica > 1350 U.L⁻¹, pH 7,3, NADH 1,3 mmol.L⁻¹, 2-oxoglutarato 75 mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 148 mmol.L⁻¹, azida sódica 9.5 g.L⁻¹). O produto formado foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nm, expressos em U.L⁻¹ (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; APPROVED RECOMMENDATION, 1985; GELLA et al., 1985).

Para a avaliação da atividade enzimática da AST, 25 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente (Tris 121 mmol.L⁻¹, L-aspartato 362 mmol.L⁻¹, desidrogenase málica > 460 U.L⁻¹, desidrogenase láctica > 660 U.L⁻¹, pH 7,8, NADH 1.3 mmol.L⁻¹, 2-oxoglutarato 75 mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 255 mmol.L⁻¹, azida sódica 9.5 g.L⁻¹). Os resultados, expressos em U.L⁻¹, foram lidos em espectrofotômetro a 340 nm (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; APPROVED RECOMMENDATION, 1985; GELLA et al., 1985).

Para a determinação da atividade da LDH, 6 µL de amostra diluída foram adicionados a 300 µL de reagente (Tris 100 mmol.L⁻¹, ácido pirúvico 2,75 mmol.L⁻¹, cloreto de sódio 222 mmol.L⁻¹, pH 7,2, NADH 1,55 mmol.L⁻¹, azida sódica 9,5 g.L⁻¹). As leituras foram feitas em 340 nm e os resultados expressos em U.L⁻¹ (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1989; SCIENTIFIC COMMITTEE RECOMMENDATIONS, 1982).

3.8.1.3 Avaliação das enzimas de detoxificação no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e macerados de ovos e larvas

Foram avaliadas as atividades enzimáticas das carboxilesterases (α -esterase e β -esterase), monooxigenases do citocromo-P450 (MFO) e glutationa-S-transferase (GST) em ovos e larvas de *R. microplus* provenientes de fêmeas expostas ao produto em teste de imersão com 1 minuto de duração em cepas sensível (cepa Porto Alegre) e resistente (cepa Jaguar) ao fluazuron.

Para a avaliação destas atividades enzimáticas, o protocolo utilizado seguiu o documento técnico do Ministério da Saúde elaborado pela Fundação Oswaldo Cruz (2006) cuja Metodologia para a quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* foi adaptada de Hemingway (1998).

Para o preparo das amostras, procedeu-se da seguinte forma:

Homogenatos de 50 mg de ovos do quinto dia de postura de um grupo de fêmeas, foram macerados em microtubo contendo 300 µL de água destilada. Em seguida, retirou-se três alíquotas de cada amostra (para a realização das réplicas das leituras) para a avaliação da monooxigenase. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 1 minuto para a realização das demais avaliações enzimáticas.

Foi utilizado um *pool* de larvas, alíquotadas e congeladas com idade entre 14 e 16 dias, maceradas em microtubo contendo 300 µL de água destilada. Logo depois, retirou-se três alíquotas de cada grupo (para a realização das réplicas das leituras) para a avaliação da monooxigenase. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 1 minuto para a realização das demais avaliações enzimáticas. Para as leituras destes ensaios bioquímicos, foi utilizado um leitor de microplacas EZ Read 2000. Para todas as avaliações enzimáticas realizou-se o experimento em triplicata e para cada amostra, realizou-se três leituras (tréplicas).

Para o ensaio enzimático da monooxigenase, em cada microplaca foi colocado 20 µL de homogenato (antes da centrifugação), 60 µL de tampão fosfato de potássio 90 mM pH 7,2, 200 µL de uma solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBZ) dissolvida em metanol e tampão de acetato de sódio 250 mM pH 5,0 e 25 µL de peróxido de hidrogênio 3 %. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 h e a absorbância foi lida em 450 nm. Os valores foram comparados com uma curva-padrão de citocromo C purificado. Os resultados foram reportados em unidades equivalentes de citocromo P450. mg⁻¹ de proteína.

As atividades enzimáticas das esterases foram determinadas através da adição dos substratos α e β -naftil. Em cada microplaca foram adicionados 20 µL do sobrenadante do homogenato (tanto para o α quanto para o β -esterase), em 250 µL de solução de acetato de α/β -

naftil dissolvidos em 24,75 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2. A reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 50 µL de solução de Fast Blue B (0,045 g de Fast Blue B em 4,5 mL de água destilada adicionada a uma solução de 15mL de SDS 5%). Novamente a reação foi incubada a temperatura ambiente, por mais 5 minutos para depois, proceder a adição de 200 µL de α/β -naftil acetato/fosfato de sódio e mais 50 µL de Fast blue. As leituras de absorvância foram feitas em 570 nm. Os resultados foram comparados com uma curva-padrão com concentrações conhecidas de α/β -naftol e expressos em mmol de produto formado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade enzimática da GST foi mensurada utilizando 10 µL do sobrenadante do homogenato adicionados de 200 µL de glutathiona e solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (10 mM pH 6,5 e 3 mM CDNB dissolvido em metanol). As leituras da cinética enzimática aconteceram em 5, 10, 15 e 20 minutos a 340 nm. Os resultados foram expressos em $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Para a padronização dos resultados das atividades das enzimas de detoxificação, foi feita a concentração de proteínas totais. Foram adicionados 10 µL de amostra em 300 µL do reagente Bio-Rad para quantificação de proteínas (1:4 diluído em H₂O) e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. As leituras foram feitas em 570 nm. A absorvância foi convertida em concentração de proteínas usando uma curva padrão de albumina sérica bovina.

3.8.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a avaliação das diferentes classes de lipídios neutros, realizou-se a técnica semi-quantitativa de CCD.

O conteúdo proteico do corpo gorduroso e dos ovos foi determinado pelo método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978), utilizando albumina sérica bovina como padrão (Anexo 2) estabelecendo 1.000 µg de proteínas para a extração de lipídios neutros. As cutículas foram padronizadas por peso de macerado de cutículas (66mg de macerado).

Os lipídios neutros associados aos ovos, corpo gorduroso e cutícula foram então extraídos utilizando-se clorofórmio: metanol: água (1: 2: 0,8) (v/v) de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959). Os lipídios foram analisados por CCD unidimensional em placas de sílica. Os lipídios neutros foram separados após a corrida das placas de sílica gel em mistura de hexano: éter etílico: ácido acético (60:40:1, v/v) (KAWOOWA; LAW, 1988). Após a evaporação dos solventes, as placas de cromatografia foram mergulhadas em solução de Cherring (sulfato de cobre 10% (p/v) e ácido fosfórico 8% (v/v)) e queimadas em forno Pasteur a 170 °C por 5-10 min (RUIZ; OCHOA, 1997). As imagens foram submetidas à densitometria através do programa Image Master Total Lab versão 1.11 (GE Healthcare® - Brazil Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil). As classes de lipídios neutros analisadas foram triacilglicerol, ácidos graxos, colesterol livre e colesterol esterificado.

3.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras de hemolinfa contendo o coquetel inibidor de proteases foram desproteinizadas segundo o método de Nelson (Anexo 3) para a determinação dos ácidos orgânicos (pirúvico, oxálico e láctico).

Para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes na hemolinfa, foram utilizados padrões de ácido oxálico, pirúvico e láctico (Sigma AldrichSteinheim, Alemanha).

Foram utilizados na cromatografia acetonitrila, fosfato de sódio desidrogenado e ácido fosfórico. Utilizou-se água ultrapura (Sistema de purificação de água Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA). Estoque de solução padrão foi diluído em fase móvel e o tampão de fosfato foi ajustado para pH 2.2 com ácido fosfórico e estocados a 4° C.

Todos os experimentos com CLAE foram conduzidos usando um sistema Shimadzu LC-20AT, equipado com um fotodetector (PDA; SPD-M20A, Shimadzu, Japão) acoplado a um software LC Solution ChemStation. Para a separação, usou-se uma coluna de fase reversa C18 (150 × 4.5 mm I.D., 5 µm, Allure® OrganicAcids, Restek) sob condições isocráticas. A fase móvel consistia em 1% de acetonitrila em 20 mol/L de solução aquosa de NaH₂PO₄, ajustando pH para 2,2 usando H₃PO₄. A velocidade de fluxo foi de 0.8 mL.min⁻¹ a 36° C. Os cromatogramas foram monitorados a 210 nm e o volume de injeção foi 20 µL. Para identificar os ácidos orgânicos presentes nas amostras, o tempo de retenção das soluções contendo as amostras foram comparados às soluções padrões puras. A quantificação foi realizada com base nos *plots* de calibração da área dos picos pela concentração. Uma curva de calibração foi calculada com cinco pontos de concentração das soluções padrão. O método foi o mesmo descrito por Tunholi-Alves et al. (2014).

3.9 Análises Estatísticas

Os resultados referentes aos parâmetros biológicos: peso das fêmeas ingurgitadas (teleógina), peso das quenóginas, período de postura, ácidos orgânicos, parâmetros bioquímicos em ovos (ALT, AST e proteínas totais) e enzimas de detoxificação em ovos e larvas foram expressos como média ± desvio-padrão e o teste de ANOVA foi seguido pelo teste de Tukey para a comparação das médias considerando o nível de significância de 5%.

Os demais resultados obtidos que apresentaram distribuição não-normal no estudo foram expressos em média ± erro-padrão. O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados na comparação das médias ao nível de significância de 5%.

Todos os testes bioquímicos e cromatográficos foram realizados em triplicata. Os cálculos foram realizados através do programa estatístico InStat e os gráficos elaborados no programa GraphPad (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism, Inc.).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Macromorfologia das Fêmeas Ingurgitadas

Foi possível notar diferenças entre os grupos controle e exposto quanto a morfologia das fêmeas ingurgitadas coletadas após o período de alimentação, principalmente no oitavo e décimo quinto dia experimentais. As fêmeas ingurgitadas oriundas de bovinos expostos ao fluazuron apresentaram alterações de tamanho (tamanho menor), maior fragilidade da cutícula à perfuração para a coleta de hemolinfa e perda das estrias longitudinais e da conformação corpórea característica (Figura 6). Foi observada também maior opacidade da superfície dorsal e perda do brilho característico. As alterações morfológicas foram atribuídas ao efeito da inibição da síntese da quitina nas fêmeas ingurgitadas, com consequente muda ineficiente, resultando em alterações morfológicas. Estudos prévios já relataram alterações ultraestruturais, citológicas e histoquímicas em carrapatos *R. sanguineus* após a ingestão de sangue contendo o fluazuron. Melo (2007) relatou alterações macromorfológicas semelhantes às observadas no grupo exposto deste estudo, em *R. sanguineus* após exposição ao fluazuron e Da Glória (1988) também observou tais alterações em *R. microplus*. A ausência de sulcos dorsais e ventrais do grupo fluazuron pode ter sido devido a má formação das apódemas, que são invaginações da cutícula, e servem de pilares de sustentação para inserção dos músculos. A presença de uma musculatura sem sustentação pode dificultar todo um processo de movimentação durante a postura das fêmeas ingurgitadas (MELO, 2007).

Alterações como desorganização cuticular com ausência de subdivisões, além de danos às células tegumentares e epiteliais e às células intestinais foram associadas a problemas na absorção, digestão e distribuição e síntese de proteínas estruturais, prejudicando a ecdise eficiente (OLIVEIRA et al., 2012; CALLIGARIS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014) em *R. sanguineus*.

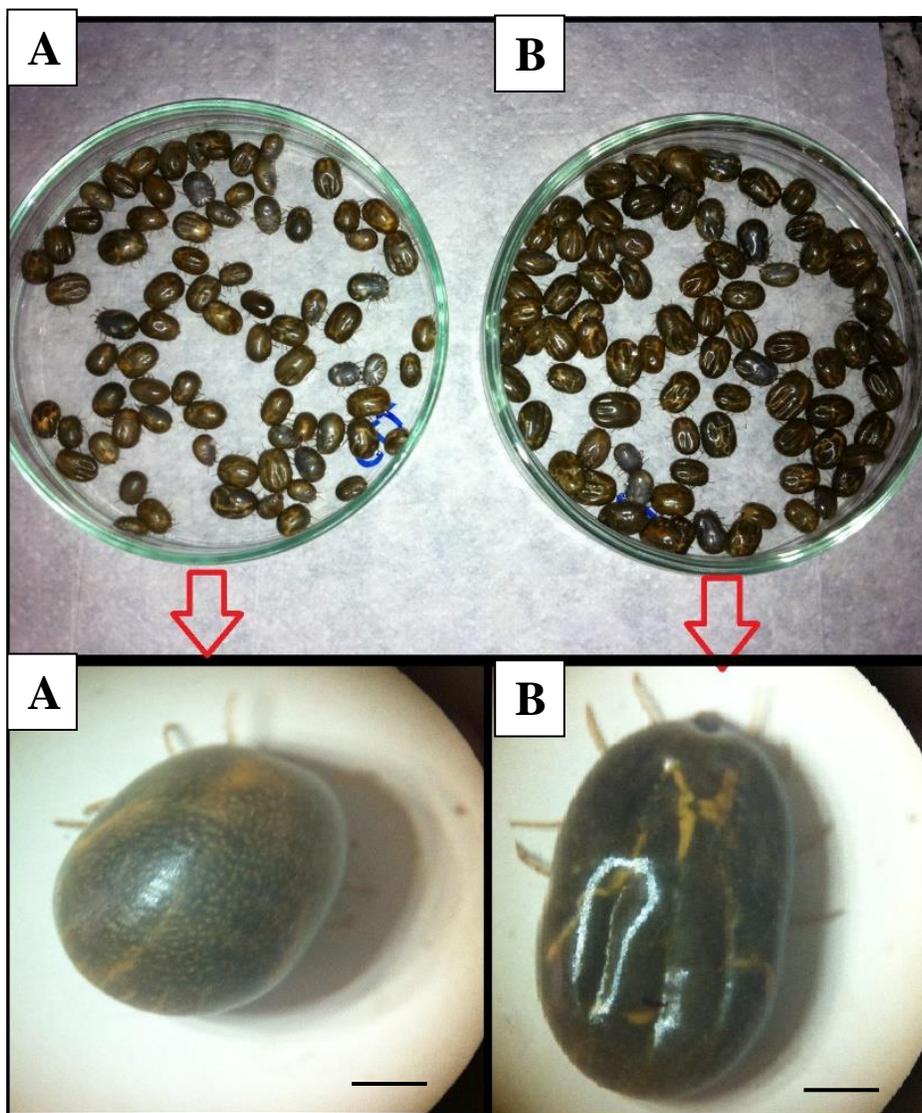


Figura 6. Comparação entre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* do grupo (A) expostas ao fluazuron e (B) fêmeas ingurgitadas do grupo controle observadas em microscópio estereoscópico coletadas do chão das baias no oitavo dia de coleta após o tratamento dos bezerros. Notar a diferença no formato, tamanho e aspecto da superfície dorsal das fêmeas. Barra de escala representa 0,2 cm.

4.2 Parâmetros Biológicos de Fêmeas Ingurgitadas

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao peso inicial das fêmeas ingurgitadas no dia 0 (controle, $286,08 \pm 47,77$ mg) (exposto, $261,21 \pm 39,23$ mg) ($p > 0,05$). As alterações observadas nos parâmetros biológicos foram após o tratamento dos bezerros com o fluazuron.

