

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente
Ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
(Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) por meio de
Tubos Capilares

Charles Passos Rangel

2008



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

**ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL DE FÊMEAS PARCIALMENTE
INGURGITADAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI,
1887) (ACARI: IXODIDAE) POR MEIO DE TUBOS CAPILARES**

CHARLES PASSOS RANGEL

Sob a Orientação do Professor
Aivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

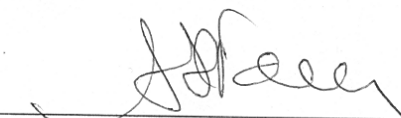
Seropédica, RJ
Agosto de 2008

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

CHARLES PASSOS RANGEL

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/08/2008



Aivaldo Henrique da Fonseca. (Dr.) (UFRRJ)



Márcia Cristina de Azevedo Prata. (Dr.^a) Embrapa (CNPGL)



Rafael de la Vega Ruibal. (Dr.) (LABIOFAN)

Dedico este trabalho a minha avó Ruth por todos estes anos de amizade e exemplo de vida. Aos meus pais José e Gilda pelo incentivo e apoio. Aos meus irmãos Otacílio José, Rafael, Thiago e Thialy. À minha namorada Amanda pelo carinho e companheirismo tão importantes. Em especial ao meu avô Otacílio (*in memoriam*), QUE SAUDADE!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por se fazer presente em todos os momentos, contribuindo para concretização desta etapa de minha vida.

Ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, por seus ensinamentos, incentivos e confiança durante a realização deste trabalho.

À Embrapa Agrobiologia – Seropédica/RJ, em especial ao pesquisador João Paulo Guimarães Soares, pelo empréstimo dos animais utilizados neste estudo.

Aos amigos do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio da Sanidade Animal do Convênio UFRRJ/ Embrapa, Bruna de Azevedo Baêta, Jenevaldo Barbosa da Silva, Matheus Dias Cordeiro, Nathalie Costa da Cunha e Rafaella Câmara Teixeira pelo auxílio indispensável durante toda a fase experimental deste trabalho. Ao Daniel da Silva Guedes Júnior, Fábio Jorge Moreira da Silva, Fabíola do Nascimento Corrêa, Jania Resende, Raquel da Silva Lisboa, Renata Kazuco Sakai, Rômulo Zanesco e Vanessa de Almeida Raia, por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Alessandra Scofield Amaral, Carlo José Freire de Oliveira, Cátia Marques da Costa e Renata Cunha Madureira, pessoas fundamentais durante minha iniciação científica.

Aos funcionários da Fazendinha Agroecológica, em especial Clemir Barros da Conceição, Edson Carlos Pacheco de Oliveira, Marco Antônio de Aquino e Misael Soares, pelo auxílio na manutenção dos animais.

À Prof^a. Marília Massard da Fonseca, pela forma gentil com que sempre nos recebeu em sua casa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias com todo seu corpo docente e discente.

Aos grandes amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Gisele Santos Meireles, Guilherme Rodrigues Brito, Patrícia Barizon Cepeda e Tatiane Kawamura de Almeida pelas horas de estudo e de descontração compartilhadas.

Aos grandes amigos que conviveram comigo desde que cheguei à Universidade Rural, Allan Karl Zubiate, Carlos Augusto Furtado da Cunha, Diogo Mendes de Paiva, José Fausto Guimarães Silva, Flávia de Azevedo Campos Lucindo e Fernanda Fátima Delgado de Almeida.

Aos amigos da turma de Medicina Veterinária 2002 – I da UFRRJ, Camila de Carvalho Ramiro, Camilla Pedreira da Silva, Daniela Correa de Barros, Fernanda Gomes Castelan, Helio Oliveira Neves, Luis Gustavo Velloso de Paiva e Priscilla Aguiar de Paula.

Aos animais que mesmo sem escolha contribuíram para a realização deste estudo.

À UFRRJ pela acolhida durante o curso de Graduação e de Mestrado, a minha gratidão.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o período de Mestrado.

MEU MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Charles Passos Rangel, filho de José Bodart Rangel e Gilda Ribeiro Passos, nasceu em 20 de Outubro de 1980, no município de Guarapari, Estado do Espírito Santo, onde cursou o ensino fundamental e médio no Colégio Cenecista Doutor Roberto Calmon, concluído em 1998.

No ano de 2002, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médico Veterinário em 05 de Março de 2007.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Participou de 27 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas e indexadas e em congressos e eventos científicos nacionais.

Foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq de Agosto 2003 a Fevereiro de 2007, junto a projetos de pesquisa na área de alimentação artificial e mecanismos de transmissão de bioagentes por carrapatos, no Laboratório de Doenças Parasitárias, localizado no prédio do Projeto de Sanidade Animal convênio UFRRJ/EMBRAPA.

Em março de 2007 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Parasitologia Veterinária, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi Bolsista da CAPES. Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

RESUMO

RANGEL, Charles Passos. **Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) por meio de tubos capilares.** 2008. 34p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Alimentação artificial é uma ferramenta importante, por constituir opção para minimizar o uso de animais na experimentação científica propiciando estudo da transmissão de bioagentes na ausência do hospedeiro vertebrado. Os objetivos deste estudo foram alimentar artificialmente, por meio de tubos capilares, fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* previamente alimentadas em bovinos e verificar a influência da técnica, nos aspectos biológicos da fase não-parasitária desta espécie. Fêmeas pesando entre 40,6 e 69,7 miligramas foram separadas em quatro grupos de peso homogêneo, com 10 fêmeas cada e fixadas em bandejas de isopor com auxílio de fita dupla face. Para alimentação artificial, tubos de microhematócrito contendo sangue bovino citratado foram posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos. Os grupos foram alimentados por 6, 12, 24, 36 horas, sendo mantidos em estufa, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade superior a 80%. Após alimentação artificial, os carrapatos foram pesados para verificação da ingestão de sangue. Para acompanhamento dos aspectos biológicos, os carrapatos foram fixados em placas de Petri, e incubados nas mesmas condições de temperatura e umidade descritas acima. O grupo controle foi formado a partir de fêmeas ingurgitadas oriundas de bovinos infestados experimentalmente, mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade dos grupos alimentados artificialmente. Para análise estatística utilizou-se análise de variância e teste de Tukey com nível de significância 5%, para comparações das médias. Os pesos médios em miligrama adquiridos foram $12,33 \pm 15,17$; $33,41 \pm 21,27$; $67,53 \pm 27,57$; $79,47 \pm 45,53$ nos grupos 6, 12, 24, 36 horas, respectivamente. Os dois grupos expostos por menos tempo aos capilares apresentaram diferença estatística em relação ao ganho médio de peso do grupo de 36 horas. A partir de 24 horas de alimentação foi observada diferença significativa entre os aspectos biológicos dos grupos alimentados artificialmente, exceto para o período de postura. Embora as fêmeas alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares não tenham atingido ingurgitamento total, os resultados apresentados demonstram que a técnica não apresentou efeito deletério sobre os aspectos biológicos da espécie.

Palavras-chave: Ixodídeo, carrapato, alimentação *in vitro*

ABSTRACT

RANGEL, Charles Passos. **Artificial feeding of partially engorged female tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) through capillary tubes.** 2008. 34p. Dissertation (Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Artificial feeding is an important tool, as an option to minimize the use of animals in scientific experiments, providing study of the transmission of bioagentes in the absence of vertebrate host. The objectives of this study were artificially food through capillary tubes females partially engorged of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* previously fed on cattle and to check the influence of the technique in the biological aspects of non-parasitic phase this species. Females weighing between 40,6 and 69,7 milligrams were separated into four groups of homogeneous weight, with 10 females in each and set on trays of styrofoam with double-sided tape. For artificial feeding tubes of microhematocrit containing blood citrated cattle were placed on the apparatus mouthpiece of ticks. The groups were fed by six, 12, 24, 36 hours, being kept under temperature of 27 ± 1 ° C and humidity above 80%. After artificial feeding, the ticks were weighed to verify the ingestion of blood. To monitoring the biological aspects, the ticks were set in Petri dishes, and kept in the same controled temperature and humidity, describe above. The control group was formed by engorged females from cattle, being kept in the same conditions of temperature and humidity of the groups artificially fed. For statistical analysis was used variance analysis and Tukey's test with a significance level of 5%, for comparisons of means. The average weights acquired in milligrams were 12.33 ± 15.17 ; 33.41 ± 21.27 ; 67.53 ± 27.57 ; 79.47 ± 45.53 in groups 6, 12, 24, 36 hours, respectively. The two groups exposed for less time to capillaries, showed statistical difference compared with the gain average of weight of the group of 36 hours. From 24 hours of feeding was observed significant difference between the biological aspects of the groups artificially fed, except for the posture period. Although the females artificially fed through capillary tubes have not reached full engorgiment, the findings show that the technique did not presented deleterious effect on the biological aspects of this species.

Key words: Ixodídeo, tick, *in vitro* feeding

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Avaliação do ganho médio de peso em fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas.....	16
Tabela 2. Aspectos biológicos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares, durante 6, 12, 24 e 36 horas e grupo controle.....	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fixadas em bandeja de isopor durante o processo de alimentação artificial por meio de tubos capilares..... **13**
- Figura 2.** Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares. **A, B, C, e D**, fêmeas 7, 8 e 9 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* após 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente..... **17**
- Figura 3.** Diagrama da dispersão de pontos e reta ajustada, equação de ajuste e coeficiente de correlação do ganho de peso das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas..... **19**
- Figura 4.** Ritmo médio de postura de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtido pelas fêmeas alimentadas artificialmente nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas e grupo controle..... **23**
- Figura 5.** Diagrama da dispersão de pontos e reta ajustada, equação de ajuste e coeficiente de correlação do peso (mg) das fêmeas e peso (mg) das posturas..... **25**

SUMÁRIO

CONTEÚDO	Páginas
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Técnicas de alimentação artificial de carrapatos.....	3
2.1.1 Alimentação artificial por meio de tubos capilares.....	3
2.1.2 Alimentação artificial através de membranas naturais.....	4
2.1.3 Alimentação artificial através de membranas artificiais.....	6
2.2 Aspectos biológicos de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> mantidas em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar igual ou superior a 80%.....	7
2.2.1 Peso da fêmea ingurgitada.....	7
2.2.2 Período de pré-postura.....	8
2.2.3 Período de postura.....	8
2.2.4 Peso da postura.....	8
2.2.5 Peso da quenógina.....	9
2.2.6 Perda de peso da fêmea.....	9
2.2.7 Índice de produção de ovos.....	9
2.2.8 Índice de eficiência nutricional.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Procedência da colônia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	11
3.2 Manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em laboratório.....	11
3.3 Obtenção e manutenção dos animais.....	11
3.4 Infestação artificial dos bovinos.....	11
3.5 Alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	11
3.6 Coleta de fêmeas ingurgitadas do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> alimentadas em bovinos - grupo controle.....	12
3.7 Avaliação dos aspectos biológicos da fase não-parasitária de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
3.7.1 Peso das fêmeas ingurgitadas.....	12
3.7.2 Período de pré-postura.....	12
3.7.3 Período de postura.....	12
3.7.4 Peso da postura.....	14
3.7.5 Peso da quenógina.....	14

3.7.6 Perda de peso da fêmea.....	14
3.7.7 Índice de produção de ovos.....	14
3.7.8 Índice de eficiência nutricional.....	14
3.8 Análise estatística.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Alimentação artificial de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> parcialmente ingurgitadas.....	15
4.2 Aspectos biológicos da fase não-parasitária de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	18
4.2.1 Peso das fêmeas ingurgitadas.....	21
4.2.2 Período de pré-postura.....	21
4.2.3 Período de postura.....	21
4.2.4 Peso da postura.....	22
4.2.5 Peso da quenógina.....	22
4.2.6 Perda de peso da fêmea.....	22
4.2.7 Índice de produção de ovos.....	24
4.2.8 Índice de eficiência nutricional.....	24
4.2.9 Análise de regressão entre peso das fêmeas após a alimentação artificial e o peso das posturas.....	24
5 CONCLUSÕES.....	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) é uma espécie de carrapato amplamente distribuída nos países de clima tropical, sendo encontrada naturalmente parasitando bovinos. Além destes, há relatos de outras espécies animais atuando como hospedeiros alternativos, entre elas eqüídeos, pequenos ruminantes, canídeos, felídeos, animais silvestres e seres humanos. Este carrapato apresenta importância econômico-sanitária por causar danos diretos aos animais e atuar como vetor de diferentes patógenos. Os prejuízos causados por esse carrapato à pecuária brasileira superam dois bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2002).