O fluazuron causou redução significativa ($p < 0,05$) no peso das fêmeas ingurgitadas em todos os dias, havendo um notável decréscimo no peso médio das fêmeas a medida que progredia o tempo de avaliação (Figura 7). No 15º dia, a média de peso das fêmeas ingurgitadas do grupo exposto apresentou o resultado mais baixo dentre todos os dias experimentais avaliados (exposto, $131,03 \pm 50,28$ mg). Tais achados corroboram o efeito do produto sobre o parâmetro biológico em questão, já havendo diferença significativa entre controle e tratado desde o quarto dia (controle, $274,97 \pm 27,17$ mg) (exposto, $207,56 \pm 31,10$ mg). Desse modo, o peso médio esperado para uma fêmea ingurgitada não foi alcançado pelas fêmeas do grupo exposto ao fluazuron em nenhum dia avaliado após o tratamento. Segundo Oliveira et al. (2014), os danos causados às células intestinais levam a uma absorção ineficiente dos nutrientes. Oliveira et al. (2012) relataram os efeitos sobre a formação das estruturas quitinosas responsáveis pela alimentação do carrapato. A diminuição do hipostômio e das quelíceras compromete a ingestão de sangue pelo carrapato, levando a um menor ganho de peso. Quelíceras e hipostômio mal desenvolvidos impedem que o carrapato ingira o sangue diretamente dos vasos sanguíneos do hospedeiro, limitando sua alimentação apenas ao líquido intersticial subcutâneo, tal como se observa na alimentação nos estágios mais jovens do carrapato (larva e ninfa em estágio inicial de alimentação) (TATCHELL, 1972).

É possível ainda observar que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle dos dias 4 (controle, $274,97 \pm 27,17$ mg) e 8 (controle, $222,61 \pm 34,08$ mg) e 4 e 15 (controle, $220,32 \pm 40,15$ mg). Este resultado foi atribuído possivelmente às sucessivas infestações artificiais realizadas antes do tratamento, o que levou a um aumento na competição intraespecífica dos carrapatos sobre o hospedeiro ao longo do tempo. Tal fenômeno já foi relatado por Santos e Furlong (2002) no qual ele descreve que o aumento do número de larvas aumenta o grau de competição entre elas, o que prejudica o ganho de peso das fêmeas. À medida que progrediam os dias de avaliação, mais fêmeas estariam competindo pelos melhores locais sobre o hospedeiro para se alimentarem e fixarem-se, o que levou a uma redução no peso médio das fêmeas ingurgitadas ao longo dos dias no grupo controle. Contudo, como já ressaltado anteriormente, ainda assim foi possível observar diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratado mesmo nos dias em que se observou menor ganho de peso da fêmea no grupo controle.

Embora tenha sido observada diferença no peso médio das fêmeas ingurgitadas após o tratamento, o mesmo efeito da exposição ao fluazuron não foi observado na avaliação do peso das quenóginas, no qual se observou diminuição significativa apenas na comparação entre o grupo controle do dia 4 ($113,18 \pm 49,12$ mg) e os demais dias: 8 e 15, tanto no grupo controle quanto exposto. O grupo controle do dia 4 apresentou peso médio maior para as quenóginas que nos outros dias experimentais em ambos os grupos. Contudo, não houve diferença significativa entre o grupo controle do dia 4 com os grupos controle ($81,66 \pm 24,51$ mg) e exposto ($90,58 \pm 53,15$ mg) no dia 0 ($p > 0,05$). Logo, a diferença significativa observada, não foi relacionada a efeito da exposição ao fluazuron (Figura 7).

Embora as fêmeas tenham iniciado a postura dos ovos a partir de médias de peso diferentes, elas alcançaram resultados semelhantes ao final do período de postura, no parâmetro

peso da quenógina, independentemente de seu *status* nutricional prejudicado pela alimentação ineficiente no grupo exposto. Tal fenômeno pode ser justificado por efeito do esgotamento das reservas metabólicas para a produção de ovos que ocorrerá de modo semelhante nas fêmeas independentemente do tratamento com o fluazuron, com exceção apenas do dia 4 no qual houve maior diferença entre as médias dos pesos das fêmeas ingurgitadas dos grupos controle e exposto antes da postura, refletindo numa diferença significativa após a postura, no peso das quenóginas.

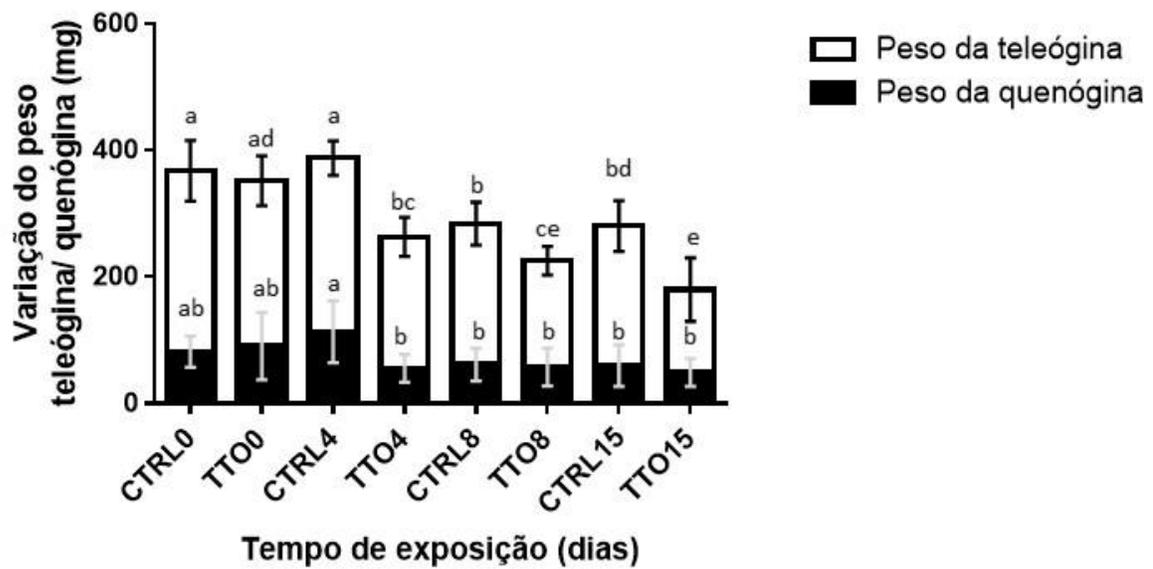


Figura 7. Variação do peso da fêmea ingurgitada (teleóquina) (mg) (barras brancas) em relação ao peso da quenóquina (barras pretas) em função do tempo de exposição ao fluazuron. CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). Média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Com relação ao período de postura, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos controle no dia 8 ($15,61 \pm 3,90$ dias) e exposto dia 8 ($9,55 \pm 3,39$ dias), tendo havido redução do período em função do tratamento. Tal fato não foi observado por Melo (2007) para *R. sanguineus*.

Para o parâmetro peso da postura, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e exposto na mesma data após o tratamento, no controle dia 8 ($111,61 \pm 10,09$ mg) e exposto dia 8 ($20,53 \pm 6,03$ mg). Também se observou diferença significativa na comparação dos grupos expostos entre si para alguns dias (Tabela 1). Tais resultados podem ser associados ao efeito da exposição ao fluazuron, principalmente ao se verificar diferença significativa no grupo exposto quando comparadas as médias pré e pós-tratamento. Na tomada de tempo 0 não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos controle ($161,35 \pm 8,25$ mg) e exposto ($139,91 \pm 10,01$ mg).

Sendo o peso da postura diretamente relacionado ao peso da fêmea ingurgitada ao final do repasto sanguíneo (WILLADSEN et al., 1984), um déficit na alimentação das fêmeas em função da síntese de quitina, pode levar a um menor peso da fêmea ingurgitada, que pode ser então, associado a uma menor média no peso da postura, notada principalmente no grupo exposto do dia 8.

Bennett (1974) determinou a equação do índice de produção de ovos a partir dos valores de peso da teleógina e peso da postura, conforme a fórmula em anexo 1. Tal parâmetro reflete a capacidade da fêmea ingurgitada converter o sangue ingerido em ovos produzidos e seus resultados são expressos em porcentagem.

Na análise do índice de produção de ovos, na comparação dentro do mesmo dia de avaliação, a diferença significativa ocorreu somente entre os grupos controle e exposto no oitavo dia (controle dia 8: $49,83 \pm 3,68\%$ e exposto dia 8: $12,63 \pm 3,9\%$) ($p < 0,05$). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos controle ($55,82 \pm 2,06\%$) e exposto ($53,12 \pm 2,83\%$) no dia 0.

Com base nas alterações observadas anteriormente em relação ao ganho de peso da fêmea e a produção dos ovos, era de se esperar que um índice que levasse em conta esses dados, consequentemente seria afetado por estas variáveis após o cálculo da equação. Assim, tendo sido relatado maior efeito no peso da postura nas fêmeas obtidas no oitavo dia pós-tratamento, o índice de produção de ovos apresentou maior queda nesta data na comparação controle *versus* tratado. Tal como nos parâmetros analisados anteriormente, os resultados obtidos nesta pesquisa nos grupos controle, muito se assemelham aos resultados de outros pesquisadores como Bittencourt (1990) e Da Glória et al. (1993), que observaram índice médio de produção de ovos de 58,5% e 78,7%, respectivamente.

Com relação ao índice de eficiência reprodutiva foi constatada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o grupo exposto dia 8 ($0,056 \pm 0,056\%$) em relação ao grupo controle do dia 8 ($42,12 \pm 5,63\%$) e alguns grupos dos outros dias experimentais: controle 0 ($42,96 \pm 5,37\%$), controle 15 ($43,55 \pm 4,55\%$), exposto 0 ($43,36 \pm 4,49\%$) e exposto 4 ($30,13 \pm 3,49\%$). Tal resultado se deve ao fato da média de peso do grupo exposto dia 8 ter apresentado o menor valor dentre todos os dias experimentais avaliados, podendo ser atribuído ao maior efeito do produto para este parâmetro nesta data.

Tabela 1. Comparação dos parâmetros biológicos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* dos grupos controle e exposto durante diferentes períodos de exposição ao fluazuron.

Grupos experimentais em diferentes períodos de exposição (dias)	Parâmetros biológicos											
	Período de postura (dias)*		Peso da postura (mg)**		Índice de produção de ovos (%)**		Índice de eficiência reprodutiva (%)**		Eclosão(%)**		Índice nutricional (%)**	
Controle zero	16,40 ± 4,45 ^a	n=15	161,35 ± 8,25 ^a	n=14	55,82 ± 2,06 ^a	n=14	42,96 ± 5,37 ^a	n=15	85,23 ± 5,13 ^a	n=13	71,33 ± 5,15 ^a	n=15
	(3 - 22)		(110 - 210)		(32,35 - 64,09)		(0,0 - 60,8)		(30,0 - 99,0)		(6,14 - 88,33)	
Exposto zero	15,40 ± 4,85 ^{a,b}	n=15	139,91 ± 10,01 ^{a,b}	n=14	53,12 ± 2,83 ^{a,d}	n=14	43,36 ± 4,49 ^a	n=15	80,2 ± 6,63 ^a	n=15	73,28 ± 5,49 ^{a,b}	n=15
	(1 - 21)		(72,9 - 209,6)		(27,76 - 62,85)		(0,0 - 59,7)		(0,0 - 99,0)		(0,0 - 87,15)	
Controle 4	11,92 ± 3,93 ^{a,b}	n=14	92,63 ± 10,32 ^{b,d}	n=15	34,08 ± 3,64 ^{b,c}	n=15	25,04 ± 3,95 ^{a,b}	n=15	68,13 ± 9,58 ^a	n=15	56,07 ± 5,29 ^{a,c}	n=15
	(5 - 16)		(0 - 115)		(0 - 54,2)		(0,0 - 45,18)		(0,0 - 99,0)		(0,0 - 81,54)	
Exposto 4	14,26 ± 3,47 ^{a,b}	n=15	102,56 ± 7,8 ^b	n=15	49,13 ± 3,35 ^{a,b}	n=15	30,13 ± 3,49 ^a	n=15	57,33 ± 6,15 ^{a,b}	n=15	66,52 ± 4,24 ^{a,d}	n=15
	(6 - 20)		(12,5 - 139,1)		(7 - 60,8)		(0,0 - 50,0)		(0,0 - 90,0)		(11,44 - 81,23)	
Controle 8	15,61 ± 3,90 ^a	n=13	111,61 ± 10,09 ^{a,b,c}	n=13	49,83 ± 3,68 ^{a,b}	n=13	42,12 ± 5,63 ^a	n=13	77,07 ± 9,21 ^a	n=13	68,01 ± 3,5 ^a	n=13
	(4 - 19)		(28 - 167,1)		(13,73 - 62,6)		(0,0 - 59,5)		(0,0 - 100,0)		(37,04 - 83,37)	
Exposto 8	9,55 ± 3,39 ^b	n=9	20,53 ± 6,03 ^d	n=15	12,63 ± 3,9 ^c	n=15	0,056 ± 0,056 ^b	n=15	0,33 ± 0,33 ^b	n=15	28,94 ± 6,55 ^{c,d}	n=10
	(1 - 13)		(0 - 75)		(0 - 50,9)		(0,0 - 0,84)		(0,0 - 5,0)		(0,0 - 67,75)	
Controle 15	13,93 ± 3,77 ^{a,b}	n=15	114,10 ± 10,56 ^{a,b,c}	n=15	51,31 ± 3,66 ^{a,d}	n=15	43,55 ± 4,55 ^a	n=15	79,13 ± 6,64 ^a	n=15	69,52 ± 2,7 ^a	n=15
	(2 - 18)		(14,2 - 169,7)		(6,9 - 65,3)		(0,69 - 62,7)		(10,0 - 100,0)		(44,24 - 81,42)	
Exposto 15	11,66 ± 3,87 ^{a,b}	n=9	50,48 ± 13,68 ^{c,d}	n=9	33,36 ± 6,75 ^{b,c,d}	n=9	24,26 ± 7,63 ^{a,b}	n=9	50,44 ± 14,54 ^{a,b}	n=9	55,73 ± 8,57 ^{a,b,c,d}	n=8
	(4 - 15)		(2,9 - 103,8)		(2,3 - 55,1)		(0,0 - 50,6)		(0,0 - 99,0)		(21,01 - 78,88)	

Média ± desvio padrão(*) ou erro padrão (**) seguidos por letras iguais não diferiram significativamente entre si pelos testes de Tukey (*) ou teste de Dunn (**). Entre parênteses os valores mínimo e máximo para cada parâmetro analisado. O número de fêmeas (n) usadas nos testes.

Borges et al. (2001) relataram que o peso da teleógina está diretamente relacionado ao peso da postura e que as fêmeas mais leves, tendem a apresentar índices mais baixos de eficiência reprodutiva. Como neste estudo, foram observadas médias de peso bem inferiores no grupo exposto em comparação ao grupo controle principalmente no oitavo dia pós-tratamento, logo o índice de eficiência reprodutiva apresentou resultado mais baixo onde o peso da fêmea apresentou menor média em função do tratamento. Melo (2007) observou menor índice de eficiência reprodutiva em fêmeas de *R. sanguineus* expostas ao fluazuron (média de 8,20%).

Na avaliação da eclodibilidade, a média mais baixa no grupo exposto aconteceu no dia 8 ($0,33 \pm 0,33\%$), tendo havido diferença entre este grupo e o controle de todos os dias experimentais incluindo o grupo exposto no tempo 0, antes do tratamento ($80,2 \pm 6,63\%$). Atribuiu-se o maior efeito do tratamento a este parâmetro no dia 8. Tal achado foi confirmado pela presença de ovos inviáveis (ovos de tamanho menores, de aspecto mais ressecado e escurecidos) em maior quantidade nesse dia experimental no grupo exposto. Graf (2003) já havia relatado os efeitos das benzoilfenilurêias com relação a uma atividade ovicida, através da inibição da deposição de quitina na larva em desenvolvimento ainda dentro do ovo, atribuindo mais esta característica a eficácia deste princípio-ativo. Segundo ainda o mesmo autor, à medida que o fluazuron prejudica a ingestão de sangue do hospedeiro pelo carrapato, os ovos produzidos pelas fêmeas ingurgitadas não terão viabilidade devido a um mau desenvolvimento embrionário. Cruz et al. (2014) também observaram diferença significativa no percentual de eclosão das larvas de *R. microplus* ao ser usada uma formulação pour-on contendo fluazuron. De acordo ainda com Graf (1993), o efeito transovariano do fluazuron pode levar a postura de ovos contendo larvas incapazes de eclodirem, o que justifica o baixo percentual de eclosão que interfere no índice em questão.