Estudos envolvendo o carrapato *R. (B.) microplus* em laboratório apresentam custo elevado em decorrência da necessidade de infra-estrutura, manutenção dos animais e mão-de-obra especializada. Além disso, a comunidade científica, preocupada com questões relacionadas à ética, vem estimulando cada vez mais a diminuição do uso de animais na experimentação científica e a adoção de métodos alternativos. Neste contexto, a alimentação artificial é uma ferramenta importante por possibilitar a análise dos aspectos biológicos e a avaliação da eficiência de *R. (B.) microplus* como vetor, além de tornar possível a redução do número de animais de laboratório necessários em pesquisas que envolvam a transmissão de bioagentes.

A manutenção de artrópodes *in vitro* tem sido útil em pesquisas envolvendo a sensibilidade e a resistência de carrapatos aos acaricidas sistêmicos, reduzindo gastos econômicos e na determinação da concentração mínima de um patógeno para infectar artrópodes. No estudo dos componentes da saliva de carrapatos, possibilita a elucidação de estruturas biologicamente ativas secretadas que podem levar ao desenvolvimento de novas drogas. Ensaios *in vitro* também são utilizados para realização de estudos sobre a dinâmica da transmissão de patógenos, sem levar em conta as interações parasito-hospedeiro, e para investigação e determinação de substâncias fago-estimulantes e das exigências nutricionais de artrópodes (KRÖBER; GUERIN, 2007).

As diferentes estratégias de alimentação observadas nas famílias Ixodidae e Argasidae determinam as dificuldades inerentes ao estabelecimento de protocolos alternativos para a manutenção destes artrópodes em laboratório. Os carrapatos ixodídeos necessitam de maior tempo de fixação e de uma série de reações do hospedeiro para o seu ingurgitamento, enquanto que os argasídeos se alimentam em poucos minutos e causam reações de menor intensidade no hospedeiro. Desta maneira, os ixodídeos destacam-se como o grupo de carrapatos que apresenta menor progresso quanto ao desenvolvimento de um sistema de alimentação artificial, capaz de atender as suas exigências.

Muitas tentativas de alimentação e/ou infecção artificial de carrapatos com bioagentes vêm sendo conduzidas utilizando-se tubos capilares, membranas naturais e artificiais (BURGDORFER, 1957; KEMP et al., 1975). No Brasil, estudos referentes à alimentação artificial de carrapatos obtiveram êxito com o uso de tubos capilares e membranas artificiais (MOURA et al., 1997; ABEL, 1999; FONSECA et al., 1999; ABEL, 2004;).

Na literatura internacional, são encontrados diversos registros de alimentação artificial de estágios imaturos e de adultos jovens do carrapato *R. (B.) microplus* (PIERCE; PIERCE, 1956; KEMP et al., 1975; WALKER et al., 1979; DE LA VEGA et al., 2000). No entanto, poucos estudos têm sido realizados com intuito de avaliar a influência desta técnica sobre o ganho de peso e os aspectos biológicos deste carrapato. Assim sendo, o presente estudo objetivou alimentar fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus* por meio de tubos capilares e descrever os aspectos biológicos da fase não-parasitária desta espécie. Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa mais ampla, em desenvolvimento no

Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que visa aperfeiçoar os sistemas de alimentação artificial de carrapatos e obter dados sobre a biologia das espécies de carrapatos alimentadas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Técnicas de alimentação artificial de carrapatos

2.1.1 Alimentação artificial por meio de tubos capilares

A técnica que utiliza tubos capilares foi descrita pela primeira vez por Chabaud (1950), para alimentação artificial dos carrapatos *Hyalomma excavatum*, *Hyalomma dromedarii*, *Dermacentor reticulatus* e *Rhipicephalus sanguineus*. Desde então, outras espécies de ixodídeos foram alimentadas e/ou infectadas através desta técnica (BURGDORFER, 1957; PURNELL; JOYNER, 1967; WALKER et al., 1979; LÖSEL et al., 1993; GERN et al., 1990; DE LA VEGA et al., 2000; KOCAN et al., 2005). O único relato bem sucedido da utilização de microcapilares para alimentar e infectar carrapatos argasídeos foi realizado por Rau; Hannoun (1968).

A utilização da alimentação artificial por meio de tubos capilares apresenta vantagens frente às demais técnicas de alimentação *in vitro* devido ao seu baixo custo financeiro e por permitir melhor segurança no manuseio dos microrganismos, quando é empregada em estudos envolvendo transmissão de patógenos (BROADWATER et al., 2002). Além disso, possibilita expor carrapatos a agentes patogênicos, sem a utilização de hospedeiros infectados e fornece aos carrapatos uma variada fonte de alimentação para fins experimentais. Walker et al. (1979) utilizaram sangue total citratado na infecção de *Rhipicephalus appendiculatus* por *Theileria parva*. Outros autores optaram por utilizar sangue total desfibrinado (DE LA VEGA et al., 2000), heparinizado (RAU; HANNOUN, 1968; DE LA VEGA et al., 2000) ou com EDTA (KOCAN et al., 2005), plasma (JOYNER; PURNELL, 1968), soros de animais (JOYNER; PURNELL, 1968; LÖSEL et al., 1993; REHAV et al., 2000; ALMAZÁN et al., 2005) e meios de cultura contendo patógenos (BURGDORFER, 1957; GERN et al., 1990; ABEL, 1999; MACALUSO et al., 2001; BROADWATER et al., 2002; SONENSHINE et al., 2002; KOCAN et al., 2005).

A fonte de alimentação, assim como o tempo de exposição aos capilares pode variar de acordo com os objetivos do estudo e a espécie de carrapato analisada. Na alimentação artificial de fêmeas de *Boophilus microplus* recém mudadas o período de exposição aos capilares foi de 35 minutos (DE LA VEGA et al. 2000). Em 2004, Abel trabalhando com a alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas do carrapato *Amblyomma cajennense* observou uma ingestão significativa de sangue a partir de seis dias para fêmeas inicialmente em jejum e de seis horas para fêmeas previamente alimentadas em coelhos.

A metodologia empregada em muitos trabalhos consiste em fixar os carrapatos em placas de Petri ou em lâminas de microscopia com a face ventral voltada para cima, com auxílio de plasticina ou fita dupla face (BURGDORFER, 1957; RAU; HANNOUN, 1968; KOCAN et al., 2005). Estudos realizados no Brasil alcançaram êxito com a utilização de bandejas de isopor para a fixação dos carrapatos (ABEL, 2004; CUNHA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006).

Ainda não existem relatos sobre a obtenção de espécimes completamente ingurgitados utilizando-se a técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares. Para a realização desta técnica os carrapatos necessitam passar por uma prévia alimentação, até atingirem a fase rápida de alimentação (BROADWATER et al., 2002; ABEL, 2004; KOCAN et al., 2005). Ou então, são expostos ainda em jejum aos capilares e em seguida retornam aos hospedeiros para completarem seu ingurgitamento (BURGDORFER, 1957; WALKER et al., 1979; DE LA VEGA et al., 2000; ABEL, 2004).

O uso de capilares foi empregado no estudo da transmissão de *Leptospira pomona* por *Amblyomma maculatum*, bem como, de *Dermacentor andersoni* como um possível vetor da

raiva, por Burgdofer (1957). Ainda, Purnell; Joyner (1967); Purnell (1970); Walker et al., (1979) estudaram diferentes aspectos da transmissão da *T. parva* por *R. appendiculatus* com a utilização desta técnica.

Nos estudos sobre a transmissão de *Borrelia burgdorferi*, a técnica de tubos capilares foi usada para infectar os carrapatos *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *I. loricatus*, *I. pacificus* e *I. scapularis* (MONIN et al., 1989; GERN et al., 1990, 1991; HU et al., 1992; TOUTOUNGI; GERN, 1993; LI; LANE, 1996; HU et al., 1996; ABEL, 1999; BROADWATER et al., 2002). Rechav et al. (1999); Macaluso et al., (2001); Kocan et al., (2005) também empregaram a mesma técnica para infectar *Ehrlichia chaffeensis* e outras rickettsias como *Anaplasma marginale*, *Rickettsia montana* e *R. rhipicephali*, no carrapato *D. variabilis*.

Os microcapilares têm sido utilizados no estudo das propriedades antigênicas e do conteúdo de prostaglandinas E2 da saliva dos carrapatos (BENAVIDES; WALKER, 1992; INOKUMA et al., 1994), e na avaliação da resistência de bovídeos e coelhos ao carrapato *R. appendiculatus* (LÖSEL et al., 1993). Almazán et al. (2005) alimentaram artificialmente o carrapato *I. scapularis* por meio de tubos capilares para a detecção de antígenos capazes de induzir uma resposta vacinal a várias espécies de carrapatos.

Existem controvérsias com relação a introdução dos palpos no interior do capilar. Purnell; Joyner (1967) observaram que a presença ou ausência dos palpos no interior do capilar não modificou a capacidade de alimentação de *R. appendiculatus*. Joyner; Purnell (1968); Rau; Hannoun (1968); Abel (1999); Macaluso et al. (2001); Broadwater et al. (2002); Sonenshine et al. (2002); Abel (2004) inseriram todas as peças bucais dos carrapatos no interior do capilar. Enquanto, Chabaud (1950); Jasinskas et al. (2000); Rechav et al. (2000) e Soares et al. (2005) deixaram os palpos fora dos capilares.