O parâmetro índice nutricional apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) ao serem comparados os grupos exposto dia 8 ($28,94 \pm 6,55\%$) com os grupos controle do mesmo dia ($68,01 \pm 3,5\%$), controle do dia 0 ($71,33 \pm 5,15\%$), exposto dia 0 ($73,28 \pm 5,49\%$) e controle dia 15 ($69,52 \pm 2,7\%$), demonstrando haver maior efeito do fluazuron para o parâmetro avaliado nas fêmeas que ficaram 8 dias expostas ao produto. Levando-se em consideração que o cálculo do índice nutricional se baseia na conversão do peso da fêmea ingurgitada em postura, o menor índice nutricional reflete o fato de que a exposição ao fluazuron possivelmente gerou um estresse metabólico na fêmea que a fez mobilizar suas reservas energéticas para outros processos fisiológicos, e não a postura.

Considerando o período médio de 18 a 22 dias da fase parasitária do ciclo de vida dos carrapatos *R. microplus*, desde a fixação da larva sobre o hospedeiro até o momento em que cessa a alimentação na fase adulta (FURLONG; SALES, 2007), o fato do tratamento com o produto ter sido eficaz para as fases diferentes do desenvolvimento do carrapato sobre o animal, nos traz argumentos que justifiquem os resultados tão heterogêneos observados nos diferentes dias avaliados.

Tal fenômeno pode ser explicado pelo fato de que com apenas 4 dias de exposição, o efeito esperado pelo tratamento é menor em função do pouco tempo de alimentação da fêmea com sangue contendo o princípio-ativo. Segundo Souza (2009), em experimento semelhante com o novaluron, um análogo ao fluazuron, também na dose de $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, o pico de concentração (C_{max}) para o fluazuron no plasma bovino foi de 378 ng.mL^{-1} para um tempo (T_{max}) de 4 dias. Permanecendo uma área sobre a curva de concentração plasmática (ASC) $> 100 \text{ ng}$ por 28 dias. Com isso, os carrapatos que se alimentaram apenas até o quarto dia pós-tratamento, e se desprenderam do hospedeiro no início do dia (6h30min da manhã, horário em que eram coletadas

as fêmeas das baias) não absorveram tanto do princípio-ativo quanto os que se mantiveram no animal após esse dia, ingerindo o sangue contendo alta concentração do fluazuron. Embora o fluazuron seja detectável no plasma após 16 horas de administração tópica do produto na dose de $1,5 \text{ mg. kg}^{-1}$, os níveis plasmáticos parecem alcançar uma média constante mais alta apenas entre 9 e 35 dias após o tratamento (WHO, 1997).

Com oito dias de alimentação sobre o hospedeiro, as fêmeas já teriam se alimentado de um volume de sangue considerável contendo o princípio-ativo. Nessa fase, a fêmea estaria passando do estágio larval para a fase ninfal em seu desenvolvimento, um período crítico para a muda e ingurgitamento, uma fase totalmente dependente da síntese de quitina e reformulação da cutícula em crescente expansão. Ao considerarmos este período crítico para o desenvolvimento das fêmeas é de se esperar que observemos maiores efeitos do fluazuron com 8 dias que com apenas 4 dias de alimentação. No momento seguinte de avaliação (15 dias pós-tratamento), o número de fêmeas recuperadas diminuiu consideravelmente, embora este estudo não tenha levado em consideração a contagem do número de fêmeas coletado após o tratamento, indicando uma alta mortalidade de fêmeas ingurgitadas. Porém, as que sobreviveram apresentaram uma atenuação dos efeitos nos parâmetros biológicos, o que nos leva a pensar no possível desenvolvimento de estratégias de resistência por parte dessa fêmea ingurgitada para ter suportado desde seu estágio larval até a fase adulta a exposição ao fluazuron. Com oito dias de alimentação, a sobrevivência das fêmeas ingurgitadas ainda que seja alta, vem acompanhada de muitas alterações em parâmetros biológicos que refletem um efeito a longo prazo da população de carrapatos.

4.3 Metabolismo de Carboidratos nas Fêmeas Ingurgitadas

No estudo do metabolismo de carboidratos foram analisados os seguintes parâmetros: concentração de glicose hemolinfática, concentração de glicogênio no corpo gorduroso, atividade de LDH na hemolinfa e concentração de ácidos orgânicos na hemolinfa (Figuras 8 e 9).

Embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos controle e exposto dentro do mesmo dia experimental, notou-se que à medida que o tempo de exposição progride, houve uma inversão na concentração de glicose na hemolinfa do grupo exposto, aumentando nos demais períodos quando comparada com o grupo controle, chegando ao valor mais alto no dia 8, que diferiu significativamente do controle do dia 15 (Figura 8A).

Na avaliação da concentração de glicogênio no corpo gorduroso, no dia 15, o grupo exposto ($12,06 \pm 0,04 \text{ mg glicose/g de tecido, peso fresco}$) diferiu significativamente dos grupos exposto dia 0 ($0,21 \pm 0,01 \text{ mg glicose. g}^{-1} \text{ de tecido, peso fresco}$) ($p < 0,05$) e exposto dia 8 ($0,243 \pm 0,02 \text{ mg glicose. g}^{-1} \text{ de tecido, peso fresco}$) ($p < 0,05$) quando comparados pelo teste não-paramétrico de Dunn. Não houve diferença significativa entre as médias dos controles em nenhum dos dias experimentais, nem mesmo no dia 15, quando o controle também apresentou uma média mais elevada que nos dias anteriores ($10,90 \pm 0,08 \text{ mg glicose. g}^{-1} \text{ de tecido, peso fresco}$) ($p > 0,05$) (Figura 8B).

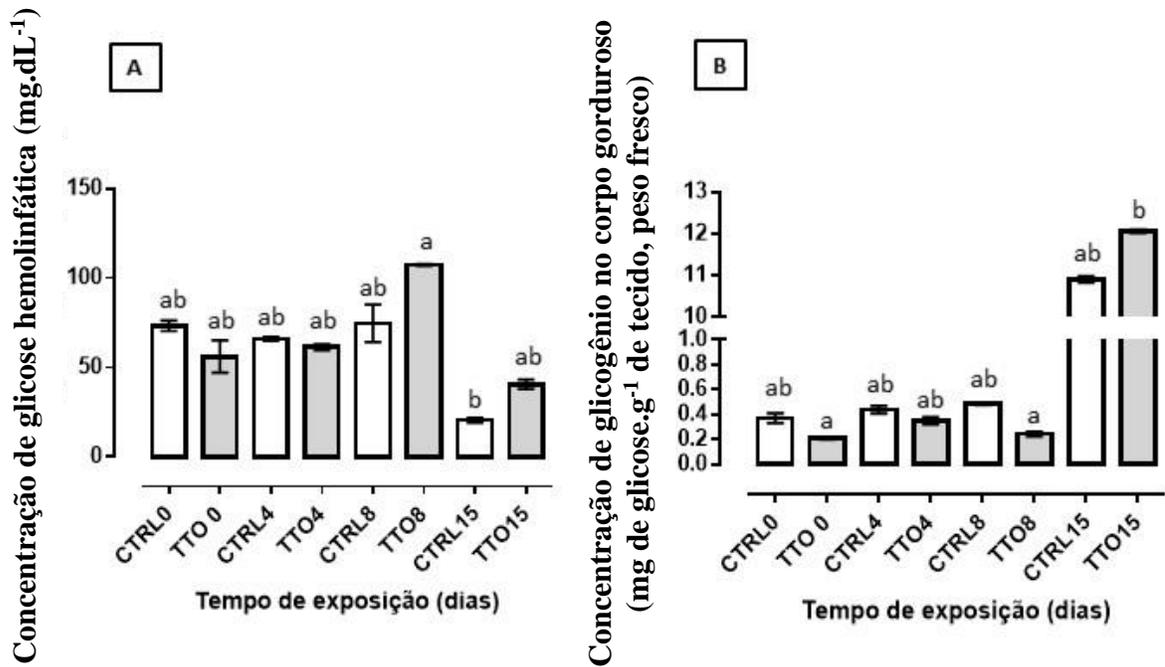


Figura 8. Alterações no conteúdo de carboidratos em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em diferentes dias experimentais após a exposição ao fluazuron. (A) Concentração de glicose na hemolinfa (mg.dL⁻¹) e (B) glicôgeno (mg de glicose. g⁻¹ de tecido, peso fresco) no corpo gorduroso. CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). Média \pm erro padrão da média acompanhadas por letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o teste de Dunn ($p > 0,05$).

A glicose é o carboidrato mais abundante presente na hemolinfa de carrapatos adultos em *Dermacentor andersonii* (LEVENBOOK et al., 1980). O desenvolvimento embrionário de *R. microplus* depende muito da glicose maternal para completar a maturação dos ovos (MORAES et al., 2007; GUIZZO et al., 2012). Para dar suporte a vários processos biossintéticos, a demanda por glicose geralmente cresce drasticamente durante o período de 24 horas após a alimentação, tal como o período de pré-postura (TATCHELL; SCHUNTNER, 1972). Estudos prévios que tentaram elucidar o exato mecanismo de ação das benzoilfeniluréias, trouxeram à tona especulações que relacionam o envolvimento desses princípios-ativos em eventos relacionados à síntese de quitina (COHEN, 2001), incluindo, uma possível inibição da conversão da glicose em frutose-6-fosfato, no começo da síntese de quitina (PALLI; RETNAKARAN, 1999). Contudo, se estes compostos também produzem potenciais consequências em outras vias metabólicas envolvendo a glicose em carrapatos (tal como potenciais mecanismos de ação baseados no metabolismo energético), tais eventos ainda não foram confirmados. Os resultados do presente estudo sugerem que devido ao papel essencial da glicose em vias catabólicas, na composição nutricional dos ovos e na biossíntese de quitina, um bloqueio prévio da quitina sintase causado pelo fluazuron durante a biossíntese de quitina, inibe a utilização de glicose para esta via, causando um distúrbio na homeostase de glicose. Tal efeito pode ser demonstrado pelo aumento na concentração de glicose na hemolinfa das fêmeas ingurgitadas, o que reflete um aumento no estoque de glicogênio no corpo gorduroso. Este efeito foi melhor observado à medida que progrediu o tempo de exposição ao produto através da alimentação da fêmea no animal contendo o princípio-ativo no sangue. TAN et al. (2014) relataram alguns efeitos relacionados a administração de hexaflumuron, outro exemplo de benzoilfeniluréia, no metabolismo de carboidratos em *Apolygus lucorum*, um inseto de plantações de algodão. Os autores observaram aumento da trealose em ninfas com diminuição da concentração de glicose, consequentemente levando a uma redução do suporte energético para as demandas fisiológicas de *A. lucorum*.

Em adição às várias funções metabólicas desempenhadas pelo corpo gorduroso como metabolização de hormônios e outras moléculas sinalizadoras, o corpo gorduroso parietal também desempenha o papel fundamental de estocagem de lipídios, glicogênio e proteínas em carrapatos (SONENSHINE, 1991). No 15º dia de exposição ao fluazuron, a concentração de glicogênio no corpo gorduroso apresentou um aumento em comparação ao grupo tratado no dia zero e dia 8. Uma possível explicação a esse fato observado pode ser devido a inibição da biossíntese de quitina, que levou a um efeito anabólico, consequentemente aumentando a concentração de glicose na hemolinfa e assim, a concentração de glicogênio estocado. As células do corpo gorduroso normalmente contêm poucos grânulos de glicogênio, que estão presentes em maior quantidade somente durante a fase ninfal e de ecdise (SONENSHINE, 1991). Tal resultado sugere que o acúmulo de glicogênio é devido a uma supressão na via catabólica, com diminuição da glicogenólise, permitindo a um aumento da via oposta, a glicogênese.

Notou-se que durante todos os dias experimentais, a atividade enzimática da LDH sempre esteve um pouco mais elevada nos grupos expostos em comparação aos grupos controles para todos os dias experimentais, tendo aumentado ainda mais no décimo quinto dia, porém sem haver diferença significativa na comparação entre nenhum dos dias experimentais analisados. Contudo, o aumento no dia 15 é corroborado pelos dados observados na figura 9B no qual a concentração de ácido láctico no dia 15 no grupo exposto ($3,883 \pm 0,056$ mM) aumentou drasticamente e se observou a diferença estatística entre este grupo e todos os demais nos quais o ácido pôde ser detectado e comparado estatisticamente ($p < 0,05$).

A via da fermentação anaeróbia apresentou-se acelerada em função da exposição ao fluazuron dos carrapatos do grupo tratado, como demonstrado pelo aumento da atividade da enzima LDH na hemolinfa, embora não tenha sido observada diferença significativa entre os dias avaliados. Este aumento na atividade da LDH foi considerado como uma resposta fisiológica do carrapato no qual a via fermentativa, dependente da LDH, foi ativada para assegurar a produção de ATP e reoxidação do NADH citossólico. Esta condição também foi registrada em outros modelos experimentais invertebrados, como em moluscos, enfatizando o envolvimento da via na manutenção do metabolismo oxidativo frente a algum agente estressante (TUNHOLI-ALVES et al., 2014).

As curvas de calibração para os ácidos oxálico, pirúvico e láctico foram lineares ($r^2 = 0.99$) para todos os padrões. Valores de intercepto B e inclinação A (Tabela 2).

Tabela 2. Faixa linear para as dosagens dos ácidos orgânicos dos padrões utilizados nas amostras de hemolinfa de fêmeas *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron.

	Ácido pirúvico (mM)	Ácido oxálico (mM)	Ácido láctico (mM)
Faixa linear	0,15 – 1,0	0,08 – 0,50	1,5 – 6,0
a	1253188	1833715	39938
b	-19675,4	-15776,8	-795,36

Faixa linear (menor – maior) dos pontos da curva-padrão ($r=0,99$). Inclinação **a** e intercepto **b**.

Embora tenha havido diferença estatística significativa entre os grupos controle e exposto em vários momentos de avaliação do ácido pirúvico (Figura 9C), quando comparados entre eles, observou-se que para este parâmetro não houve uma regularidade nos resultados que pudesse ser associado aos outros achados ou indicasse efeito da exposição. A diferença estatística aconteceu desde a comparação entre os grupos no tempo 0, antes do tratamento dos bovinos (controle: $0,043 \pm 0,001$ mM e exposto: $0,056 \pm 0,002$ mM) ($p < 0,05$). Mesmo no tempo 15 de avaliação, no qual houve uma inversão entre as médias dos grupos controle e exposto, não se atribuiu tal achado a um possível efeito do tratamento devido à ausência de diferença estatística entre os grupos controle ($0,05 \pm 0,001$ mM) e exposto ($0,045 \pm 0,001$ mM) nesta data ($p > 0,05$).

Quanto ao ácido orgânico ácido oxálico, houve diferença estatística significativa entre os grupos controles na comparação entre os dias 0 ($0,079 \pm 0,003$ mM) e 4 ($0,044 \pm 0,001$ mM), 0 ($0,079 \pm 0,003$ mM) e 8 ($0,038 \pm 0,001$ mM), 4 ($0,044 \pm 0,001$ mM) e 15 ($0,072 \pm 0,001$ mM), e 8 ($0,038 \pm 0,001$ mM) e 15 ($0,072 \pm 0,001$ mM). Os grupos controle e exposto diferiram significativamente em vários dias experimentais, exceto no tempo 0 (controle: $0,079 \pm 0,003$ mM e exposto $0,073 \pm 0,001$ mM) ($p < 0,05$). Notou-se também que os valores médios no grupo exposto se apresentaram mais elevados que no grupo controle (Figura 9D).

Para um melhor entendimento de como o fluazuron afeta o metabolismo oxidativo de carboidratos em *R. microplus*, foram mensuradas as concentrações de certos ácidos orgânicos, incluindo o ácido oxálico, pirúvico e láctico. O aumento na atividade da enzima LDH foi observado paralelamente a um aumento na concentração de ácido láctico na hemolinfa. O estabelecimento dessa condição metabólica sugere a habilidade de *R. microplus* em acelerar a via metabólica alternativa para obtenção de energia, destacando a importância da enzima LDH nesse

processo. Este cenário metabólico foi ainda acompanhado por um acúmulo de ácido oxálico na hemolinfa no grupo tratado, indicando uma desaceleração das reações que dão continuidade ao ciclo de Krebs. Este fato pode ser claramente evidenciado ao se observar o padrão do ciclo do ácido cítrico e o papel do ácido oxálico na oxidação de moléculas acetiladas. Assim, sugere-se que o metabolismo aeróbio esteja reduzido sob tais condições e a ativação da via anaeróbia seja requerida para a manutenção do balanço redox (NELSON; COX, 2008).

Contudo, a concentração de ácido pirúvico não apresentou decréscimo devido à ativação da via fermentativa. Isso pode ser associado às outras vias metabólicas alternativas que podem aumentar os níveis de ácido pirúvico ao utilizar α -aminoácidos que cedem compostos cetoácidos ao ciclo de Krebs através de reações de transaminases (NELSON; COX, 2008).

As variações nas médias das concentrações de glicose e glicogênio e a atividade da lactato desidrogenase, quando associadas aos resultados dos ácidos orgânicos sugerem uma desaceleração no catabolismo e conseqüentemente aceleração do anabolismo. Porém, quando analisadas de forma isolada, considerando-se as avaliações realizadas neste estudo até o dia experimental avaliado, não é possível afirmar que houve diferença significativa destes parâmetros na comparação entre os grupos controle e tratado dia-a-dia para as concentrações de glicose, glicogênio e atividade da LDH.

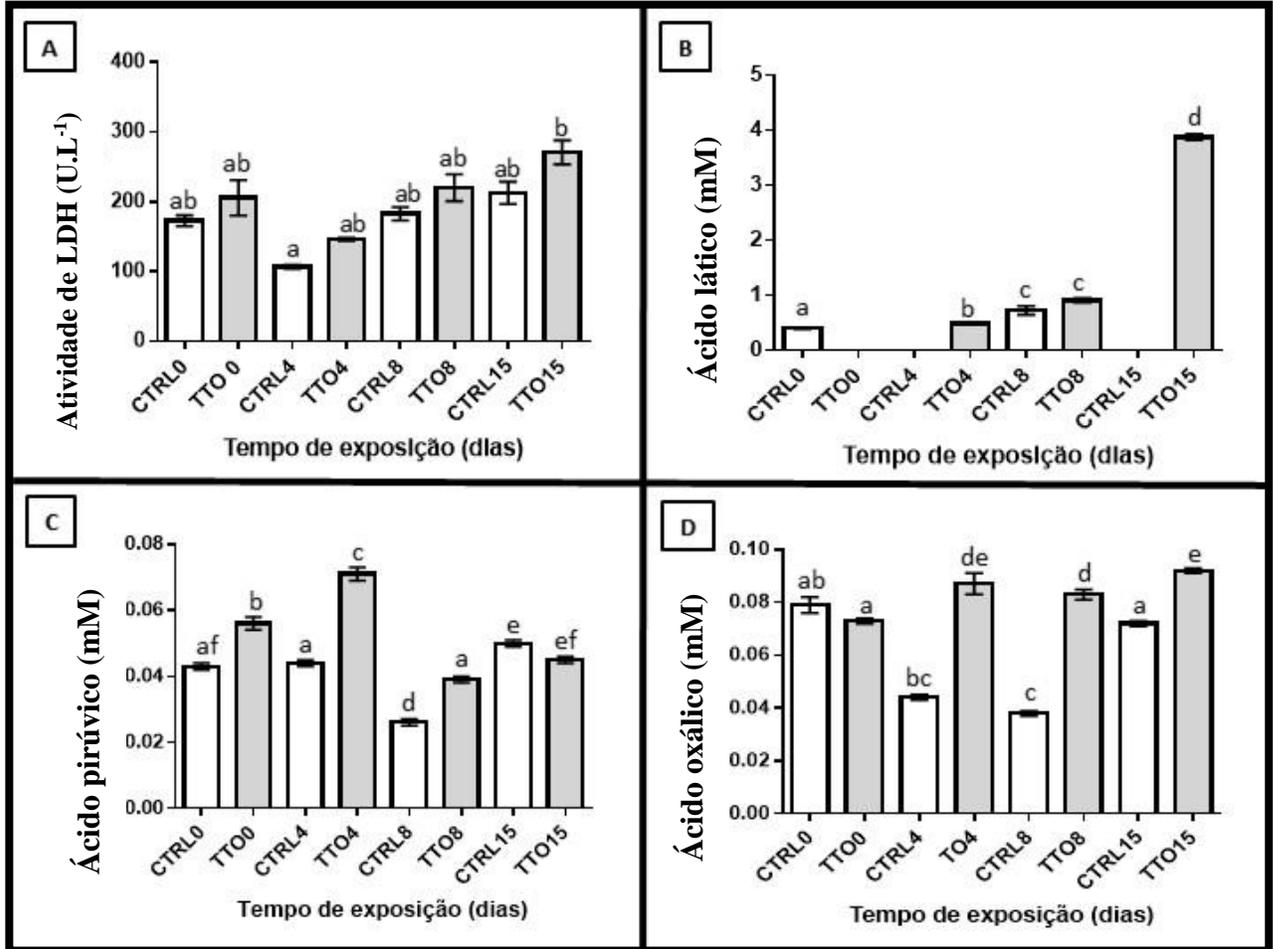


Figura 9. Avaliação do metabolismo de carboidratos na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) (U.L⁻¹); (B) Concentração de ácido láctico (mM); (C) Concentração de ácido pirúvico (mM) e (D) Concentração de ácido oxálico (mM). CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). (A) Médias \pm desvio padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. (B), (C), (D). Médias \pm erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

4.4 Metabolismo de Lipídios na Fêmea Ingurgitada

Foram extraídos os lipídios neutros e realizadas as densitometrias do corpo gorduroso e cutícula de fêmeas ingurgitadas dos grupos controle e exposto ao fluazuron. Porém, devido ao reduzido número de fêmeas no grupo tratado do dia 15 de avaliação, não foi feita a análise densitométrica para este dia.

4.4.1 Corpo gorduroso parietal

Não foram observadas diferenças significativas nas variações percentuais para nenhum dos grupos (controle ou tratado) em nenhum dos períodos de avaliação para as classes de lipídios neutros presentes nos corpos gordurosos ($p>0,05$) (Figura 10). Houve apenas discretas oscilações nas médias, sem indicar tendências que denotariam um efeito resultante do tratamento. Assim, não houve relação entre a exposição ao fluazuron ao longo do tempo e as concentrações dos lipídios no corpo gorduroso.

O corpo gorduroso é um importante órgão de armazenamento de lipídios em carrapatos (SONENSHINE, 1991). Segundo Pontes et al. (2008), em insetos, a forma principal de armazenamento de lipídios em corpo gorduroso é de triacilgliceróis (TAG). No entanto, no presente estudo, em todos os dias experimentais, em *R. microplus*, a classe de lipídios presente em maior quantidade dentre os lipídios neutros no corpo gorduroso foram os ácidos graxos livres, representando entre 32,21 e 36,26% dos lipídios neutros estocados.

Ao longo do estudo, os TAGs e o colesterol livre representaram as classes com os menores valores percentuais, havendo um decréscimo maior do colesterol no último dia em ambos os grupos. Segundo Glória et al. (1993) a redução da concentração de TAGs normalmente ocorre como resultado de uma lipólise precedente à oviposição, liberando ácidos graxos e glicerol. A lipólise é necessária para a mobilização energética para o período de oviposição, segundo Angelo et al. (2013).

Considerando que o conteúdo de colesterol é diretamente proporcional ao peso da fêmea ao final do período de alimentação (CHERRY, 1976), a concentração e o percentual de colesterol livre presente nas fêmeas tratadas foi menor em todos os dias do estudo, sendo maior a diferença observada nas médias do grupo controle e tratado no oitavo dia pós-exposição ao fluazuron. Segundo ainda o mesmo autor, os ovos ficam com cerca de um terço do colesterol da fêmea, refletindo assim numa baixa concentração deste lipídio em estoque na fêmea ingurgitada.

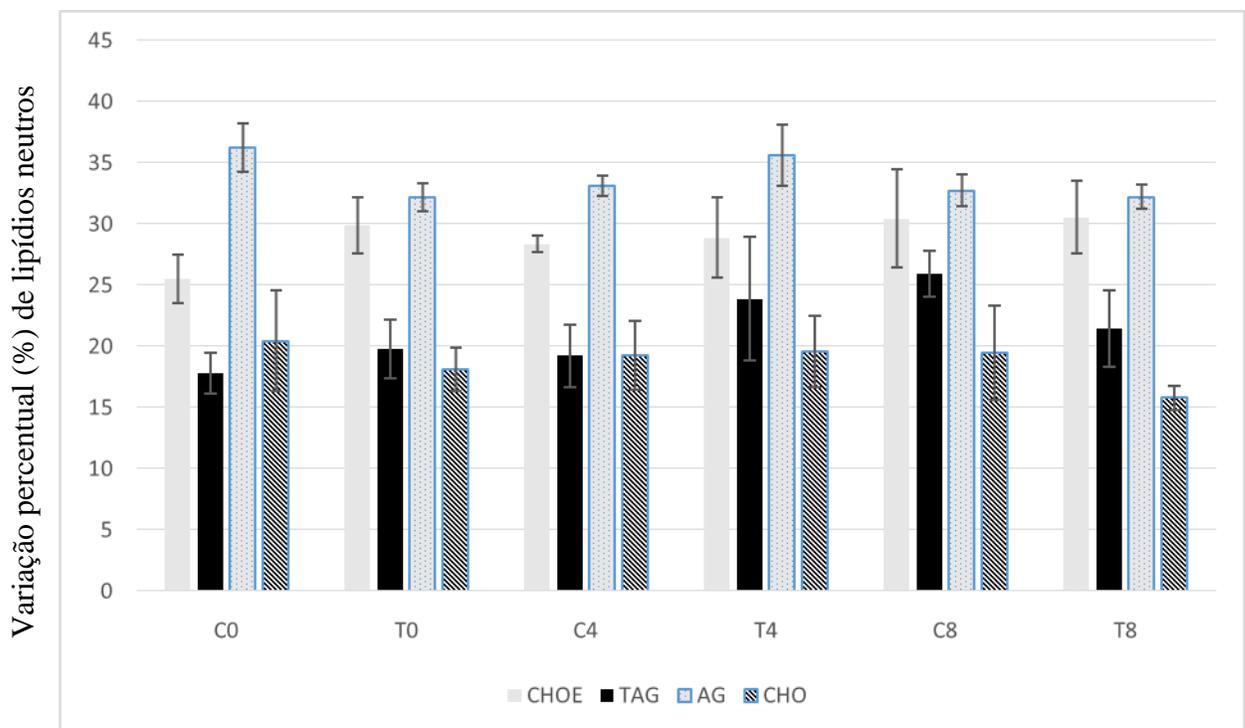


Figura 10. Variação percentual dos lipídios neutros presentes no corpo gorduroso de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. C (controle), T (exposto ao fluazuron). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). Cada grupo continha corpos gordurosos parietais de 10 fêmeas. Médias \pm erro padrão não diferiram significativamente entre as classes de lipídios avaliados ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

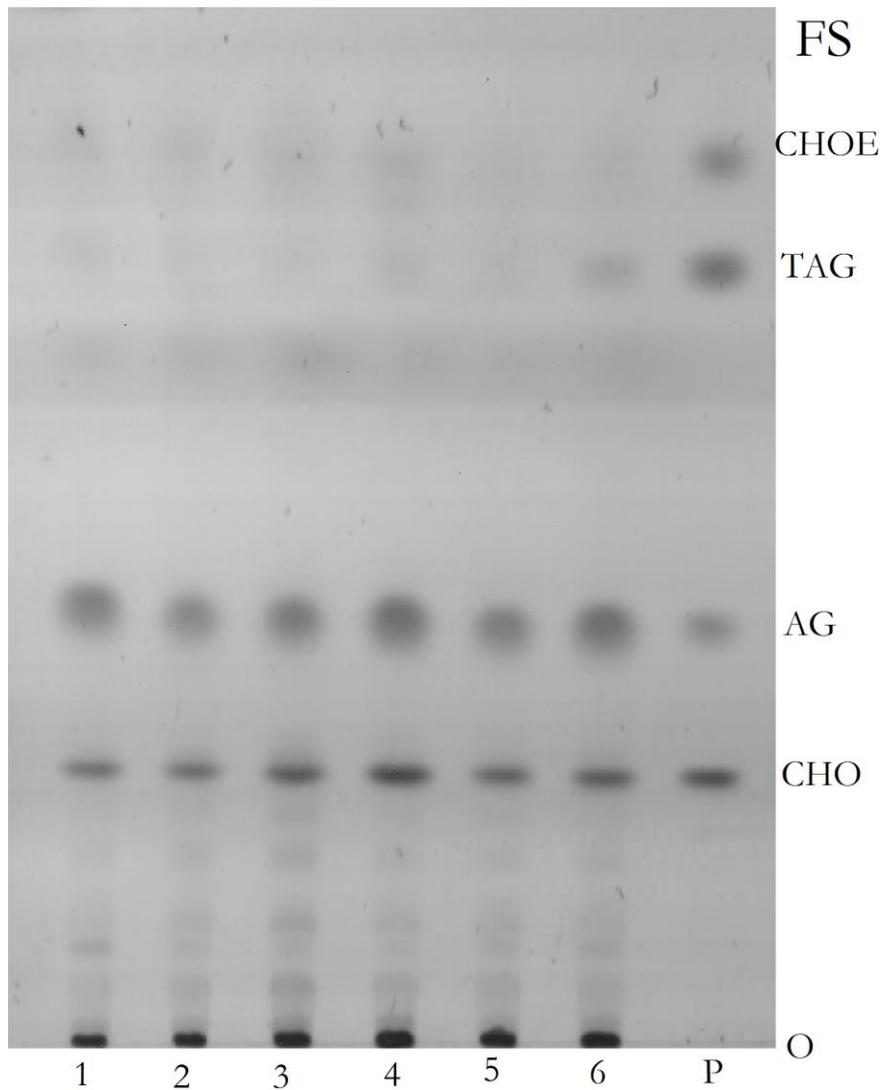


Figura 11. Cromatograma dos lipídios neutros presentes no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada *lane* na imagem representa um grupo experimental: 1 (controle 0); 2 (tratado 0); 3 (controle 4); 4 (tratado 4); 5 (controle 8); 6 (tratado 8). P (amostra padrão: 4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO). Cada grupo continha corpos gordurosos parietais de 10 fêmeas.

4.4.2 Cutícula de fêmeas ingurgitadas

Os lipídios cuticulares garantem proteção contra a dissecação e ressecamento dos ovos (SOBBHY et al., 1994).

Através da cromatografia, os seguintes lipídios neutros foram detectados na cutícula de *R. microplus*: colesterol esterificado, colesterol livre e ácidos graxos livres. Não foi observado triacilglicerol na cutícula de fêmeas de *R. microplus* (Figura 12). Para as demais classes de lipídios, não houve diferença significativa entre os grupos controle e exposto para nenhum dos dias avaliados ao longo do estudo ($p>0,05$).

Em relação aos ácidos graxos livres, ao comparar os percentuais de variação entre todos os grupos dentro das diferentes classes de lipídios, nota-se que não variou a concentração de uma classe de lipídio em relação à outra havendo em todos os dias experimentais uma concentração mais elevada desta classe com relação ao colesterol livre e esterificado. A hidrólise de TAGs do corpo gorduroso, comum nessa fase do desenvolvimento da fêmea (DA GLORIA et al., 1993), observada pela média mais baixa dessa classe de lipídios, foi possivelmente o que permitiu uma maior mobilização dos ácidos graxos livres para a cutícula, além das demais demandas metabólicas.