A simplicidade da técnica de tubos capilares é de fundamental interesse em estudos que visam à infecção de estágios imaturos de carrapatos, pois é menos invasiva do que outros métodos de infecção como, por exemplo, a injeção percutânea (KOCAN et al., 1986; POLLACK et al., 1991; GERN et al., 1996; REHAV et al., 1999; BROADWATER et al., 2002).

2.1.2 Alimentação artificial através de membranas naturais

Chumakov et al. (1945 apud ABBASSY, et al., 1994), registraram a primeira tentativa de alimentar carrapatos através de membranas naturais. Em 1977, Mango; Galun conseguiram completar o ciclo biológico do carrapato *Ornithodoros moubata* em laboratório, utilizando membranas preparadas a partir de asas de morcego.

A alimentação artificial de carrapatos da família Argasidae em membranas naturais tem sido utilizada com sucesso em laboratório (HABEDANK; HIEPE, 1993). No entanto, quando se trata de carrapatos ixodídeos maiores dificuldades são observadas em decorrência de deterioração da membrana e contaminação do sangue, devido ao longo período de alimentação necessário ao ingurgitamento dessas espécies.

Devido a complexidade deste modelo de alimentação, poucos estudos têm sido realizados *in vitro* utilizando membranas para a alimentação e/ou infecção desses vetores, (JOYNER; PURNELL, 1968; KEMP et al., 1975; WETZEL, 1979; KUHNERT et al., 1995; MOURA et al., 1997). A utilização de membranas biológicas na alimentação de carrapatos nem sempre tem sido capaz de permitir a fixação e a ingestão de sangue por carrapatos (LANGLEY, 1969). Chabaud (1950) apontou como outras desvantagens desta técnica de alimentação *in vitro* as complicações quanto ao preparo das membranas. Além do alto custo empregado para impedir a decomposição e contaminação destas (KRÖBER; GUERIN, 2007).

Entre os relatos de aplicação da alimentação artificial de carrapatos através de membranas naturais inclui-se a membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (BURGDORFER; PICKENS, 1954; PIERCE; PIERCE, 1956; HOOD et al., 1976),

membranas de asa de morcego (MANGO; GALUN, 1977), pele de coelhos (TAWFIC; GUIRGIS, 1969; HOWARTH; HOKAMA, 1983; VOIGT et al., 1993; MUSYOKI et al., 2004; BONNET et al., 2007), mesentério e pele de bovinos (KEMP et al., 1975; VOIGT et al., 1993), camundongos (HOWARTH; HOKAMA, 1983; BURKOT et al., 2001), gerbis (BONNET et al., 2007), suínos (OSBORNE; MELLOR, 1985) e aves (TAWFIC; GUIRGIS, 1969; UCHIKAWA, 1976; OSBORNE; MELLOR, 1985; ABBASSY, et al., 1994).

A membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha foi empregada com sucesso na alimentação, em laboratório, dos carrapatos *Ornithodoros moubata*, *O. turicata*, *O. parkeri*, *O. hermsi*, porém o mesmo não foi observado para o carrapato *Argas reflexus* (BURGDORFER; PICKENS, 1954). Membrana semelhante foi utilizada no ingurgitamento de larvas de *B. microplus* (PIERCE; PIERCE, 1956) e na manutenção de colônias de *O. moubata* (HOOD et al., 1976). Em trabalho envolvendo a transmissão de patógenos cultivados em ovos, Burgdorfer; Pickens (1954) conseguiram infectar os carrapatos *O. moubata* e *O. turicata* com *Coxiella burnetti*, *Bacterium tularensis*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* e o vírus da encefalopatia equina do oeste.

A membrana da asa de morcego foi empregada na manutenção *in vitro* do ciclo de *O. moubata* (MANGO; GALUN, 1977). Avaliando dois tipos de membranas naturais na alimentação de *A. arboreus*, Tawfic; Guirgis, (1969) observaram que os carrapatos não se alimentaram através de membranas de ceco e pele de coelhos, mas obtiveram bons resultados quando os carrapatos foram expostos a membranas de englúvio e pele de aves. Howarth; Hokama (1983) utilizaram pele de coelho e camundongo na transmissão de *A. marginale* por *D. andersoni*. Voigt et al., (1993) utilizaram com sucesso membrana de pele de coelho na manutenção, em laboratório, dos carrapatos *A. variegatum* e *O. savignyi*. Na utilização de membranas provenientes de pele de coelhos para alimentar e infectar o estágio adulto do carrapato *R. appendiculatus*, Musyoki et al. (2004) observaram que o peso e a taxa de infecção dos carrapatos alimentados artificialmente não diferiu dos carrapatos alimentados sobre bovinos. Bonnet et al. (2007), a fim de reproduzir *in vitro* a parte do ciclo do parasita *Babesia divergens* que ocorre no vetor, realizaram a infecção experimental de *I. ricinus*, utilizando a técnica de alimentação artificial através de membrana de pele de gerbil e de coelho.

A partir de membrana proveniente de pele bovina, Kemp et al. (1975), observaram o ingurgitamento de larvas de *B. microplus*. Este tipo de membrana foi empregado no estudo da transmissão de *T. mutans* e *Cowdria ruminantium* por *A. variegatum* (VOIGT et al., 1993). Burkot et al. (2001) infectaram com êxito carrapatos adultos de *I. scapularis*, com *B. burgdorferi*, através de alimentação artificial em membrana de camundongo. Em 1976, Uchikawa conseguiu alimentar o argasídeo *A. japonicus* através de membrana oriunda de pele de galinha. O mesmo trabalho tentou sem sucesso a transmissão *in vitro* do vírus da encefalite japonesa.

A fonte de alimentação pode ser meio de cultura (KEMP et al., 1975), papa de hemácias (HOWARTH; HOKAMA, 1983), sangue total (UCHIKAWA, 1976; ABEL, 1999) sangue desfibrinado, heparinizado ou citratado (TAWFIK, GUIRGIS, 1969; UCHIKAWA, 1976; MANGO; GALUN, 1977; OSBORNE; MELLOR, 1985; BONNET et al., 2007) e sangue desfibrinado associado a meio de cultura e patógenos (BURKOT et al., 2001). Estas fontes necessitam de troca periódica e aquecimento, para promover aos carrapatos condições adequadas para sua fixação à membrana e posterior ingestão da fonte de alimentação oferecida.

Geralmente, utilizam-se chapas aquecedoras, (MANGO; GALUN, 1977), ou estufas incubadoras (VOIGT et al., 1993; BONNET et al., 2007), para manutenção da temperatura deste sistema de alimentação artificial. Fatores como umidade relativa e concentração de gás carbônico também podem ser trabalhados, objetivando melhores resultados na utilização de

membranas naturais para a alimentação artificial de carrapatos (KEMP et al., 1975; VOIGT et al., 1993).

No caso da alimentação e/ou infecção de carrapatos ixodídeos é necessário também à adição de antimicrobianos devido ao longo período de alimentação necessário (KEMP et al., 1975; VOIGT et al., 1993; MUSYOKI, et al., 2004; BONNET et al., 2007).

2.1.3 Alimentação artificial através de membranas artificiais

Embora os carrapatos argasídeos apresentem boa adaptação a esta técnica de alimentação artificial, alcançando com êxito o ingurgitamento quando expostos a diferentes tipos de membranas artificiais (DE MEILLON; GOLDBERG, 1967), os carrapatos ixodídeos não são igualmente induzidos, devido à dificuldade de se estabelecer superfícies artificiais que apresentem os estímulos adequados à fixação e à alimentação desses carrapatos.

Os primeiros estudos da utilização de membranas artificiais para a manutenção e/ou infecção de artrópodes empregaram membranas de parafilme (HADDON, 1956). Mas, com o desenvolvimento deste sistema de alimentação outros materiais também foram utilizados, como por exemplo, membranas de celofane (TAWFIC; GUIRGUIS, 1969), náilon (TAWFIC; GUIRGUIS, 1969), látex (KIRCH et al., 1991), silicone (OSBORNE; MELLOR, 1986; HABEDANK; HIEPE, 1993; MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999) e brauduche (WALLADE et al., 1991, 1993, 1995).

A membrana de parafilme tem sido utilizada para manutenção em laboratório do carrapato, *O. moubata*, na ausência do hospedeiro vertebrado (HABEDANK; HIEPE, 1993; HABEDANK et al., 1994). Kirch et al. (1991) utilizaram membrana semelhante no estudo da morfologia das hemácias de bovinos sofrendo digestão *in vivo* no intestino de *O. concanensis*. As membranas deste material são à prova d'água, semitransparentes, inodoras, insípidas e flexíveis. Em geral, a face da membrana onde os carrapatos são expostos é recoberta por uma camada fina de pêlo (HOKAMA et al., 1987).

Utilizando membranas naturais e artificiais para a alimentação do argasídeo *A. arboreus*, Tawfic; Guirguis, (1969) desenvolveram um sistema de alimentação *in vitro* através de membranas de celofane e náilon, mas não obtiveram sucesso. A membrana de látex foi desenvolvida a partir de pedaços de luvas cirúrgicas por Kirch et al. (1991) para a alimentação de ninfas do carrapato *O. concanensis*, sendo obtido um pequeno percentual de ninfas alimentadas.

A utilização de membranas artificiais, pela praticidade e fácil obtenção do material, parece ser mais adequada para alimentação artificial de carrapatos. Melhores resultados foram obtidos com as membranas de silicone e baudruche, por permitirem melhor fixação, ingurgitamento, desprendimento, oviposição e muda de diferentes fases da vida de diferentes espécies de carrapatos.

Segundo Burg et al. (1993) a membrana de silicone oferece vantagens em relação às demais membranas artificiais pelo baixo custo do material necessário para sua confecção, por não permitir o refluxo sangüíneo, ser reutilizável, autoclavável e a textura de sua superfície poder ser modificada de acordo com as exigências do artrópode a ser alimentado. A membrana de silicone já foi utilizada na manutenção em laboratório dos carrapatos *O. moubata*, *A. cajennense*, *A. (Persicargas) miniatus*, *D. nuttalli*, *H. excavatum*, *I. holocyclus* (STONE et al., 1983; OSBORNE; MELLOR, 1986; HABEDANK; HIEPE, 1993; HABEDANK et al., 1994; MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999). Kuhnert et al. (1995) ao utilizar a mesma membrana conseguiram manter artificialmente, todo o ciclo de vida de *A. hebraeum* em laboratório. Esta membrana apresenta uma de suas faces completamente lisa com as fibras do tecido passando por baixo da superfície, enquanto que no lado oposto as fibras do tecido se projetam imediatamente acima da superfície, resultando numa superfície que se assemelha à textura da pele natural, sendo desnecessária a utilização

de pêlos como estímulo tátil. No sistema de alimentação artificial, esta face fica voltada para o recipiente onde estará o carrapato, enquanto que a face lisa fica em contato com o sangue. Essas membranas podem ser utilizadas sucessivas vezes, desde que lavadas com água e detergente neutro e autoclavadas (FONSECA et al., 1999).