As variações percentuais de lipídios neutros apresentaram uma discreta diferença nas proporções apenas no oitavo dia pós-tratamento, no qual os ácidos graxos se mantiveram em maior quantidade, enquanto que no grupo controle foi o colesterol esterificado a classe mais alta nesta data (Figura 13). Cherry (1976) afirmou que a cutícula representa a principal rota de mobilização de colesterol em carrapatos, o que pode ser facilmente observado pelo alto percentual de colesterol éster nas fêmeas, sendo a segunda classe mais abundante presente na cutícula de fêmeas ingurgitadas.

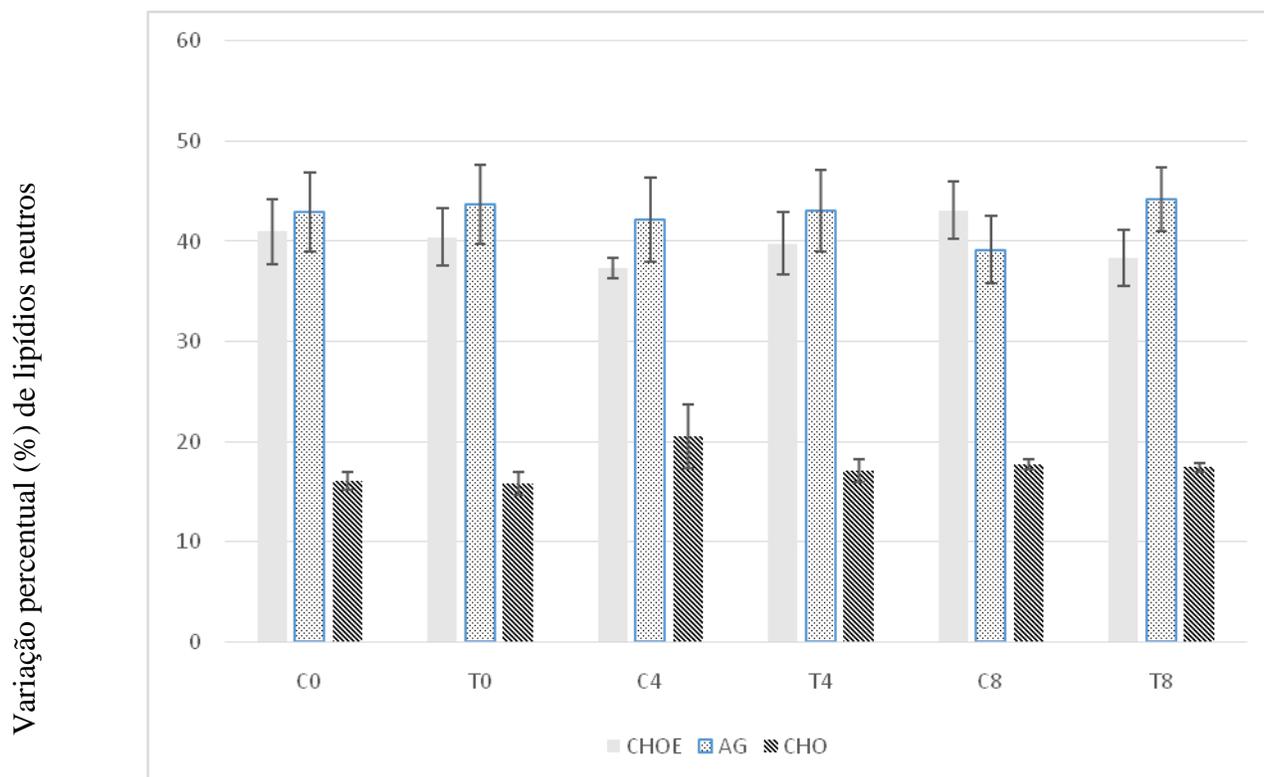


Figura 12. Variação percentual dos lipídios neutros presentes na cutícula de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. C (controle), T (exposto ao fluazuron). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). Cada grupo continha macerado de cutículas pesando 66 mg. Médias \pm erro padrão não diferiram significativamente entre as classes de lipídios avaliados ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

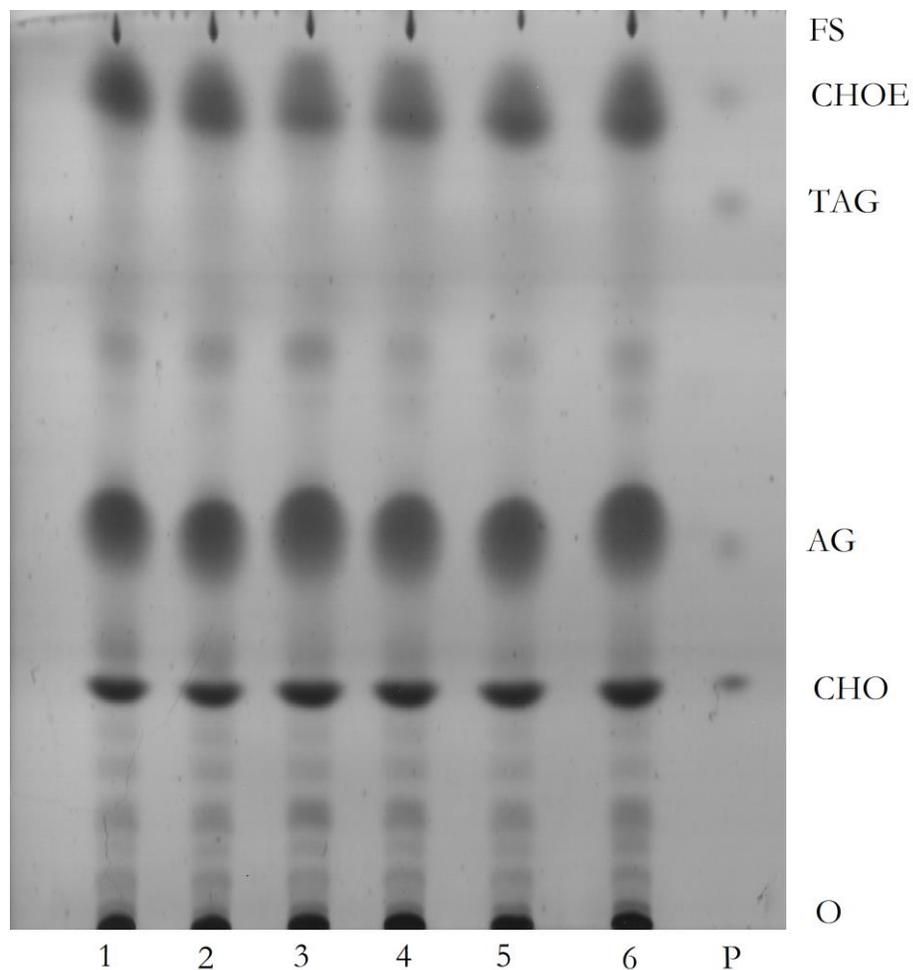


Figura 13. Cromatograma dos lipídios neutros presentes na cutícula de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluzaron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada *lane* na imagem representa um grupo experimental: 1 (controle 0); 2 (tratado 0); 3 (controle 4); 4 (tratado 4); 5 (controle 8); 6 (tratado 8). P (amostra padrão: $2 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). Cada grupo continha macerado de cutículas pesando 66 mg.

4.5 Atividades das Enzimas de Detoxificação no Corpo Gorduroso e Transaminases na Hemolinfa de Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Os resultados das avaliações dessas atividades enzimáticas em função da exposição ao fluazuron estão descritos a seguir.

Corpos gordurosos obtidos de fêmeas ingurgitadas de cepa sensível ao fluazuron foram avaliados quanto a atividade enzimática para as principais enzimas de detoxificação de carrapatos. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) na comparação dentro de cada dia experimental entre grupos controle e tratado para as enzimas de detoxificação presentes no corpo gorduroso (Figura 14). Contudo, foram observadas diferenças significativas para a MFO dentre grupos tratados dos dias 0 ($1,25 \pm 0,49 \mu\text{g}$ de citocromo C. μg^{-1} de proteína) e tratado dia 4 ($4,27 \pm 0,76 \mu\text{g}$ de citocromo C. μg^{-1} de proteína), representando um aumento de 241,6% do grupo exposto no dia 4 em relação ao dia 0 (antes do tratamento).

Considerando o papel das monooxigenases nos processos de detoxificação em carrapatos e insetos, como já relatado por diversos autores (HODGSON, 1983; BARROS et al., 2003; ENAYATI et. al., 2009) a comparação entre o tempo 0 e o quarto dia de exposição nos permite levar em consideração um aumento na atividade da enzima dentro do grupo, ainda que não tenha sido notada diferença entre controle e tratado no mesmo dia de avaliação. Ao observarmos o comportamento das médias no gráfico (Figura 14), vemos que do dia 0 em diante, há uma mudança no comportamento dos resultados ao longo do tempo. No dia 0, a média do controle é maior que a do tratado, enquanto que nos dias pós-tratamento, o tratado supera o controle. Com base nesse resultado, pode-se concluir que a atividade da MFO no corpo gorduroso de fêmeas aumenta em função da exposição ao fluazuron, numa tentativa de metabolizar o princípio-ativo ingerido durante a hematofagia.

Não houve diferença significativa na comparação das atividades da α -esterase dentro de um mesmo dia de avaliação (Figura 14C).

A GST apresentou-se em crescente atividade ao longo do tempo no grupo tratado durante o período avaliado. Tendo começado com $10,22 \pm 2,24 \text{ nM. } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1} no tempo 0, alcançando o pico de $17,22 \pm 1,20 \text{ nM. } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1} no dia 8 pós-tratamento. Contudo, não se observou diferença estatística na comparação entre as médias para a atividade desta enzima de detoxificação (Figura 14A).

Foram avaliadas as enzimas relacionadas ao dano celular (ALT e AST) e a concentração de proteínas totais presentes na hemolinfa das fêmeas ingurgitadas. Não foi observada diferença estatística significativa ($p>0,05$) na comparação entre os grupos controle e exposto para as atividades de ALT e AST na hemolinfa de fêmeas em nenhum dos dias experimentais (Figura 15).

Quanto a concentração de proteínas totais hemolinfáticas, foi observada diferença significativa na comparação entre os grupos tratado dia 4 ($47,33 \pm 2,72 \text{ mg.dL}^{-1}$) e controle dia 8 ($24,66 \pm 1,45 \text{ mg.dL}^{-1}$), porém não houve correlação que justificasse efeito do tratamento nesse caso pois se tratavam de grupos diferentes em dias experimentais diferentes.

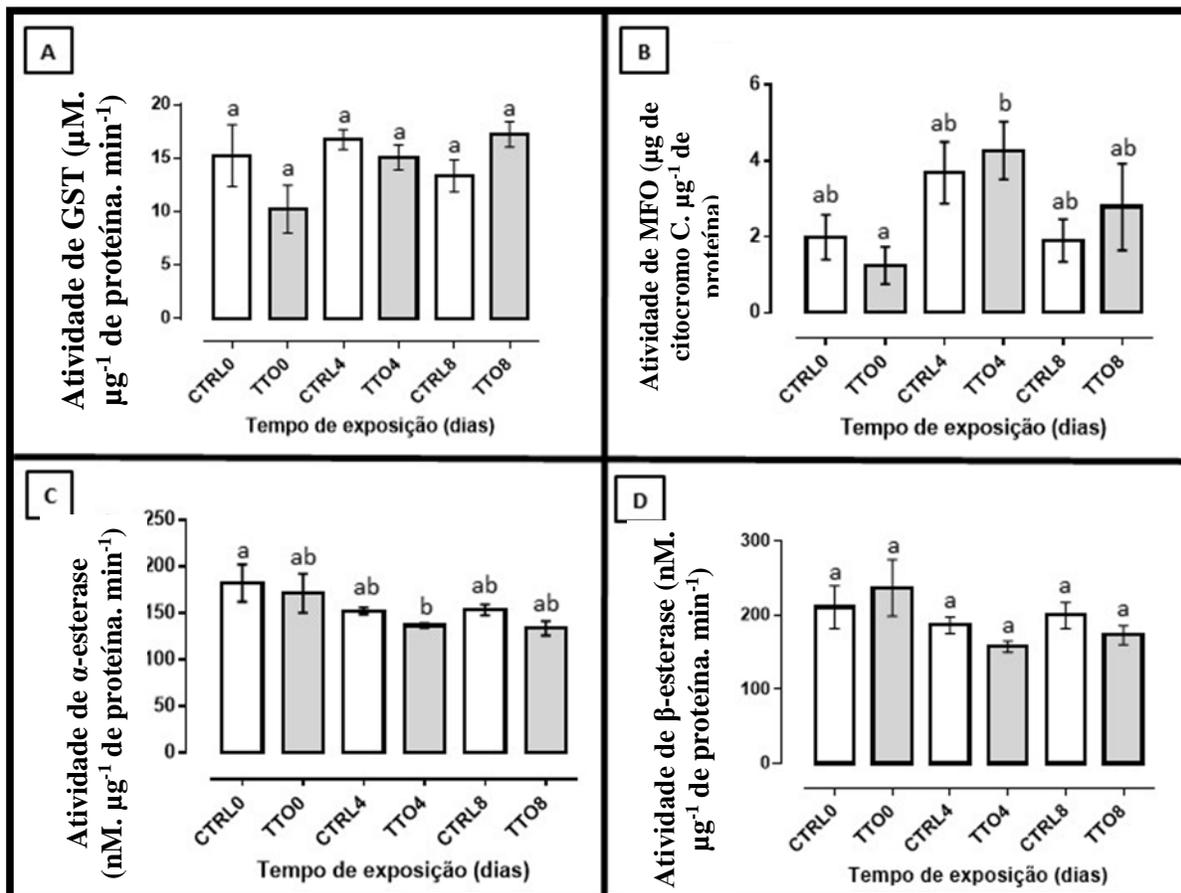


Figura 14. Avaliação das enzimas de detoxificação em corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da glutatona-S-transferase (GST) ($\mu\text{M} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1}); (B) Atividade enzimática da monooxigenase (MFO) (μg citocromo C. μg^{-1} de proteína). (C) Atividade enzimática da α -esterase ($\text{nM} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1}); (D) Atividade enzimática da β -esterase ($\text{nM} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). 0 (dia pré-tratamento), 4 e 8 (dias pós-tratamento). Médias \pm erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

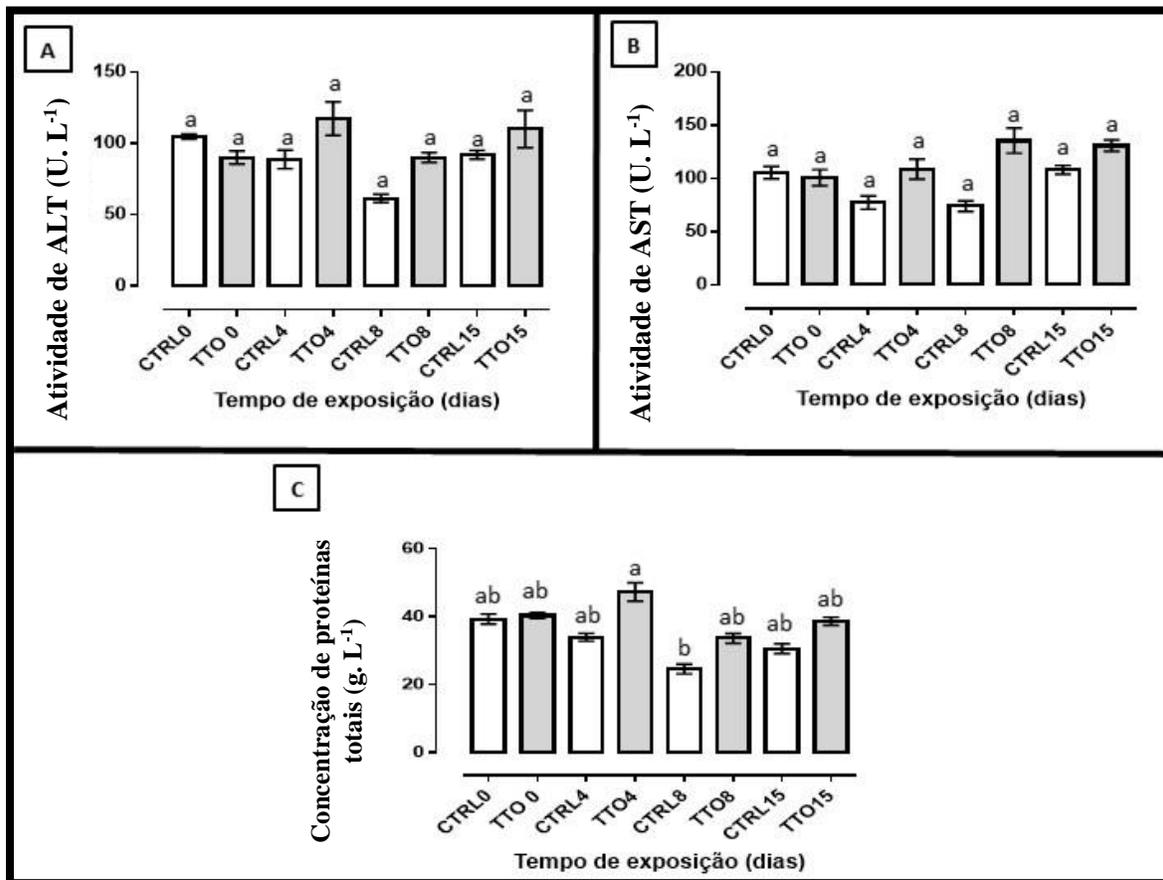


Figura 15. Avaliação de dano celular através do monitoramento das transaminases e proteínas totais da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) (U.L⁻¹); (B) Atividade enzimática da aspartatoaminotransferase (AST) (U.L⁻¹); (C) Concentração de proteínas totais na hemolinfa (g.L⁻¹). CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). 0 (dia pré-tratamento), 4 e 8 (dias pós-tratamento). Médias ± erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

4.6 Perfil Bioquímico de Ovos

4.6.1 Atividade de transaminases e concentração de proteínas totais nos ovos de *Rhipicephalus microplus*

Foram realizados testes bioquímicos para a avaliação da concentração das proteínas totais e as atividades enzimáticas de ALT e AST nos ovos (Figura 16).