O dispositivo de alimentação artificial de carrapatos que utiliza membranas modificadas de Baudruche foi desenvolvido por (WALLADE et al., 1991) na alimentação de *R. appendiculatus*. Esta membrana foi produzida a partir de componentes naturais voláteis e solúveis do intestino de bovinos; outros componentes utilizados foram algodão hidrófilo e pêlo de coelho, que funcionam como estímulos táteis adicionais. A superfície da membrana sobre a qual os carrapatos ficam expostos é reforçada e tornada áspera por adição de camadas finas de algodão hidrófilo e pêlo de coelho. A técnica que utiliza membrana de Baudruche pode ser utilizada para alimentação artificial de várias espécies de carrapatos, com as devidas modificações necessárias as exigências de cada espécie. Esta membrana foi utilizada na manutenção de *R. appendiculatus* em laboratório e no estudo da transmissão de *T. parva* por este carrapato (WALLADE et al., 1991, 1993, 1995).

De la Vega et al. (2004) desenvolveram um sistema automático de alimentação de carrapatos através de membrana confeccionada a partir de papel, reforçado com uma solução de silicone. O sistema foi capaz de trabalhar automaticamente por mais de três semanas, sendo obtidas fêmeas parcialmente ingurgitadas dos carrapatos *B. microplus* e *A. cajennense*.

Como fontes de alimentação foram utilizados nesses sistemas papa de hemácias (HOKAMA et al., 1987), soro fetal bovino (HOKAMA et al., 1987), solução de glutathione (HOKAMA et al., 1987), meio de cultura (STONE et al., 1983; HOKAMA et al., 1987), salina (HOKAMA et al., 1987) e sangue total desfibrinado ou com anticoagulante (STONE et al., 1983; OSBORNE; MELLOR, 1986; KIRCH, et al., 1991; WALLADE et al., 1991, 1993, 1995; HABEDANK; HIEPE, 1993; HABEDANK et al., 1994; KUHNERT et al., 1995; MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999; DE LA VEGA et al. 2004).

A adição de antibióticos e de fungicidas a fonte de alimento reduz consideravelmente a mortalidade de carrapatos. Técnicas de esterilização devem ser usadas no tratamento da fonte de alimento empregado em sistemas que utilizam membranas artificiais. Desta maneira, as membranas podem ser reaproveitadas por um período maior desde que autoclavadas (OSBORNE; MELLOR, 1986; WALADDE et al., 1991; HABEDANK; HIEPE, 1993; KUHNERT et al., 1995).

Para utilização de membranas artificiais são muitas vezes necessários estímulos táteis adicionais, sob a forma de algodão, lã, fibra de poliéster, cabelo sintético ou de pêlos de coelho aplicados a sua superfície; ou estímulos olfatórios fornecidos por lavados de orelha de bovinos e penas de aves, excretas de carrapatos e secreções do animal doador (HOKAMA et al., 1987; WALADDE et al., 1991, 1993; WALADDE; OCHIENG, 1992; HABEDANK; HIEPE, 1993; HABEDANK et al., 1994; MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999; DE LA VEGA et al. 2004).

2.2 Aspectos biológicos de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mantidas em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar igual ou superior a 80%

2.2.1 Peso da fêmea ingurgitada

Na Austrália, Hitchcock (1955) e Sutherst et al. (1978) ao estudarem os aspectos biológicos da fase não-parasitária do carrapato *B. microplus* encontraram fêmeas ingurgitadas com peso médio variando de 213 a 246mg. Davey et al. (1980) buscando melhor compreensão sobre os aspectos biológicos deste carrapato observaram peso médio de 449mg para as fêmeas ingurgitadas, mantidas em laboratório.

Em estudos preliminares sobre a oviposição e sazonalidade do carrapato *B. microplus* Costa (1982) observou, em laboratório, fêmeas ingurgitadas com peso médio de 223,3mg. Enquanto Davey et al. (1984) encontraram valores de peso mínimo de 259 ± 36 mg e máximo de 387 ± 73 mg para fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. No mesmo ano, Benavides (1984) obteve fêmeas ingurgitadas com peso médio de 245,5mg ao infestar artificialmente bovinos. Em 1990, Bittencourt em infestações de bovinos com larvas de *B. microplus* de origem bovina coletou fêmeas ingurgitadas com peso médio de 258,2mg. Semelhante ao peso médio de 256,4mg encontrado por Barreira (2001), em fêmeas de *B. microplus* não infectadas com *B. bovis* e *B. bigemina*.

Recentemente, De la Vega et al (2007) comparando a diferença no peso de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* do Brasil e de Cuba relataram peso médio de 258, 7mg para carrapatos provenientes do Brasil e de 233,9mg para os carrapatos de Cuba.

2.2.2 Período de pré-postura

Este período corresponde ao número de dias entre o desprendimento natural da fêmea do hospedeiro, até o seu primeiro dia de postura (HITCHCOCK, 1955; RIEK, 1965; BENNETT, 1974).

Em condições de laboratório, Davey et al. (1980) registraram um período médio de pré-postura de 3,0 dias, com variação de 3,0 a 3,2 dias, posteriormente, estes mesmos autores encontraram um período de pré-postura variando de 2,0 a 6,0 dias (DAVEY et al.,1984). Avaliando o nível de resistência de bovinos ao carrapato *B. microplus*, Meléndez et al. (1998), verificaram um período de pré-postura variando de 2,0 a 4,0 dias.

Posteriormente, Costa (1982); Magalhães (1989); Bittencourt (1990) e Furlong (1990) relataram períodos de pré-postura de 4,17; 7,0; 2,8 e 3,27 dias respectivamente, em condições experimentais. Glória et al. (1993) comparando a biologia da fase não-parasitária de duas cepas de *B. microplus* utilizando diferentes temperaturas observaram que a 27 ± 1 °C e umidade relativa do ar de $80 \pm 10\%$ a duração do período de pré-postura foi de 2,91 dias em média, para fêmeas sensíveis a carrapaticida e 2,73 dias para fêmeas resistentes à carrapaticida. Barreira (2001) relatou um período médio de pré-postura de 2,29 dias, em carrapatos livres de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*.

2.2.3 Período de postura

Segundo Hitchcock, (1955); Gonzales et al., (1975) o período de postura corresponde ao intervalo de dias entre o início e final da postura.

A partir de infestações experimentais em bovinos Davey et al. (1980) detectaram um período de postura de 17,2 dias, variando entre 12 e 21 dias, com pico de postura no terceiro dia. Costa (1982) demonstrou período médio de postura de sete dias, valor inferior ao observado por Magalhães (1989) que constatou um período médio variando entre 11 e 14 dias. Bittencourt (1990) encontrou período médio de postura de 11,1 dias para fêmeas de *B. microplus* provenientes de infestações de bovinos com larvas de origem bovina.

Avaliando o efeito de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não-parasitária de *B. microplus*, Glória et al. (1993) verificaram um período médio de postura de 12,36 dias para fêmeas sensíveis a carrapaticida e 11,06 dias para fêmeas resistentes à carrapaticida, quando mantidas à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa do ar de $80 \pm 10\%$. Barreira (2001) observou período médio de postura entre 23,3 e 35 dias.

2.2.4 Peso da postura

Ao estudar os aspectos biológicos da fase não-parasitária de *B. microplus* em cinco áreas geográficas do México Davey et al. (1984) observaram posturas viáveis com peso variando de 167 ± 46 mg a 114 ± 36 mg para fêmeas não adaptadas e 215 ± 51 mg para fêmeas

adaptadas. Benavides (1984) encontrou peso médio de postura de 245,5mg em fêmeas oriundas de infestação artificial de bovinos.

Bittencourt (1990) observou peso médio de postura de 151,0mg para fêmeas de *B. microplus* de origem bovina, enquanto, Furlong (1990) ao avaliar o comportamento de *B. microplus* em infestações simultâneas ou consecutivas com *A. cajennense* encontrou massa de ovos média de 111,52mg. Glória et al. (1993) analisando a biologia da fase não-parasitária de fêmeas de *B. microplus* sob diferentes temperaturas, encontraram período médio de postura de 155,6mg para fêmeas sensíveis a carrapaticida e 140,08mg para fêmeas resistentes à carrapaticida. Meléndez et al. (1998) relataram um peso médio da postura de 231,1mg, variando de 179 a 233mg. Barreira (2001) pesando a postura de fêmeas de *B. microplus* não infectas por *B. bovis* e *B. bigemina* encontrou peso médio de 91,31mg.

2.2.5 Peso da quenógina

Furlong (1990) observou uma variação de 64,57 a 92,21mg no peso das quenóginas de *B. microplus*, provenientes de infestações simultâneas ou consecutivas com o carrapato *A. cajennense*.

Em condições experimentais, Glória et al. (1993) estudaram o comportamento biológico da fase não-parasitária de duas cepas do carrapato *B. microplus* e observaram peso médio das quenóginas de 63,6mg para as fêmeas resistentes a carrapaticida e de 69,8mg para as fêmeas sensíveis a carrapaticida.

Na investigação sobre o efeito da infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* sobre fêmeas de *B. microplus*, Barreira (2001) encontrou quenóginas com peso médio de 53,12mg, variando de 25,8 a 182,7mg, nos carrapatos livres de infecção.

2.2.6 Perda de peso da fêmea

Em condições controladas de laboratório, Costa (1982) realizou estudos preliminares sobre a oviposição e sazonalidade de *B. microplus*, observando perda média de peso das fêmeas de 69,51mg, com variação de 49mg a 84,98mg.

Ao realizar infestações concomitantes ou simultâneas dos carrapatos *B. microplus* e *A. cajennense* em bovinos mestiços Furlong (1990) encontrou perda de peso nas fêmeas de *B. microplus* variando de 153,13 a 228,96mg.

2.2.7 Índice de produção de ovos

Mantendo fêmeas de *B. microplus* em condições de laboratório, Davey et al. (1980) encontraram índice médio de produção de ovos de 57,95%, enquanto Costa (1982) encontrou um índice médio de 45,8%.

Nas observações realizadas por Benavides (1984) sobre os aspectos biológicos de *B. microplus*, verificou-se índice médio de produção de ovos de 48,5%, percentual inferior ao observado por Bittencourt (1990), que encontrou um índice médio de produção de ovos de 58,5% para fêmeas de *B. microplus* obtidas de bovinos infestados com larvas de origem bovina. Glória et al. (1993) verificaram um índice de produção de ovos de 58,18% para fêmeas sensíveis a carrapaticida e 58,07% para fêmeas resistentes à carrapaticida. Em 2001, Barreira relatou índice de produção de ovos de 41,87% para fêmeas não infectadas por *B. bovis* e *B. bigemina*.

2.2.8 Índice de eficiência nutricional

Nos Estados Unidos, Davey et al. (1980) relataram índice médio de eficiência nutricional de 56,5%, em infestações artificiais de bovinos.

Posteriormente, Furlong (1990) encontrou variação de 61,21 a 71,61% no índice de eficiência nutricional de fêmeas de *B. microplus*.