Observou-se diferença significativa no grupo exposto do dia 8 em relação a todos os outros dias de avaliação para a concentração de proteínas totais (Figura 16). Neste período observou-se a média mais alta dentre os resultados ($23,0 \pm 4,04 \text{ g.L}^{-1}$), chegando quase ao dobro do resultado observado no grupo controle nessa mesma data ($12,66 \pm 0,66 \text{ g.L}^{-1}$) ($p < 0,05$). No dia 15, há novamente um decréscimo na concentração das proteínas totais no grupo exposto ($14,66 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$), retornando a valores mais próximos do grupo controle ($12,0 \pm 1,15 \text{ g.L}^{-1}$), porém mantendo-se mais alto que este. Dessa forma, concluiu-se que no oitavo dia pós-tratamento, foi onde se observou o maior efeito do tratamento para este parâmetro avaliado.

A atividade da transaminase ALT apresentou diferença significativa entre o grupo exposto no dia 8 ($148,00 \pm 28,86 \text{ U.L}^{-1}$) em relação a quase todos os grupos dos demais dias de avaliação. Esta foi a média mais alta alcançada pelo grupo exposto. O único grupo que não diferiu significativamente do grupo exposto do dia 8 foi o exposto do dia 15 ($102,66 \pm 2,90 \text{ U.L}^{-1}$), que também esteve mais alto que o controle da mesma data, porém, sem diferir significativamente deste ($p > 0,05$). A transaminase AST também apresentou diferença estatística significativa nesta mesma data, na comparação entre o grupo exposto do dia 8 ($72,00 \pm 13,85 \text{ U.L}^{-1}$) e todos os demais grupos em todas as datas ($p < 0,05$). Tais resultados apresentam correlação entre si quando se analisa em conjunto os aumentos nas concentrações de proteínas totais presentes nos ovos e as atividades enzimáticas das transaminases, visto que, no mesmo dia de avaliação, nos três parâmetros, houve diferença significativa entre as médias apenas nos grupos expostos como demonstrado nos gráficos da figura 16.

Levando-se ainda em consideração os resultados referentes aos parâmetros biológicos previamente analisados nesse estudo, nos quais se observou maior efeito do tratamento no oitavo dia de exposição, é possível associar os baixos valores de eclodibilidade e IER aos possíveis danos tissulares confirmados pelo aumento das transaminases e concentração de proteínas totais nos ovos, refletindo a lesão celular que levou a inviabilidade dos ovos.

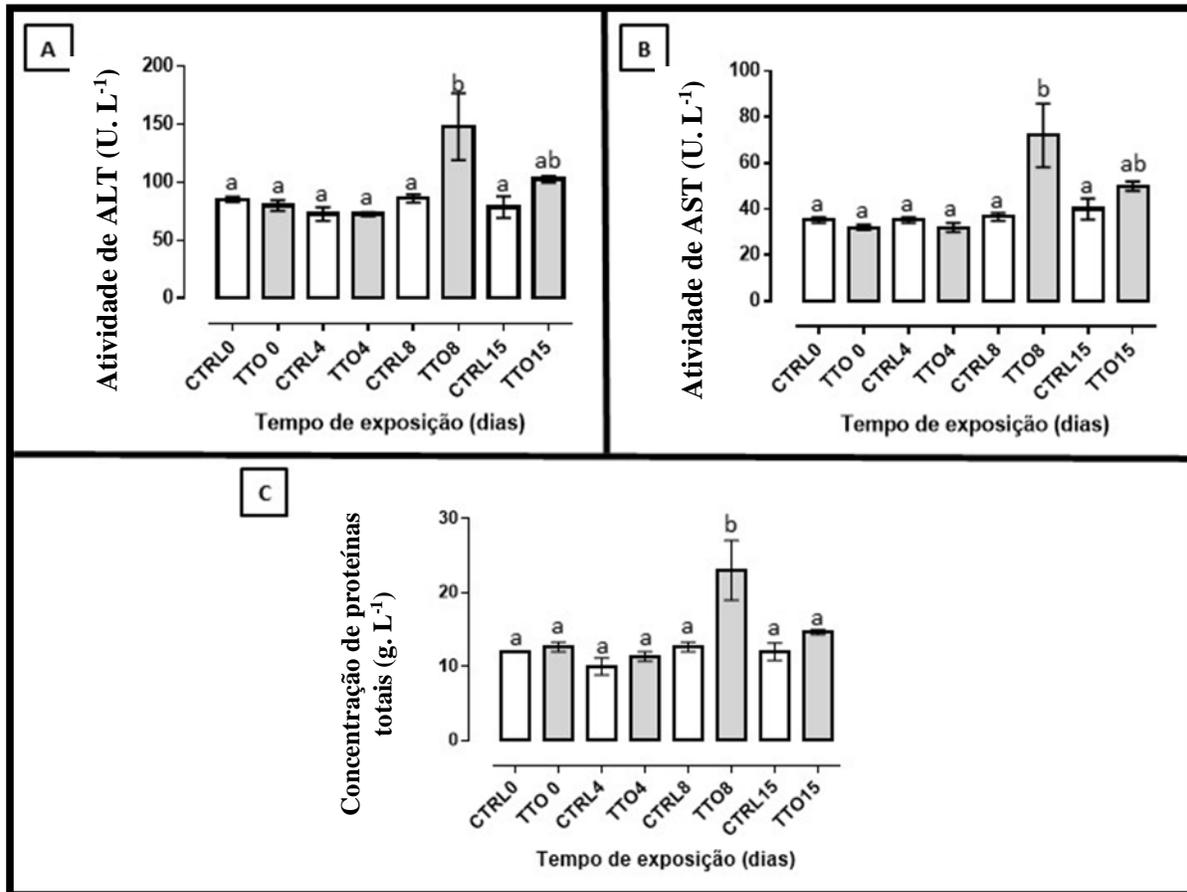


Figura 16. Avaliação da atividade das transaminases e proteínas totais dos ovos obtidos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* previamente expostas ao fluazuron. (A) Atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) (U.L⁻¹); (B) Atividade enzimática da aspartatoaminotransferase (AST) (U.L⁻¹); (C) Concentração de proteínas totais na hemolinfa (g.L⁻¹). CTRL (controle) TTO (exposto ao fluazuron). 0 (dia pré-tratamento), 4 e 8 (dias pós-tratamento). Médias \pm erro padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

4.6.2 Perfil lipídico de ovos

Na avaliação do perfil lipídico de ovos através da CCD, foi observado que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as médias percentuais dos resultados de ácidos graxos livres, triacilglicerol, colesterol livre e colesterol esterificado (Figura 17).

A deposição da cera nos ovos é fundamental para o ciclo de vida dos carrapatos *R. microplus*. Sem a adequada proteção lipídica nos ovos, eles ressecariam e desidratariam (CHERRY, 1976) além da proteção a microorganismos garantida pela presença dos lipídios cuticulares (ZIMMER et al., 2013). Essa proteção impermeável aos ovos é garantida graças ao órgão de Gene, um órgão glandular que se desenvolve à medida que a oogênese e oviposição progridem na fêmea (BOOTH, 1989).

Considerando que a deposição de esteroides representa uma etapa fundamental para a viabilidade dos ovos, é provável que mecanismos compensatórios para garantir uma adequada mobilização lipídica seja assegurada apesar da síntese de quitina ineficiente. Fora que esses eventos metabólicos são independentes da cascata de catálises enzimáticas envolvendo a síntese de quitina.

Os cromatogramas representados nas figuras 18 e 19 contêm as corridas de lipídios dos ovos coletados também no décimo dia de postura para cada dia de avaliação do estudo. No entanto, devido à baixa quantidade de ovos obtidos no décimo dia de postura, para alguns grupos não foi possível ter a quantidade necessária para preparar os homogenatos. Dessa forma, embora estejam reveladas na placa de sílica, as densitometrias dos lipídios destas amostras de dez dias foram desconsideradas dos resultados finais (Figura 18 e Figura 19).

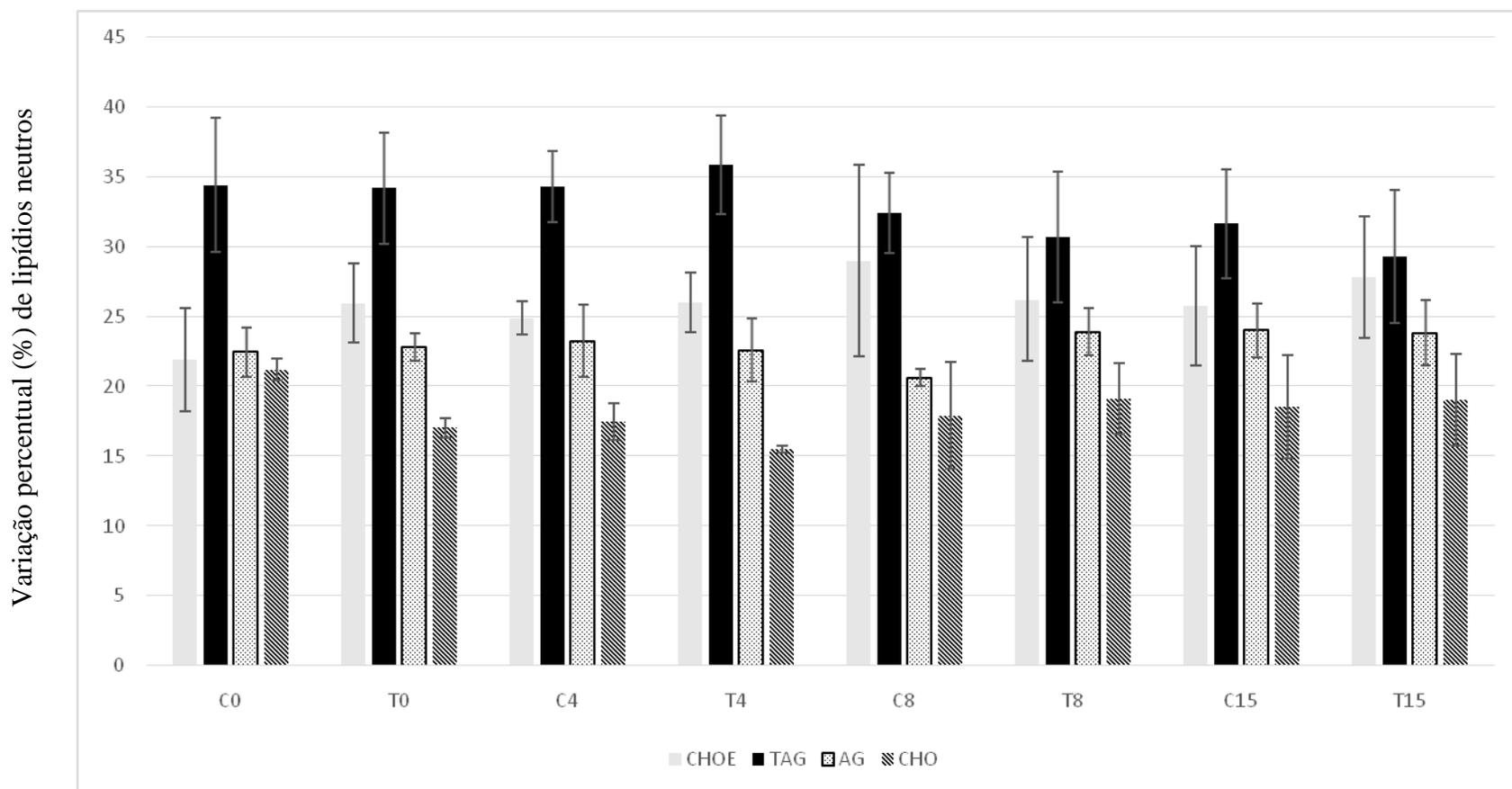


Figura 17.Variação percentual dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas ao fluzaron. C (controle), T (exposto ao fluzaron). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). A dosagem dos lipídios foi padronizada para 1 g de proteínas. Médias \pm erro padrão não diferiram significativamente entre as classes de lipídios avaliados ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

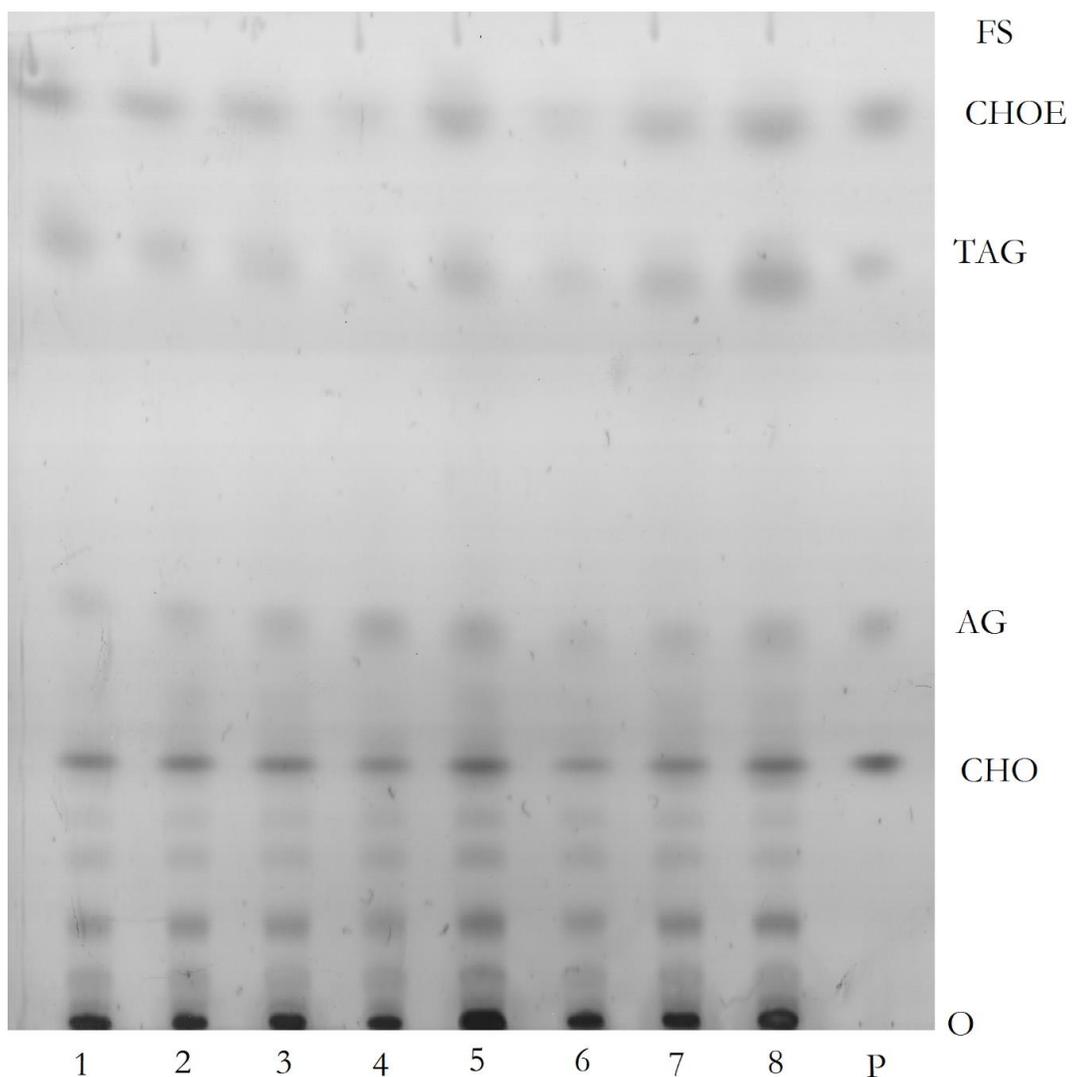


Figura 18. Cromatograma dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluzaron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada *lane* na imagem representa um grupo experimental: 1 (controle 0, 5º dia da oviposição); 2 (controle 0, 10º dia da oviposição); 3 (tratado 0, 5º dia da oviposição); 4 (tratado 0, 10º dia da oviposição); 5 (controle 4, 5º dia da oviposição); 6 (controle 4, 10º dia da oviposição); 7 (tratado 4, 5º dia da oviposição); 8 (tratado 4, 10º dia da oviposição). P (amostra padrão: 4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). A avaliação densitométrica dos lipídios foram realizadas com 1 g de proteínas.