Barreira (2001) verificou índice médio de eficiência nutricional de 55,65% e uma variação de 5,82 a 69,70% em fêmeas livres de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência da colônia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Fêmeas de *R. (B.) microplus* foram coletadas cuidadosamente através de remoção direta por torção sobre o próprio eixo em bovinos pertencentes ao rebanho da Fazendinha Agroecológica – Convênio Embrapa/Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, situada a 22° 45' S, 43° 40' W, a uma altitude de 29 metros.

3.2 Manutenção da colônia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em laboratório

As fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coletadas foram levadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, do Instituto de Veterinária da UFRRJ, localizado no prédio do Projeto de Sanidade Animal (convênio Embrapa/UFRRJ), lavadas com água destilada, secas com papel filtro e identificadas segundo Aragão, Fonseca (1961); Barros-Battesti et al. (2006). Posteriormente, as fêmeas foram fixadas em placas de Petri, com auxílio de fita adesiva, para realização das posturas. Durante este período os carrapatos foram mantidos em estufa para Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D.), à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar superior a 80%.

Ao final da postura, os ovos foram pesados em balança analítica - Bioprecisa FA2104N, separados em alíquotas de 200mg em seringas descartáveis devidamente identificadas e vedadas com algodão hidrófilo. As seringas contendo os ovos foram incubadas sob as mesmas condições controladas de temperatura e umidade anteriormente citadas.

Observações diárias foram realizadas para estabelecer o dia de início da eclosão das larvas, o que tornou possível determinar a idade das larvas utilizadas para a infestação artificial dos bovinos.

3.3 Obtenção e manutenção dos animais

Os animais foram gentilmente cedidos pela Fazendinha Agroecológica convênio Embrapa/UFRRJ. Para realização das infestações experimentais foram utilizados dois bovinos girolandos.

Durante todo o período do experimento, os bovinos foram mantidos na Fazendinha Agroecológica, em uma baia de aproximadamente 30 m² com piso de cimento áspero e paredes de alvenaria.

Os animais foram alimentados com capim elefante (*Penisetum purpureum*) picado, ração peletizada, sal mineral e água “*ad libitum*”, durante todo o período do experimento. Diariamente, foi realizada limpeza da baia para remoção das sobras de capim, fezes e urina.

3.4 Infestações artificiais dos bovinos

Para a realização das infestações artificiais, seringas foram fixadas na altura da cernelha dos bovinos com auxílio de uma corda de nylon, por um período de duas horas. Cada bovino recebeu cinco seringas totalizando aproximadamente 20.000 larvas (1,0 grama de ovos), com 15 dias de eclodidas.

3.5 Alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O sistema de alimentação artificial por meio de tubos capilares foi conduzido conforme descrito por Abel (2004), com modificações.

Foi utilizado sangue coletado assepticamente da veia jugular de um bovino sadio em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante, na concentração de um mililitro de

citrato de sódio para nove mililitros de sangue. As amostras de sangue foram conservadas sob refrigeração a 4 °C, e aquecidas em banho-maria a 37 °C antes do preenchimento dos capilares. O período máximo de armazenamento do sangue foi de 24 horas.

Foram utilizadas fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. (B.) microplus* previamente alimentadas em bovinos por aproximadamente 20 dias. Após a coleta manual, as fêmeas foram transportadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias, lavadas com água destilada, secas com papel filtro e examinadas quanto à integridade do aparelho bucal com auxílio de lupa estereoscópica. Foram pesados 40 carrapatos com peso de 40 a 70 miligramas em balança analítica de e separados em quatro grupos (n=10) de peso homogêneo para serem submetidos à alimentação artificial por meio de tubos capilares, nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas.

Os carrapatos foram fixados em bandejas de isopor (24cm x 12cm), com auxílio de fita adesiva dupla face, com a região ventral voltada para cima. Em seguida, microcapilares sem anticoagulante, utilizados na determinação de hematócrito (75mm x 1,0mm x 1,5mm), repletos de sangue, foram dispostos sobre as peças bucais dos carrapatos (**Figura 1**). Durante o período de alimentação artificial, os microcapilares foram trocados a cada intervalo de 30 minutos e os grupos mantidos em estufa do tipo B.O.D., à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa superior a 80%.

Ao término dos referidos tempos de alimentação artificial, os tubos capilares foram removidos e os carrapatos foram lavados em água destilada para remoção do sangue ressecado e da fita adesiva que poderiam interferir no ganho de peso dos carrapatos. Para verificação da ingestão de sangue, as fêmeas foram pesadas com auxílio de balança analítica e, posteriormente, fixadas em placas de Petri para análise dos aspectos biológicos. Os carrapatos foram mantidos em estufa do tipo B.O.D. sob as mesmas condições controladas de temperatura e umidade acima mencionadas.

3.6 Coleta de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentadas em bovinos – grupo controle

No 21º dia após a infestação artificial dos bovinos, 10 fêmeas ingurgitadas oriundas de queda natural foram coletadas, lavadas, pesadas e fixadas em placa de Petri para formação do grupo controle, tendo permanecido sob as mesmas condições de temperatura e umidade relativa dos grupos alimentados artificialmente.

Além do peso inicial das fêmeas ingurgitadas, foram determinados os aspectos biológicos da fase não-parasitária, conforme será descrito no item 3.7.

3.7 Avaliação dos aspectos biológicos da fase não-parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Foram realizadas observações diárias para a verificação de aspectos referentes à fase não-parasitária de fêmeas de *R. (B.) microplus* alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares e do grupo controle.

3.7.1 Peso das fêmeas ingurgitadas

Peso das fêmeas após a alimentação artificial e oriundas de queda natural.

3.7.2 Período de pré-postura

Período em dias entre o término da alimentação das fêmeas até o primeiro dia da postura.

3.7.3 Período de postura

Período entre o primeiro e o último dia de postura de cada fêmea. A partir da

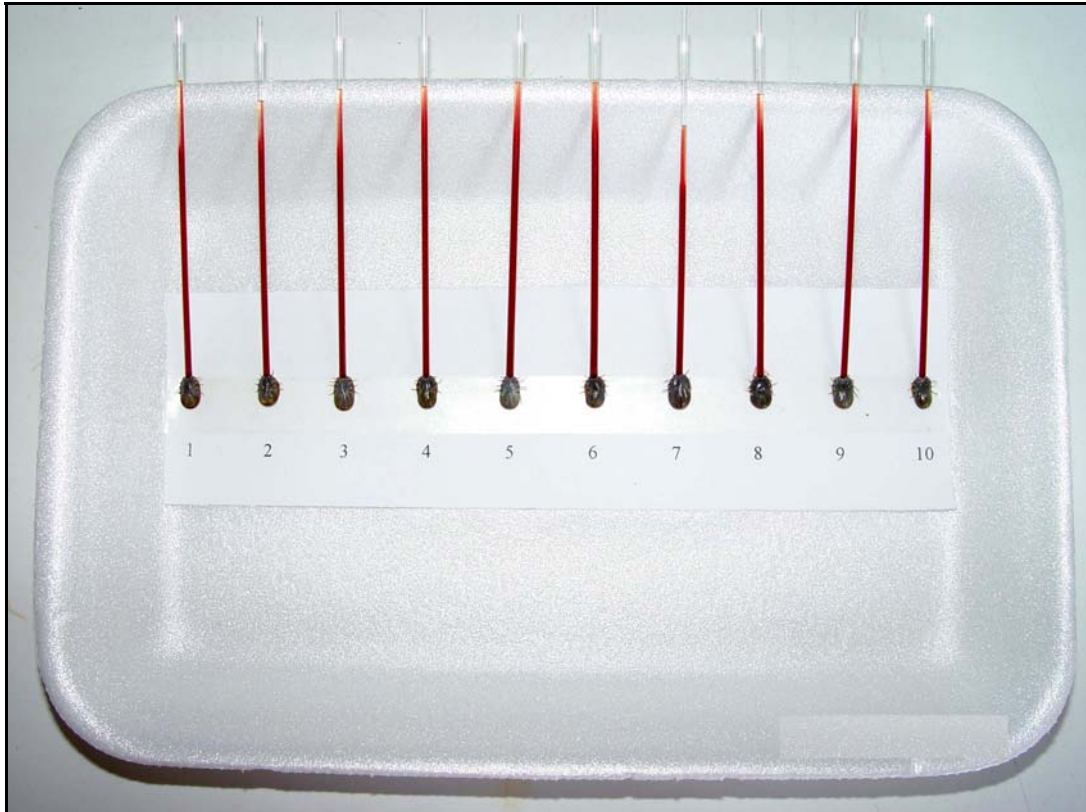


Figura 1. Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fixadas em bandeja de isopor durante o processo de alimentação artificial por meio de tubos capilares.

separação e pesagem diária da postura de cada fêmea foi verificado o ritmo de postura.

3.7.4 Peso da postura

Peso total das posturas diárias de cada fêmea.

3.7.5 Peso da quenógina

Peso obtido no terceiro dia após o término da postura de cada fêmea.

3.7.6 Perda de peso da fêmea

Peso da fêmea após alimentação artificial por meio de tubos capilares ou após o desprendimento natural subtraído do peso da quenógina.

3.7.7 Índice de produção de ovos (IPO)

Este índice foi calculado aplicando-se a seguinte expressão (BENNETT, 1974):

$$\text{IPO} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (mg)}}{\text{Peso da fêmea ingurgitada (mg)}} \times 100$$

3.7.8 Índice de eficiência nutricional (IEN)

Este índice foi calculado aplicando-se a seguinte expressão (BENNETT, 1974):

$$\text{IEN} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (mg)}}{\text{Peso inicial} - \text{Peso final (mg)}} \times 100$$

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%, para a comparação das médias (SAMPAIO, 2002).

O ganho de peso das fêmeas e os tempos de alimentação artificial foram avaliados conjuntamente, a fim de verificar a significância da regressão linear, assim como o peso das fêmeas e o peso das posturas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Alimentação artificial de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parcialmente ingurgitadas

Na **Tabela 1** estão apresentados os resultados referentes ao peso médio das fêmeas de *R. (B.) microplus* antes e após a alimentação artificial por meio de tubos capilares, assim como o ganho médio de peso em todos os períodos analisados.

Partindo de um peso médio inicial de aproximadamente 52,17mg os carrapatos alimentados artificialmente, por meio de tubos capilares com sangue bovino, alcançaram um peso médio final de 131,64mg, após 36 horas de exposição aos capilares. Neste período de alimentação as fêmeas atingiram 63,64% do peso médio observado nos carrapatos do grupo controle. Resultados equivalentes foram encontrados para fêmeas parcialmente ingurgitadas dos carrapatos *A. cajennense* e *R. sanguineus*, submetidas a alimentação artificial por meio de tubos capilares em trabalhos realizados por Abel (2004) e Cunha et al. (2006) respectivamente.

Um volume de sangue bovino de 25 ml foi suficiente para alimentar os quatro grupos de carrapatos, durante os tempos estabelecidos. A determinação dos períodos de exposição dos carrapatos aos capilares foi planejada com o objetivo de se trabalhar com fêmeas parcialmente ingurgitadas, que estivessem no início da fase rápida de alimentação (SONESHINE, 1991). Desta maneira, foi possível reproduzir artificialmente, em laboratório, o estágio final do processo de ingurgitamento de fêmeas parcialmente alimentadas de *R. (B.) microplus*.

No presente estudo, a pesagem dos carrapatos antes e após a exposição aos capilares foi uma maneira simples e eficiente para determinação do ganho de peso dos grupos alimentados artificialmente, assim como realizado por De la Vega et al. (2000); Abel (2004) e Cunha et al. (2006). Outros métodos utilizados na determinação do ganho de peso de carrapatos alimentados artificialmente foram a marcação radioativa (BURGDORFER, 1957; JOYNER et al., 1972; PURNELL et al., 1972; MACALUSO et al., 2001; BROADWATER et al., 2002), microesferas fluorescentes (KOCAN et al., 2005), marcação do nível de preenchimento dos capilares (ALMAZÁN et al., 2005; KOCAN et al., 2005), electrogramas (McLEAN; KINGSLEY, 1964; WALADDE et al., 1979) e técnicas moleculares (RECHAV et al., 1999; JASINSKAS et al., 2000; KOCAN et al., 2005; SOARES et al., 2005). Estes métodos, apesar de eficientes, contribuem para o aumento dos custos financeiros e para diminuir a praticidade da técnica de alimentação artificial.

O sucesso da alimentação artificial pôde ser observado durante todos os períodos de exposição dos carrapatos aos capilares, com a constatação a olho nu do arredondamento dos idiossomas (**Figura 2**). Outros indícios da ingestão de sangue foram a redução constante do conteúdo dos microcapilares e a excreção de guanina. Alguns autores utilizaram a excreção desta substância para determinar a ingestão da fonte de alimento pelo carrapato (ALEKSEEV, 1971; INDEST et al., 2001; FINGERLE et al., 2002). Em 2004, Abel, ao descrever o aumento no tamanho das fêmeas de *A. cajennense* alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares, também mencionou a excreção de guanina.

Na comparação entre o ganho médio de peso dos carrapatos alimentados artificialmente foi verificada diferença estatística a partir de 24 horas de exposição aos capilares. Desta forma, a alimentação *in vitro* de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. (B.) microplus* neste período foi suficiente para uma ingestão significativa de sangue. Embora o grupo 36 horas tenha apresentado maior ganho médio de peso, observou-se que no terço final da alimentação artificial apenas quatro carrapatos continuavam a ingerir o sangue presente nos capilares. Este fato pode estar relacionado com o aumento da variação do ganho médio de peso deste grupo.

Tabela 1. Avaliação do ganho médio de peso em fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas.

Períodos de alimentação	Peso das fêmeas			Ganho percentual (%)*
	Média ± Desvio Padrão (Limite mínimo – Limite máximo)			
	Antes	Depois	Ganho	
6 horas	52,12 ±8,30 ^a	64,45±19,29 ^a	12,33±15,17 ^a	31,18
	(40,70-64,40)	(39,50-99,50)	(-1,70-37,70)	
12 horas	52,16±8,90 ^a	85,57±20,93 ^{a,b}	33,41±21,27 ^{a,b}	41,40
	(41,60-68,40)	(54,40-120,60)	(-1,40-65,80)	
24 horas	52,16±9,19 ^a	119,69±29,97 ^{b,c}	67,53±27,57 ^{b,c}	57,91
	(40,60-68,40)	(49,90-153,80)	(9,20-113,20)	
36 horas	52,17±8,26 ^a	131,64±48,27 ^c	79,47±45,53 ^c	63,64
	(41,60-69,70)	(36,50-212,80)	(-5,10-150,70)	

Nas colunas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes (P < 0,05).

* Grupo controle igual a 100%.

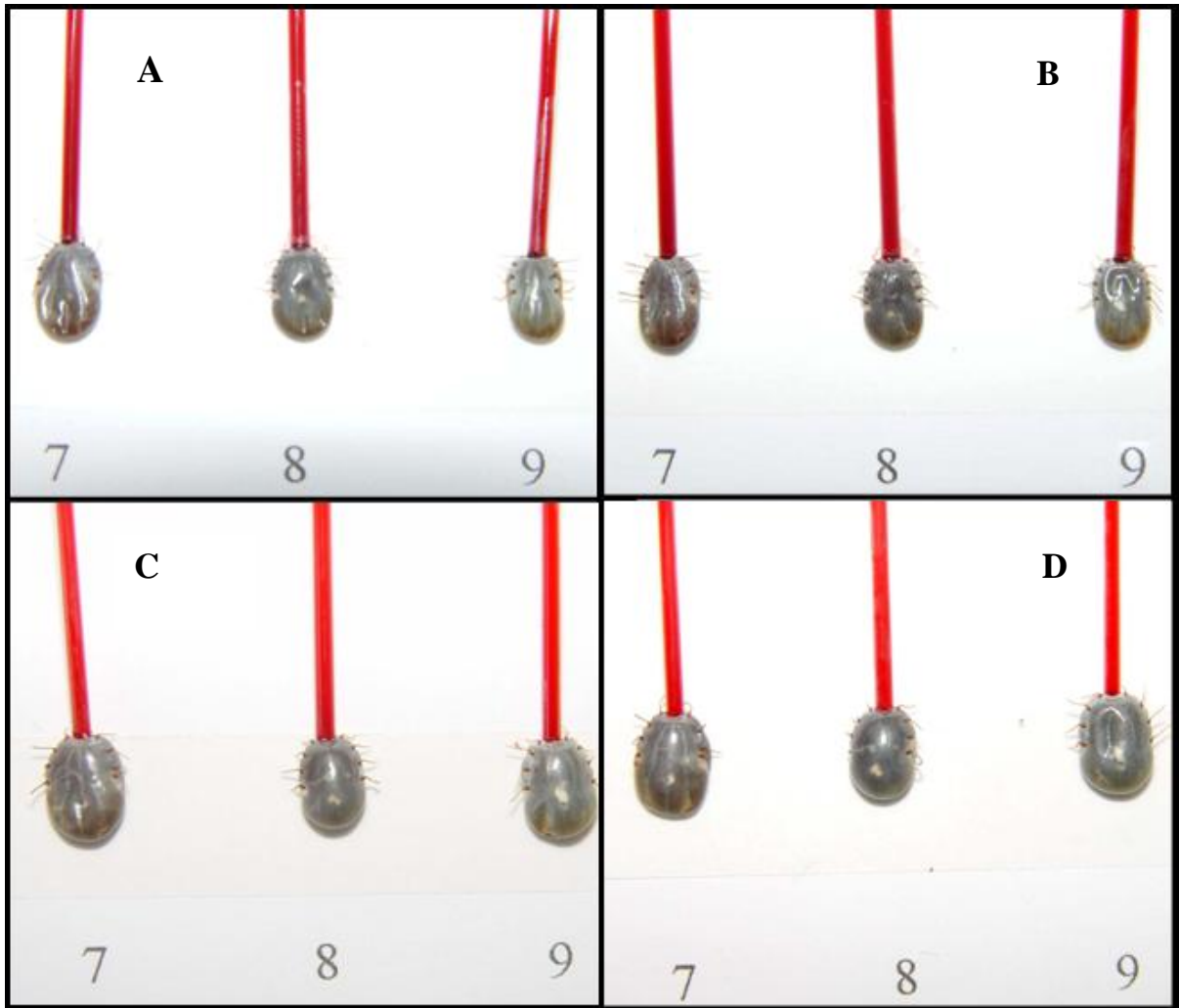


Figura 2. Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares. **A, B, C, D,** fêmeas 7, 8 e 9 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* após 6, 12, 24 e 36 horas.

Cunha et al. (2006) ao alimentarem fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus*, observaram melhor ganho de peso no grupo alimentado por 24 horas. Abel (2004) relatou um volume significativo de sangue ingerido por fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. cajennense* após duas horas de exposição aos capilares.

A relação entre o peso das fêmeas e o período de exposição aos capilares mostra acréscimo no ganho de peso das fêmeas à medida que aumenta o tempo de alimentação artificial (**Figura 3**). Esses resultados corroboram Cunha et al. (2006), que ao alimentarem artificialmente fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus*, por meio de tubo capilares, determinaram que o ganho de peso estava relacionado com o período de exposição dos carrapatos aos capilares. No entanto, Gregson (1973), observou que os carrapatos ingerem o material oferecido nos capilares por um intervalo limitado de tempo. Burgdorfer (1956) verificou que o processo de alimentação se restringe a um período de quatro a seis horas, a menos que sejam oferecidas suspensões frescas.

Durante o longo do período de exposição dos carrapatos aos capilares, foi observado o ressecamento do sangue na extremidade do capilar em contato com o aparelho bucal dos carrapatos. Este evento atrapalhou o fluxo de sangue pelo tubo, havendo a necessidade de trocar os capilares a cada intervalo de 30 minutos para não prejudicar o processo de alimentação artificial dos carrapatos. No estudo da transmissão de *T. parva* por *R. appendiculatus*, Purnell; Joyner, (1967) atribuíram a obstrução dos capilares à produção de cemento. A troca dos capilares a cada 30 minutos permitiu que os carrapatos recebessem sangue fresco regularmente, o que representa uma vantagem da técnica de tubos capilares em relação à utilização de membranas para alimentação *in vitro*. Apesar de laboriosa, a técnica de microcapilares, não torna necessária a adição de conservantes, assim como, o armazenamento de sangue, o que poderia levar à produção de toxinas conforme observado por Stone et al. (1983); Osborne; Mellor (1986); Bonnet et al. (2007).

Embora a utilização da técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares não tenha permitido o ingurgitamento total de fêmeas de *R. (Boophilus) microplus*, tais resultados devem ser considerados em estudos que visem a infecção experimental desta espécie. Broadwater et al. (2002) obtiveram êxito na infecção de ninfas de *I. scapularis* com *B. burgdorferi*, embora não de forma tão eficiente como ninfas naturalmente infectadas. Kocan et al. (2005), utilizando técnica semelhante, conseguiram infectar o carrapato *D. variabilis* com *A. marginale*.

A pouca quantidade de solução ingerida observada em alguns estudos que empregaram tubos capilares foi atribuída por Macaluso et al. (2001) e Broadwater et al. (2002) à artificialidade do método e à inserção dos palpos no interior dos capilares. No entanto, no presente trabalho a inclusão dos palpos no interior dos capilares não impediu a ingestão de um volume significativo de sangue. Tais resultados corroboram Purnell; Joyner (1967), que não observaram mudanças na capacidade de alimentação de *R. appendiculatus* em relação ao posicionamento dos capilares sobre as peças bucais deste carrapato.

Outros autores, no entanto, incriminam como fatores responsáveis por dificultarem o sucesso da técnica a conjunção de ações mecânicas e químicas que ocorrem nas etapas de pré-alimentação dos ixodídeos, seus longos períodos de fixação e a interação parasito-hospedeiro (FONSECA et al., 1999; ABEL, 2004).

4.2 Aspectos biológicos da fase não-parasitária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Na **Tabela 2**, estão expostas as médias, desvios padrão e limites mínimos e máximos referentes aos aspectos biológicos da fase não-parasitária de fêmeas de *R. (B.) microplus* alimentadas artificialmente, por meio de tubos capilares e do grupo controle alimentados em bovinos.