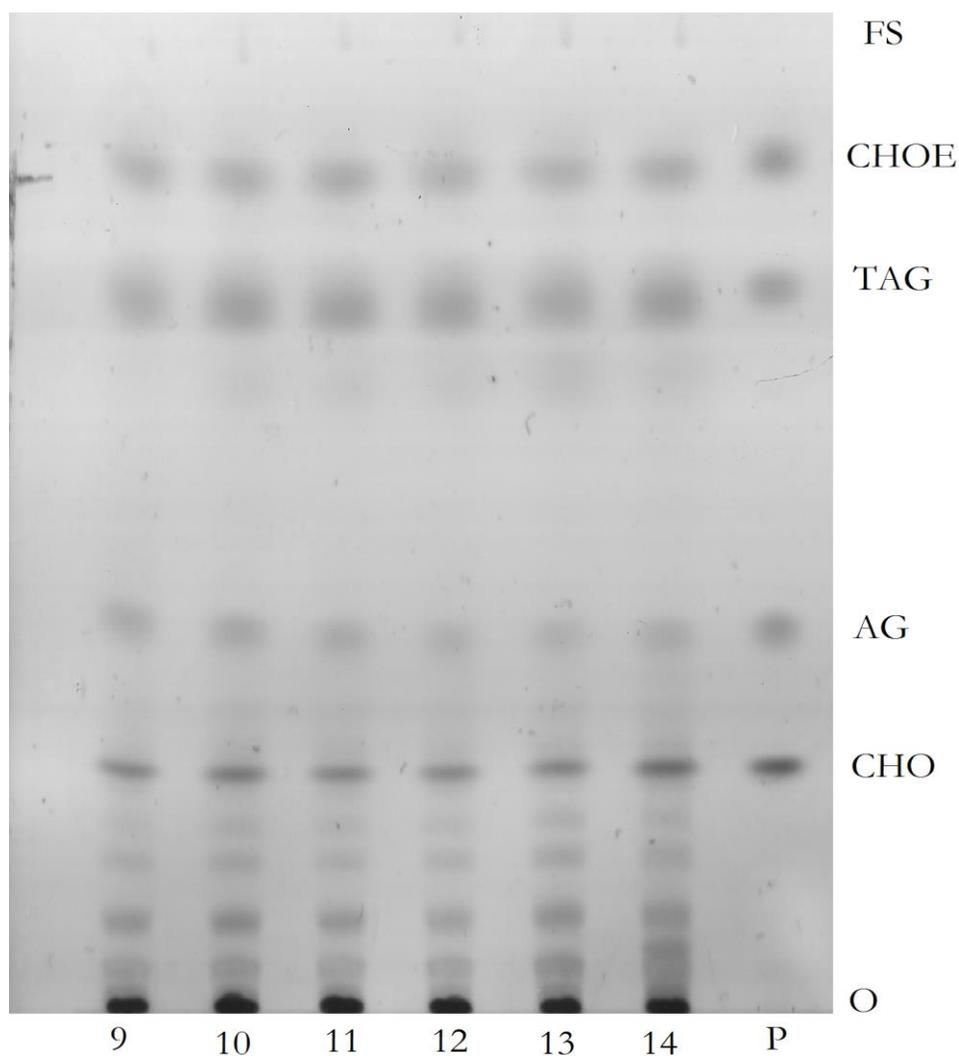


Figura 19. Cromatograma dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron. A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada *lane* na imagem representa um grupo experimental: 9 (controle 8, 5° dia da oviposição); 10 (controle 8, 10° dia da oviposição); 11 (tratado 8, 5° dia da oviposição); 12 (controle 15, 5° dia da oviposição); 13 (controle 15, 10° dia da oviposição); 14 (tratado 15, 5° dia da oviposição). P (amostra padrão: 4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG) e colesterol livre (CHO). A avaliação densitométrica dos lipídios foram realizadas com 1 g de proteínas.

4.6.3 Comparação das atividades enzimáticas em ovos e larvas entre cepa sensível (Porto Alegre) e cepa resistente (Jaguar)

Na comparação entre as cepas sensível e resistente, as respostas enzimáticas foram diferentes em ovos e larvas frente a exposição ao fluazuron.

Com relação aos ovos, foi observado um aumento significativo na atividade da MFO no grupo exposto da cepa resistente ($7,62 \pm 0,91$ μg de citocromo C. μg^{-1} de proteína) quando comparado ao grupo controle ($4,17 \pm 0,44$ μg de citocromo C. μg^{-1} de proteína), demonstrando que a resistência ao fluazuron nessa fase do desenvolvimento, pode estar associado a um aumento na atividade da monooxigenase (Tabela 1). Hodgson (1983) explica que, sob condições normais, a atividade da monooxigenase em ovos é baixa, tornando-se mais elevada apenas em período de muda, após a eclosão das larvas, relacionando sua importância fisiológica na metabolização de hormônios relacionados à ecdise. No presente estudo, ao comparar atividades enzimáticas em ambas as cepas, nota-se que a atividade da MFO se elevou apenas na cepa resistente, enquanto que na cepa sensível houve um declínio da atividade enzimática em função do tratamento. Tal resultado sugere que, nos ovos da cepa sensível, a atividade de MFO foi suprimida e com isso, não foram capazes de metabolizar o princípio-ativo. Dessa forma, atribuiu-se a metabolização do fluazuron à maior atividade da MFO em ovos.

Embora tenha havido diferença significativa na comparação entre os grupos controle da cepa sensível ($84,33 \pm 15,66$ $\text{nM} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1}) e controle da cepa resistente ($65,93 \pm 6,68$ $\text{nM} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. min^{-1}) para a α -carboxilesterase, não se atribuiu esse resultado a efeito do tratamento, visto que se tratavam de grupos controle apenas. Tal achado pode ser associado a variações fenotípicas inerentes a populações diferentes de carrapatos, proveniente de regiões geográficas distintas com um background genético diferente. Além disso, a cepa Jaguar é multirresistente a acaricidas (Reck et al., 2014) o que pode determinar um perfil enzimático diferente entre os dois isolados.

Para as demais enzimas avaliadas em ovos no estudo: carboxilesterases e GST, não foram observadas diferenças estatísticas significativas na comparação entre os grupos (Tabela 3).

Com relação às larvas, as carboxilesterases foram as enzimas com maior atividade no grupo exposto ao fluazuron da cepa Jaguar (resistente) na comparação com o grupo controle da mesma cepa ($p < 0,05$) (Tabela 4).

O aumento na atividade das carboxilesterases nas larvas pode ser associado ao desenvolvimento de resistência das larvas ao fluazuron quando comparadas ao grupo exposto da cepa sensível. Com isso, concluiu-se que a MFO deixa de ser a principal enzima detoxificadora para o princípio-ativo fluazuron à medida que a larva eclode, passando a depender das carboxilesterases como via de metabolização da droga.

Tabela 3. Comparação das atividades enzimáticas de α e β -esterases, glutaciona-S-transferase e monooxigenase entre as cepas sensível (Porto Alegre) e resistente (Jaguar) em ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron

Grupo experimental	n	α -esterase	β -esterase	Glutaciona-S-transferase (GST)	Monooxigenase (MFO)
Controle cepa sensível	3	84,33±15,66 ^a	56,15±8,55 ^a	2,08±0,65 ^a	8,46±0,73 ^{a,c}
Exposto cepa sensível	3	81,57±11,76 ^{a,b}	59,21±11,16 ^a	1,55±0,70 ^a	4,68±0,45 ^b
Controle cepa resistente	3	65,93±6,68 ^{b,c}	54,98±7,51 ^a	1,38±0,52 ^a	4,17±0,44 ^b
Exposto cepa resistente	3	52,53±15,34 ^c	55,81±11,38 ^a	1,99±0,56 ^a	7,62±0,91 ^c

Média \pm desvio padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Na segunda coluna, o número (n) de grupos (*pools*) de ovos usados nos testes enzimáticos.

Tabela 4. Comparação das atividades enzimáticas de α e β -esterases, glutaciona-S-transferase e monooxigenase entre as cepas sensível (Porto Alegre) e resistente (Jaguar) em larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao fluazuron

Grupo experimental	n	α -esterase	β -esterase	Glutaciona-S-transferase	Monooxigenase (MFO)
Controle cepa sensível	3	145,08±17,35 ^a	136,03±7,11 ^a	6,82±0,58 ^{a,c}	7,38±0,85 ^a
Exposto cepa sensível	3	143,49±10,95 ^a	131,90±2,15 ^{a,b}	7,41±0,75 ^a	7,24±1,09 ^a
Controle cepa resistente	3	110,16±8,83 ^b	126,25±5,95 ^b	5,41±0,62 ^b	2,35±0,19 ^b
Exposto cepa resistente	3	129,63±10,71 ^a	137,58±4,11 ^a	6,18±0,69 ^{b,c}	2,44±0,55 ^b

Média \pm desvio padrão seguidos por letras minúsculas iguais não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Na segunda coluna, o número (n) de grupos (*pools*) de larvas usadas nos testes enzimáticos.

5 CONCLUSÕES

A exposição ao princípio-ativo fluazuron foi capaz de causar alterações morfológicas e em parâmetros biológicos de fêmeas de *R. microplus*;

O fluazuron causou uma aceleração no metabolismo anaeróbio em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*;

Em relação ao perfil lipídico, a exposição ao fluazuron não demonstrou nenhum efeito na cutícula, corpo gorduroso ou ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas expostas ao fluazuron;

A exposição ao fluazuron levou a danos tissulares em ovos observados através do aumento na atividade das transaminases;

Quanto às enzimas de detoxificação, a monooxigenase foi a enzima responsável pela detoxificação do fluazuron no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas após exposição ao fluazuron e também nos ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas da cepa resistente ao fluazuron. Contudo, para o estágio de larva, as carboxilesterases foram as enzimas que apresentaram maior atividade na cepa resistente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou as alterações fisiológicas que ocorrem quando carrapatos da espécie *R. microplus* são expostos ao regulador de crescimento de artrópodes fluazuron, as quais incluem mudanças nos parâmetros biológicos, no metabolismo de carboidratos, na concentração de ácidos orgânicos e nas enzimas de detoxificação, sugerindo múltiplos mecanismos de ação que culminam na morte do carrapato, ou mesmo na inviabilidade dos ovos colocados pelas fêmeas.

Possivelmente, a alta mortalidade observada nas larvas e ninfas nas cepas susceptíveis ao fluazuron pode estar relacionada ao ineficiente controle destes efeitos metabólicos observados, frente ao distúrbio na biossíntese de quitina. Contudo, a interferência em outras vias metabólicas pode atuar como um efeito adicional. Os resultados aqui apresentados validam a perda de homeostase da glicose na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas. Isso sugere que a sobrevivência dos carrapatos seja dependente da ativação de mecanismos fisiológicos compensatórios como o aumento na atividade de LDH, relacionado aos níveis elevados de ácido láctico na hemolinfa, o que demonstra que a via fermentativa anaeróbia é uma estratégia metabólica usada pelo artrópode sob condições de estresse fisiológico. Este resultado foi apresentado com este enfoque pela primeira vez na literatura (GAUDÊNCIO et al., 2016). Os dados apresentados no presente estudo confirmam que a inibição da biossíntese de quitina interfere em outras vias metabólicas, através de mecanismos ainda desconhecidos, os quais corroboram os efeitos acaricidas do fluazuron. Tais estudos facilitarão o desenvolvimento de novas pesquisas e o estabelecimento de novas estratégias e alvos metabólicos, na tentativa de controlar de forma mais eficaz as populações de *R. microplus*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R.Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D.D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v.203, p.6–20, 2014.

ANDREOTTI, R. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Gado de Corte. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Dados eletrônicos. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36 p.

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

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

ANGELO, I.C.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; PERINOTTO, W.M.S.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; QUINELATO, S.; PINHEIRO, J.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Physiological changes in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) experimentally infected with entomopathogenic Fungi, **Parasitology Research**, v.114, p.219-225, 2015.

Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 3: IFCC Method for Alanine Aminotransferase (EC 2.6.1.2). *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, v.24, p.481-495, 1986.

BARROS, A.T.M.; SCHUMAKER, T.T.S.; KOLLER, W.W.; KLAFKE, G.M.; ALBUQUERQUE, T.A.; GONZALEZ, R. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Haematobia irritans* (Muscidae) from Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 136-142, 2013.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) /Butantan, 2006. 223p.

BENETTI, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, n.1, p.52-61, 1974.

BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L. Haemolymph lipids of healthy and diseased Japanese beetle larvae. **Journal of Insect Physiology**, v.18, p.53-62, 1972.

BITTENCOURT, A. J. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): infestações artificiais, biologia da fase não parasitária e prevalência em caprinos e eqüinos. 1990. 87f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Journal of Biochemistry Physiology**, v.37, p. 911-913, 1959.

BLOMQUIST, G.J.; JACKSON, L.L. Chemistry And Biochemistry Of Insect Waxes. **Progress In Lipid Research**, v.17, p. 319-345, 1979.

BOOTH, T.F. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gene's) organ in ixodid ticks. **TissueCell**, v. 21, p. 113-22, 1989.

BORGES, L. M. F.; CARNEIRO, J. R.; GOMES, A. G.; MOREIRA, P. C. Influência do peso inicial e da estação do ano na conversão em ovos de fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 127-131, 2001.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Fundação Oswaldo Cruz. Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 128p.

BULL, M.S.; SWINDALE, S.; DOVEREND, D.; HESS, E.A. Supression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron; an acarine growth regulator. **Australian Veterinary Journal**, v. 74, p.468–470, 1996.

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

CALLIGARIS, I.B.; OLIVEIRA, P.R.; ROMA, G.C.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Action of the Insect Growth Regulator Fluazuron, The Active Ingredient of the Acaricide Acatak VR, in *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research And Technique**, n. 76, p. 1177–1185, 2013.

CAMPOS, E.; MORAES, J.; FAÇANHA, A.R.; MOREIRA, E.; VALLE, D.; ABREU, L.; MANSO, P.P.A.; NASCIMENTO, A.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H.; MASUDA, A.; VAZ JR, I.S.; LOGULLO, C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**, v.138, p. 349–357, 2006.

CHANG, R.; MOQUIST, P.; FINNEY, N.S. Chemical synthesis of UDP-4-O-methyl-GlcNAc, a potential chain terminator of chitin synthesis. **Carbohydrate Research**, v. 339 , p.1531–1536, 2004.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 1ª ed. Guaíba: Agropecuária, 1997. 176p.

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

CITRONI, D.; D'AGOSTINO, B. I.; MARTINS, S.; SCHMID, H. R.; JUNQUEIRA, P. Efficacy of fluazuron against infestations with Argentinean *B. microplus*, **17th International Conference of the WAAVP**, Copenhagen, p. 15 – 19, 1999.

COHEN, E. Chitin Biochemistry: Synthesis and inhibition. **Annual Review of Entomology**, v. 32, p.71-93, 1987.

CRUZ, B.C.; TEIXEIRA, W.F.P.; MACIEL, W.G.; FELIPPELLI, G.; FÁVERO, F.C.; CRUZ, A.C.; BUZZULINI, C.; SOARES, V.E.; GOMES, L.V.C.; LOPES, W.D.Z.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. **Research in Veterinary Science**, n.97, p.80-84, 2014.

DA GLÓRIA, M.A. **Estudos preliminares para avaliação do uso de compostos reguladores de crescimento no controle de *R. (Boophilus) microplus***. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1988.

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

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

DE PAULA, P.H.; FURLONG, J. Comportamento de queda de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.627-631, 2002.

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

DING, Y.; ORTELLI, F.; ROSSITER, L.C.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression. Profiles. **BMC Genomics**, v.4, n.35, 2003.

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n.1, p. 130-133, 1973.

DUSCHER, G.G.; GALINDO, R.C.; TICHY, A.; HUMMEL, K.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Glutathione S-transferase affects permethrin detoxification in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p.225–233, 2014.

ECK, W.H. Mode of action of two benzoylphenylureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. **Insect Biochemistry**, v.9, p.295-300, 1979.

ENAYATI, A.A.; ASGARIAN, F.; SHARIF, M.; BOUJHMEHRANI, H.; AMOUEI, A.; VAHEDI, N.; BOUDAGHI, B.; PAIZAK, N.; HEMINGWAY, J. Propetamphos resistance in *Rhipicephalus bursa* (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, n.162, p.135–141, 2009.

ENAYATI, A.A.; ASGARIAN, F.; AMOUEI, A.; SHARIF, M.; MORTAZAVI, H.; BOUJHMEHRANI, H.; HEMINGWAY, J. Pyrethroid insecticide resistance in *Rhipicephalus bursa* (Acari, Ixodidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.97, p.243–248, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, pp. 25–77.

FREITAS, D.R.J.; ROSA, R.M.; MORAES, J.; CAMPOS, E.; LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.146, p.688–694, 2007.

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1993. (Boletim Técnico, n. 8).

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v.27, n.159, p. 26-32, 2007.

FURLONG, J.; SALES, R.O. Controle estratégico de carrapatos no bovino de leite: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.01, n.02, p.44-72, 2007.

GALAY, R.L; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; MOCHIZUKI, M.; FUJISAKI, K.; TANAKA, T. Iron metabolism in hard ticks (Acari: Ixodidae): The antidote to their toxic diet. **Parasitology International**, v. 64, p.182–189, 2015.

GAUDÊNCIO, F.N.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; LIMA, M.G.; GÔLO, P.S.; ÂNGELO, I.C.; CASTRO, R.N.; FONSECA, A.H.; SCOTT, F.B.; PINHEIRO, J. Alterations in the oxidative metabolism of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in response to exposure to the insect growth regulator fluazuron. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol.25, n.1, p.54-60, 2016.

GELLA, F.J.; OLIVELLA, T.; CRUZ PASTOR, M.; ARENAS, J.; MORENO, R.; DURBAN, R.; GÓMEZ, J.A. A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. **Clinica Chimica Acta**, v.153, p.241-247, 1985.

GONZALES, J. C., SILVA, N. R., FRANCO, N. A vida livre do *Boophilus microplus*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.3, p. 21-28, 1974.

- GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104p.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.S.; DAVID, M.M. Determination of sérum proteins by means of the Biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.
- GRAF, J-F. The Role of Insect Growth Regulators in Arthropod Control. **Parasitology Today**, v.9, n.12, p. 471-474, 1993.
- GRAF, J-F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G.A.; MOLENTO, M.B.; BORDIN, E.L.; ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view, **Parasitology**, v.129, S427-S442, 2004.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.;LÉON, A.A.P.;PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.2, p. 150-156, 2014.
- GUDDERRA, N.P.; SONENSHINE, D.E.; APPERSON, C.S.; ROE, R.M. Hemolymph proteins in ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 269-278, 2002.
- GUIZZO, M.G.; ABREU, L.; MASUDA, A.; LOGULLO, C.; VAZ JUNIOR, I.S. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.40, n.1, p.1-12, 2012.
- HACKMAN, R.H.; GOLDBERG, M. Comparative study of some expanding arthropod cuticles: the relation between composition, structure and function. **Journal of Insect Physiology**, v.33, n.1, p39-50, 1987
- HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; WAGNER, G. G.; GEORGE, J. E. Sequence analysis of the knockdown resistance-homologous regions of the para-type sodium channel gene from pyrethroid-resistance *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.36, n.5, p.539-543, 1999.
- HEMINGWAY, J., 1998. **Field and laboratory manual for the mechanistic detection of insecticide resistance in insects**. WHO-CTD/MAL/98.6, 35p.
- HODGSON, E. The significance of cytochrome P-450 in insects. **Insect Biochemistry**, v.13, n.3, p. 237-246, 1983.
- INCHEM (Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations). Disponível em: www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2005pr14.pdf. Acesso em 15 de fev. 2016.
- IWUALA, M.; UMEZURIKE, G.M.; NWADIOGBU, N. A qualitative study of the lipid components of eggs of *Boophilus decoloratus* KOCH (Ixodoidea Ixodidae). **Acarologia**, v.21, p. 3-4, 1979.

KAWOOYA, J.K.; LAW, J.H. Role of lipophorin in lipid transport to insect egg. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8748-8753, 1988.

KLOWDEN, M.J. 2007. Chapter 2 - Integumentary Systems, p.75-135. In: KLOWDEN, M.J. **Physiological Systems in Insects (Second Edition)**, London: Academic Press.

KRAMER, K.J.; KOGA, D. Insect chitin - Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. **Insect Biochemistry**. v.16, n.6, p.851-877, 1986.

LEES, A.D.; BEAMENT, J.W.L. An egg-waxing organ in ticks. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 89, p. 291-333, 1948.

LEVENBOOK L, BOCTOR FN, FALES HM. Biochemical studies of tick embryogenesis: free sugars in adult haemolymph and during embryogenesis of *Dermacentor andersoni*. **Journal of Insect Physiology**, v.26, n.6, p.381-383, 1980.

LOGULLO, C.; WITOLA, W.H.; ANDRADE, C.; ABREU, L.; GOMES, J.; VAZ JR., I.S.; IMAMURA, S.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p.261–269, 2009.

MARECHAL, E.; RIOU, M.I.; KERBOEUF, D.; BEUGNET, F.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P.M. Membrane lipidomics for the discovery of new antiparasitic drug targets. **Trends in Parasitology**, v.27, n.11, 2011.

MARKWELL, M.A.K.; HAAS, S.M.; BIEBER, L.L.; TOLBERT, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical Biochemistry**, v.87, p.206–210, 1978.

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 Biologia Tropical**, v. 46, n. 3, p. 691-696, 1998.

MELO, R.M.P.S. **Morfologia e Biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Submetido ao Regulador de Crescimento de Artrópodes Fluazuron**. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007. 43f.

MENDES, M.C.; SILVA, M.X.; BRACCO, J.E. Biochemical test to determine the resistance of two strains of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.10, n.2, p. 61-65, 2001.

MERZENDORFER H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v.90, n.9, p. 759- 769, 2011.

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

MORANDO, A.; GELINSKI, J.N.L.M. Estudo preliminar do desenvolvimento embrionário in vitro de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Unoesc & Ciência – ACBS**, v. 1, n. 1, p. 23-28, 2010.

MORITA, A.; SOGA, K.; HOSON, T.; KAMISAKA, S.; NUMATA, H. Changes in mechanical properties of the cuticle and lipid accumulation in relation to adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p.241–247, 1999.

NATION, J.L. **Insect physiology and biochemistry**. Florida: CRC Press, 2002.

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

NOVARTIS. Acatak® (Fluazuron) <http://www.ah.novartis.com/products/en/acatak_cattle.shtml> Acessado em 05 de maio de 2012.

OLIVEIRA, P.R.; CALLIGARIS, I.B.; ROMA, G.C.; BECHARA, G.H.; PIZANO, M.A.; MATHIAS, M.I.C. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD95 and LD50. **Experimental Parasitology**, 2012.

OLIVEIRA, P.R.; CALLIGARIS, I.B.; NUNES, P.H.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Fluazuron-induced morphological changes in *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: An ultra-structural evaluation of the cuticle formation and digestive processes. **Acta Tropica**, v.133, p.45–55, 2014.

PALLI, S.R.; RETNAKARAN, A. 1999. Molecular and Biochemical Aspects of chitin Synthesis Inhibition. p. 85-98. In: JOLLES, P.; MUZZARELLI, R.A.A (Eds.), **Chitin and Chitinases**. Birka user Verlag, Basel.

PASAY, C.; ROTHWELL, J.; MOUNSEY, K.; KELLY, A.; HUTCHINSON, B.; MIEZLER, A.; MCCARTHY, J. An exploratory study to assess the activity of the acarine growth inhibitor, fluazuron, against *Sarcoptes scabiei* infestation in pigs. **Parasites & Vectors**, v.40, n.5, 2012.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Biologia, controle e resistência**. 1ª ed. São Paulo: MedVet, 2008, 169p.

PINHEIRO J, GOMES E.M. A method for glycogen determination in mollusks. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 37, p.569-576, 1994.

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

RAIA, V.A. **Estudos bioquímicos comparativos dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) durante a oviposição.** Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011. 38f.

RAIA, V.A.; FILHO, P.R.C.; PEDRENHO, A.R.; FLAUSINO, W.; FAMADAS, K.M. Quantitative and qualitative evaluation of the egg proteins of *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* (acari: ixodidae) during oviposition. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.34, n.3; p.177-182, 2012.

RECK J, KLAFKE GM, WEBSTER A, DALL'AGNOL B, SCHEFFER R, SOUZA UA.; 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. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n.1-2, p. 128-136, 2014.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROMA, G.C. FURQUIM, K.C.S.; BECHARA, G.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.825–830, 2010.

RUIZ, J.I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p.1482–1489, 1997.

SANTOS, A.P.; FURLONG, J. Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.1033-1038, 2002.

SCIENTIFIC COMMITTEE. Recommendations pour la mesure de la concentration catalytique de la lactate deshydrogenase dans le serum humain a 30°C, **Annales Biologie Clinique**, v.40, p.87-164, 1982.

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

SOBBHY, H.; AGGOUR, M. G.; SONENSHINE, D. E.; BURRIDGR, M. J. Cholesterol esters on the body surfaces of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844) and the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1860). **Experimental and Applied Acarology**, v.18, p.265-280, 1994.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, COMITÉ CIENTÍFICO, COMISIÓN DE ENZIMAS. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la alanina aminotransferasa en suero sanguíneo humano. **Química Clínica**, v.6, p.241-244, 1987.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, COMITÉ CIENTÍFICO. Comisión de Enzimas. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de lactato deshidrogenasa en suero sanguíneo humano, **Química Clínica**, v.8, p.57-61, 1989.

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

SOUZA, G.S. **Avaliação da atividade do novaluron, sobre *Boophilus microplus* (Canestrini) em bovinos de corte naturalmente infestados**. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica. Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009. 44f.

SVOBODA, J. A.; KAPLANIS, J. N.; ROBBINS, W. E.; THOMPSON, M. J. Recent developments in insect steroid metabolism. **Annual Review of Entomology**, v.20, p.205-220, 1975.

TAN, YA.; XIAO, LB.; SUN, Y.; ZHAO, J.; BAI, LX. Sublethal effects of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, in the cotton mirid bug, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n.111, p. 43-50, 2014.

TATCHELL, R.J.; SCHUNTNER, C.A. Glucose metabolism in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Insect Physiology**, v.18, n. 2, p. 283–288, 1972.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.6, p.24-27, 1969.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO JR.; A.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.109, p.885–891, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V.M., TUNHOLI, V.M., CASTRO, R.N., SANT'ANA, L.D.O., SANTOS-AMARAL, L., OLIVEIRA, A.P.M., GARCIA, J., THIENGO, S.C., PINHEIRO, J. AND MALDONADO JR, A. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography, **Parasitology International**, v.63, p.64–68, 2014.

UNGER, T.A. Fluazuron. In: **Pesticide Synthesis Handbook**, Noyes Publications. Nova Jersey, EUA. p.231-232, 1996.

VIEIRA, V.P.C. **Eficácia do regulador de Crescimento de Artrópodes Fluazuron no Controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae) em Cães**. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009. 45f.

WANG, Y.; ZHAO, S.; SHI, L.; XU, ZHIFENG; HE, L. Resistance selection and biochemical mechanism of resistance against cyflumetofen in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n.111, p. 24-30, 2014.

WHO, 1997. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **International Programme on Chemical Safety. World Health Organization** <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v39je09.htm>> Geneva: 1997. Acessado em: 05 de maio de 2012.

WILLADSEN, P.; KEMP, D.H.; MCKENNA, R.V. Blood meal ingestion and utilization as a component of host specificity in the tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift for Parasitenkunde**, n. 70, p.415-420, 1984.

ZIMMER, K.R.; MACEDO, A.J.; NICASTRO, G.G.; BALDINI, R.L.; TERMIGNONI, C. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.4, p.366– 376, 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Fórmulas dos parâmetros biológicos índice de produção de ovos (BENNETT, 1974), índice de eficiência reprodutiva (MELÉNDEZ et al., 1998) e índice nutricional (BENNETT, 1974).

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

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

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

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

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

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

Anexo 2. Protocolo para dosagem de proteína total pelo método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978).

1- Em um tubo de ensaio, colocar 0,2 mL de água destilada, 10 μ L de amostra e 1,0 mL de solução alcalina (14,7 mL da solução 20 g Na_2CO_3 /100 mL NaOH 1N; 20 g 0,15 mL de tartarato de sódio e potássio; 0,15 mL de CuSO_4).

2- Após leve agitação, manter o tubo de ensaio em repouso durante 15 minutos.

3- Adicionar 0,1 mL do reativo de Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada na proporção 0,5:1 v/v).

4- Após leve agitação, manter o tubo de ensaio em repouso durante 15 minutos.

5- Realizar a leitura das absorbâncias das amostras em 660 nm.

6- Realizar a curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, nas mesmas condições descritas acima.

Anexo 3. Método de Nelson para desproteinização de amostras

Reagentes:

- 1) Sulfato de zinco em solução aquosa a 5%.
- 2) Solução de hidróxido de bário aproximadamente 0,3N.

Ba(OH)₂ 8H₂O 12g

H₂O destilada 250 mL

Procedimento:

- Transferir 100 µL da amostra para o tubo de centrífuga contendo 1,5mL de água destilada.
- Adicionar 200 µL da solução de Ba(OH)₂ e misturar.
- Esperar que a mistura se torne acastanhada.
- Acrescentar 200 µL da solução de ZnSO₄.
- Agitar bem. Esperar 5 minutos e depois, centrifugar entre 10 a 15 minutos.
- Separar o sobrenadante e descartar o pellet, onde as proteínas foram concentradas por arraste.