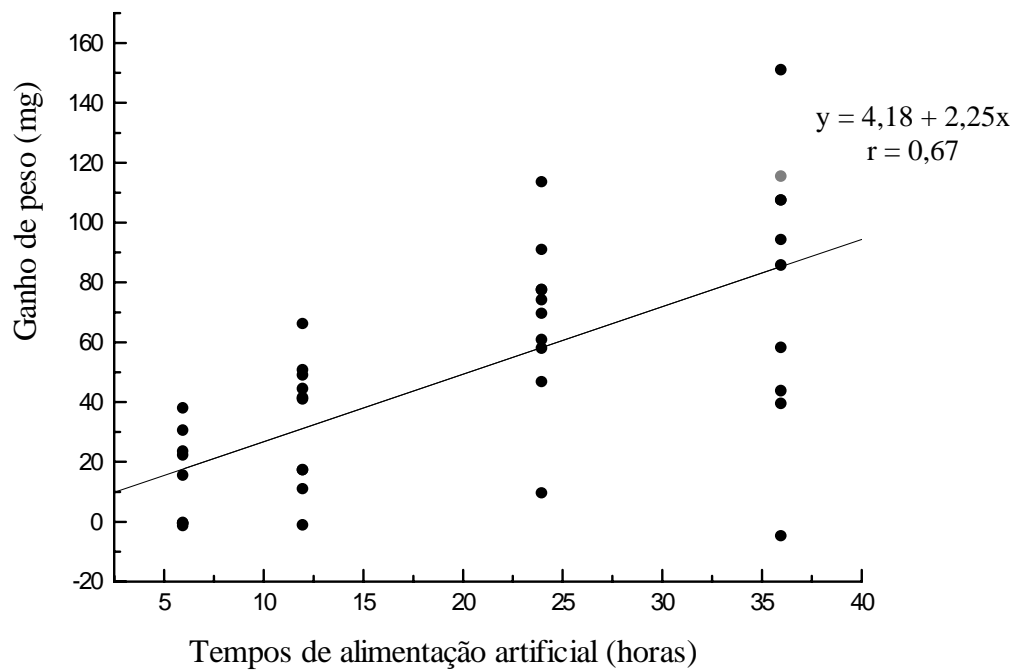


Figura 3. Diagrama da dispersão de pontos e reta ajustada, equação de ajuste e coeficiente de correlação do ganho de peso das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas

Tabela 2. Aspectos biológicos referentes à postura de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares, durante 6, 12, 24 e 36 horas, em condições controladas (Temperatura de 27°C±1°C e Umidade relativa do ar igual ou superior a 80%).

Aspectos biológicos	Período de alimentação artificial por meio de microcapilares e grupo controle alimentado em bovinos				
	6 horas	12 horas	24 horas	36 horas	Controle
Peso das fêmeas (mg)	64,45±19,29 ^a (39,50 – 99,50)	85,57±20,93 ^{a, b} (54,40 – 120,60)	119,69±29,97 ^{b, c} (49,90 – 153,80)	131,64±48,27 ^c (36,50 – 212,80)	206,70±39,90 ^d (145,20 – 254,60)
Período de Pré- Postura (dias)	3,56±0,53 ^a (3,00 – 4,00)	3,40±0,52 ^a (3,00 – 4,00)	2,10±0,32 ^b (2,00- 3,00)	2,40±0,70 ^b (2,00 – 4,00)	2,40±0,52 ^b (2,00 – 3,00)
Período de Postura (dias)	8,33±0,70 ^a (5,00 - 7,00)	8,30±0,48 ^a (6,00 – 7,00)	8,90±0,32 ^a (6,00 – 7,00)	9,30±1,34 ^a (5,00 – 9,00)	11,10±0,57 ^b (10,00 - 11,00)
Peso da postura (mg)	19,04±14,15 ^a (0,00 – 50,1)	32,48±9,70 ^{a, b} (16,80 – 45,00)	56,71±17,21 ^{b, c} (15,80 – 77,30)	67,23±30,11 ^c (6,80 – 110,30)	128,42±27,45 ^d (83,80 – 165,90)
Peso da quenógina (mg)	30,78±5,10 ^a (24,50 – 37,50)	34,86±11,61 ^{a, b} (12,90 – 5,50)	46,54±11,22 ^{b, c} (27,10 – 63,70)	49,22±15,12 ^c (21,90 – 78,00)	47,04±8,53 ^{b, c} (38,30 - 61,30)
Perda de peso (mg)	30,87±14,46 ^a (15,20 – 62,00)	50,71±15,15 ^{a, b} (25,00 – 72,80)	73,15±20,41 ^b (22,80 – 94,30)	82,42±33,55 ^b (14,60 – 134,80)	159,66±34,56 ^c (105,50 – 201,00)
Índice de produção de ovos (%)	30,61±9,23 ^a (21,87 – 50,35)	37,70±4,97 ^{a, b} (30,16 – 45,55)	46,33±5,48 ^{b, c} (31,66 – 50,38)	48,05±11,14 ^c (18,63 – 55,81)	61,93±2,68 ^d (57,58 – 65,16)
Índice de eficiência nutricional (%)	55,62±23,99 ^a (0,00 – 80,81)	65,47±11,83 ^{a, b} (38,46 – 77,45)	76,84±5,25 ^b (69,30 – 85,22)	77,98±11,77 ^b (46,58 – 85,49)	80,65±5,03 ^b (70,87 – 84,89)

Nas linhas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes (P < 0,05).

4.2.1 Peso das fêmeas ingurgitadas

O peso médio das fêmeas após a alimentação artificial foi de 64,45; 85,57; 119,69 e 131,64mg nos grupos 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou peso médio de 206,70mg. Estes resultados determinaram uma diferença estatística significativa entre os grupos alimentados artificialmente e o grupo controle.

Os resultados encontrados neste estudo para o peso médio das fêmeas de *R. (B.) microplus* alimentadas artificialmente e do grupo controle, estão fora da variação de 213 a 387 obtida nos trabalhos de Hitchcock (1955); Sutherst et al. (1978) e Davey et al (1984) realizados na Austrália e nos Estados Unidos. As médias obtidas por Davey et al. (1980), Costa (1982), Benavides (1984), Bittencourt (1990) e Barreira (2001) de 449; 223,3; 245,5; 258,2 e 256,4 mg respectivamente, também diferem dos resultados do presente estudo.

As diferenças observadas entre o peso das fêmeas ingurgitadas do presente estudo com o encontrado por outros autores provavelmente está relacionada a cepa e a ampla distribuição geográfica dessa espécie de carrapato.

4.2.2 Período de pré-postura

O período médio de pré-postura das fêmeas alimentadas artificialmente foi de 3,56; 3,40; 2,10 e 2,40 dias nos grupos 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente. Para o grupo controle formado a partir de fêmeas alimentadas experimentalmente em bovinos, o período de pré-postura foi de 2,40 dias.

Nas fêmeas alimentadas artificialmente, foi observada uma redução do período de pré-postura à medida que aumentou o tempo de exposição dos carrapatos aos capilares, sendo determinada diferença estatística entre o grupo controle e os grupos alimentados por 6 e 12 horas. Contrariando a afirmação feita por Londt (1974), com *Boophilus decoloratus*, de que o tempo despendido com a pré-postura não tem relação com o peso da fêmea ingurgitada.

Estes resultados estão incluídos no período de dois a seis dias encontrado por Davey et al. (1984), nos Estados Unidos, assim como no intervalo de dois a quatro dias observado por Meléndez et al. (1998), na Venezuela. A pré-postura nos tempos de alimentação artificial de 6 e 12 horas foi semelhante aos períodos de 3,0 e 3,2 dias constatados por Davey et al. (1980) e Furlong (1990) respectivamente. O grupo controle e os grupos expostos aos capilares por 24 e 36 horas apresentaram um período de pré-postura próximo do relatado por Barreira (2001) de 2,29 dias, em carrapatos livres de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*. Magalhães (1989) e Costa (1982) obtiveram períodos de pré-postura de 7,0 e 4,7 dias respectivamente, resultados superiores aos verificados neste estudo.

4.2.3 Período de postura

A duração do período de postura variou de 6,34; 6,50; 6,90 e 7,30 dias nos grupos 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente, diferindo estatisticamente do grupo controle que apresentou um período de pré-postura de 10,60 dias. Este resultado já era esperado, uma vez que o peso médio das fêmeas alimentadas artificialmente foi significativamente inferior ao peso médio observado nos carrapatos do grupo controle.

Os valores obtidos para os períodos de postura nos grupos alimentados artificialmente diferem dos resultados encontrados por Davey et al. (1980); Costa (1982); Magalhães (1989); Bittencourt (1990); Glória et al. (1993) e Barreira (2001). O grupo controle apresentou resultado próximo ao de Bittencourt (1990) de 11,1 dias em bovinos e Glória et al. (1993) que encontraram um período de postura de 11,06 dias para carrapatos resistentes a carrapaticidas.

O resultado confirma as observações feitas por Bennett (1974) de que, submetidas a mesma temperatura, fêmeas maiores e mais pesadas finalizam a sua postura em maior

intervalo de tempo, porque possuem maior quantidade de nutrientes para converter em massa de ovos.

Os ritmos de postura diários de cada grupo alimentado artificialmente e do grupo controle estão apresentados na **Figura 4**. O pico de postura médio ocorreu no terceiro dia após o início da postura no grupo controle e no grupo alimentado artificialmente por 36 horas.

Estes resultados foram semelhantes ao observado por Davey et al. (1980) realizando infestações experimentais em bovinos nos Estados Unidos. Os grupos 6, 12 e 24 horas apresentaram pico de postura médio no segundo dia após o início da postura. Resultado diferente foi demonstrado por Glória et al. (1993) que relataram pico médio de postura no primeiro dia de postura.

4.2.4 Peso das posturas

Todas as fêmeas dos grupos alimentados artificialmente e do grupo controle realizaram posturas viáveis, com exceção de um carrapato do grupo 6 horas. As posturas das fêmeas alimentadas artificialmente apresentaram peso médio de 19,04; 32,48; 56,71 e 67,23mg nos grupos 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente. O peso médio das posturas das fêmeas do grupo controle foi de 128,42mg, sendo estatisticamente diferente do peso da massa de ovos dos grupos alimentados artificialmente.

O peso médio das posturas das fêmeas alimentadas artificialmente por 36 horas foi próximo ao observado por Benavides (1984) e Barreira (2001). O grupo controle apresentou resultado superior ao observado por Furlong (1990) de 111,52mg em bovinos. Os trabalhos de Davey et al. (1984); Bittencourt (1990); Glória et al. (1993) e Meléndez et al. (1998) relataram peso médio de postura superior ao do presente estudo.

Bennett (1974) afirmou que o potencial de oviposição de uma fêmea ingurgitada está diretamente relacionado a capacidade de se alimentar. Isso explica o baixo peso das posturas observado no presente estudo.

4.2.5 Peso das quenóginas

O valor médio do peso das quenóginas foi de 30,78; 34,86; 46,54 e 49,22mg nos grupos alimentados artificialmente por 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente. As quenóginas do grupo controle pesaram em média 47,04mg.

Foi verificado que o peso das quenóginas dos grupos expostos aos capilares por 6 e 12 horas apresentaram diferença estatística em relação aos dos demais grupos alimentados artificialmente e do grupo controle.

Em 1990, Furlong avaliando o comportamento de *B. microplus* e *A. cajennense* em infestações mistas em bovinos encontrou variação de 64,57 a 92,21mg no peso de quenóginas de *B. microplus*, valores superiores aos observados neste estudo. Estes resultados foram inferiores também aos observados por Glória et al. (1993) para fêmeas de *B. microplus* resistentes e sensíveis a carrapaticida de 63,6 e 69,8 mg respectivamente, assim como, Barreira (2001) que obteve média de 53,12mg para fêmeas não infectadas por *B. bovis* e *B. bigemina*.

4.2.6 Perda de peso das fêmeas

A perda de peso médio das fêmeas alimentadas por meio de tubos capilares foi 30,87; 50,71; 73,15 e 82,42mg nos grupos 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente. No grupo controle, observou-se perda média de peso de 159,66mg, o que determinou uma diferença significativa com os grupos alimentados artificialmente.

Os grupos alimentados artificialmente nos períodos de 6 e 12 horas apresentaram médias inferiores aos observados por Costa (1982); Furlong (1990). Enquanto, nos grupos expostos aos capilares por 24 e 36 horas a média de perda de peso das fêmeas foi próxima do

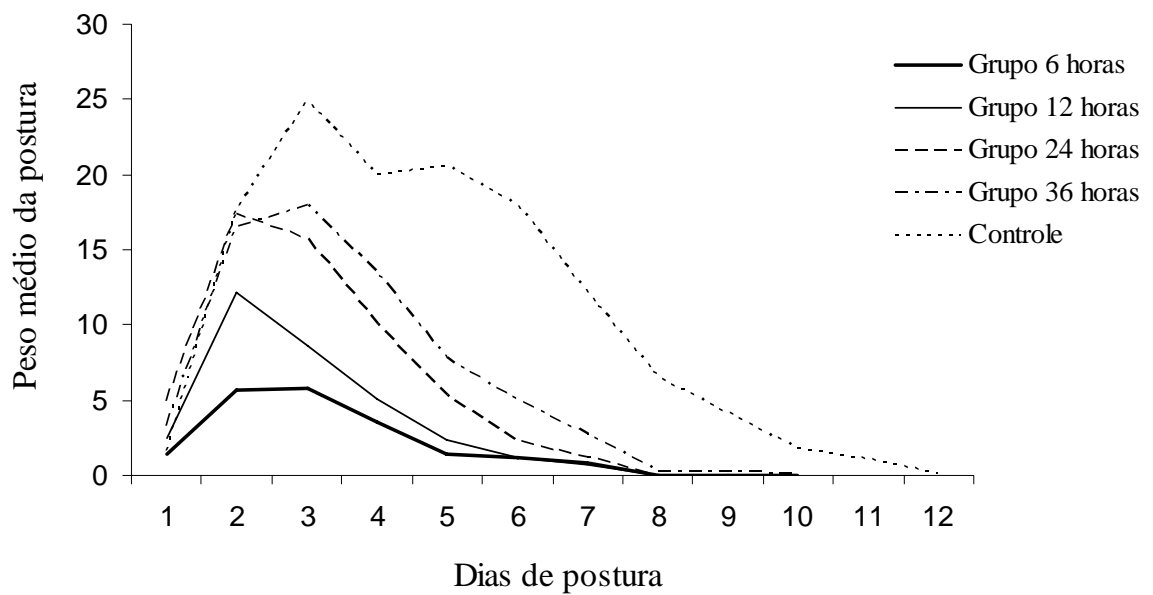


Figura 4. Ritmo médio de postura diária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtido pelas fêmeas alimentadas artificialmente nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas e grupo controle.

encontrado por Costa (1982) de 69,51mg, com variação de 84,98 a 49,00mg. O valor médio da perda de peso das fêmeas obtido no grupo controle está inserido na variação reportada por Furlong (1990) de 153,13 a 228,96mg.

4.2.7 Índice de produção de ovos

A capacidade das fêmeas de converter o sangue ingerido em ovos foi representada pelo índice de produção de ovos, que apresentou percentual médio de 30,61; 37,70; 46,33 e 48,05% nos grupos submetidos aos capilares por 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente. O índice médio de produção de ovos no grupo controle foi de 61,93%, caracterizando uma diferença estatística com os grupos alimentados artificialmente.

Os grupos alimentados por 6 e 12 horas apresentaram índice de produção de ovos inferior ao observado por Davey et al. (1980); Costa (1982); Benavides (1984); Bittencourt (1990); Glória et al. (1993); Barreira (2001). Os índices encontrados nos grupos 24 e 36 horas foram superiores aos observados por Costa (1982) e Barreira (2001), no entanto, foram inferiores aos relatados por Davey et al. (1980); Bittencourt (1990) e Glória et al. (1993) para esta espécie nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa utilizadas neste estudo.

4.2.8 Índice de eficiência nutricional

A quantidade de sangue perdida pelas fêmeas para produção de ovos foi representada pelo índice de eficiência nutricional que apresentou percentual médio de 55,62; 65,47; 76,84 e 77,98% nos grupos expostos aos microcapilares por 6, 12, 24 e 36 horas respectivamente. No grupo controle foi observado índice médio de eficiência nutricional de 80,65%.

Na comparação das médias dos grupos alimentados artificialmente e do grupo controle, apenas o grupo exposto aos capilares por 6 horas apresentou diferença estatística com o grupo controle.

Os índices de eficiência nutricional observados nos grupos alimentados artificialmente por 6 e 12 horas foram semelhantes aos encontrados por Davey et al. (1980) de 56,5% e Barreira (2001) de 55,65%. Os grupos 24 e 36 horas apresentaram resultados próximos aos de Furlong (1990) que observou uma variação de 61,21 a 71,67% nos índices de eficiência nutricional de fêmeas de *B. microplus* provenientes de infestações simultâneas ou consecutivas com *A. cajennense* em bovinos.

4.2.9 Análise de regressão entre peso das fêmeas após a alimentação artificial e o peso das posturas

A correlação entre o peso das fêmeas após a alimentação artificial e a massa de ovos foram altamente significativos, apresentando um coeficiente de correlação de 0,98 ($P < 0,05$), (**Figura 5**) justificando desta maneira o baixo peso de postura encontrado neste estudo. Este resultado foi maior que o relatado por Davey et al. (1980) de 0,857 para fêmeas de *B. microplus* e Glória et al. (1993) que observou uma correlação de 0,82 para carrapatos resistentes e 0,87 para carrapatos sensíveis a carrapaticida.

A relação entre o peso das fêmeas e o peso das posturas mostra que à medida aumenta o peso da fêmea há um aumento na produção de ovos.

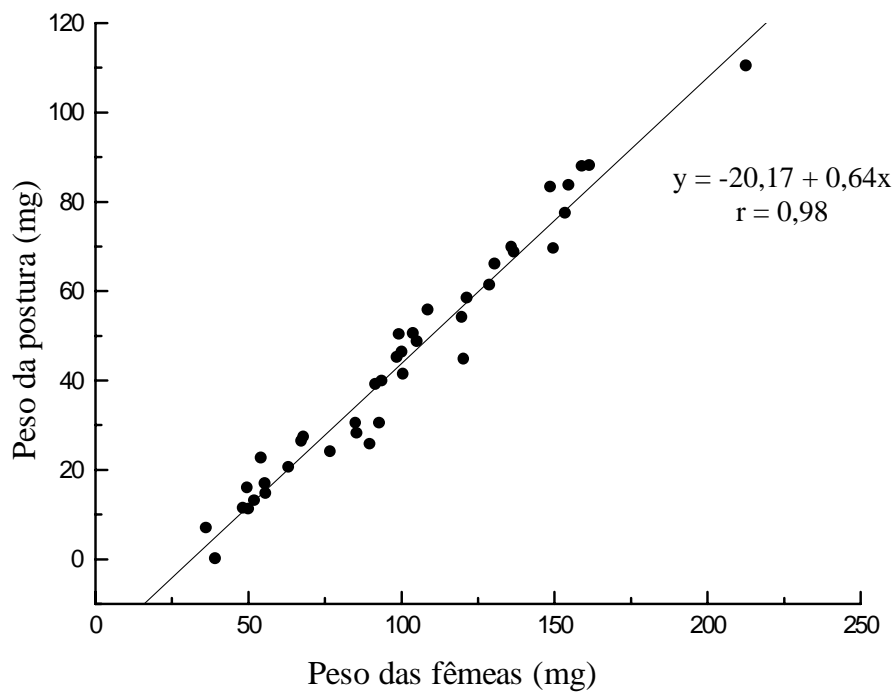


Figura. 5. Diagrama da dispersão de pontos e reta ajustada, equação de ajuste e coeficiente de correlação do peso (mg) das fêmeas e das posturas (mg) de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

5 CONCLUSÕES

Tubos capilares repletos de sangue bovino citratado podem ser utilizados na alimentação artificial de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* previamente alimentadas em bovinos.

A alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* não apresentou efeito deletério sobre os aspectos biológicos da fase não-parasitária desta espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASSY, M. M.; STEIN, K. J.; OSMAN, M. New artificial feeding technique for experimental infection of *Argas ticks* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 202-205, 1994.
- ABEL, I. **Investigações preliminares sobre espiroquetídeos e seus potenciais vetores procedentes da Reserva Florestal do Morro Grande, Município de Cotia – SP.** 1999. 87f. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ABEL, I. **Alimentação artificial de fêmeas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) através de tubos capilares.** 2004. 56f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- ALEKSEEV, A. N. Artificial dosaged feeding of ixodes persulcatus sch. Ticks - the main vectors of tickborne encephalitis. **Parazitologiya**, v. 5, n. 5, p. 392-400, 1971.
- ALMAZÁN, C.; BLAS-MACHADO, U.; KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J. H.; BLOUIN, E. F.; MANGOLD, A. J.; DE LA FUENTE, J. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. **Vaccine**, v. 23, n. 35, p. 4403-4416, 2005.
- ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.
- BARREIRA, J. D. **Efeito da infecção de *Babesia bovis* (Babes, 1988) e *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) sobre os parâmetros biológicos do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1893).** 2001. 138f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- BARROS-BATTLESTI, 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/ICTTD-3 Butantan, 2006. 223p.
- BENAVIDES, O. E. Biología oviposicional de 1ª garrapata *Boophilus microplus* em condiciones de los Llanos Orientales de Colômbia. **Revista do Instituto Colombiano Agropecuario**, v. 9, n. 1, p. 25-32, 1984.
- BENAVIDES, E.; WALKER, A. R. Secreción natural de saliva in la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann), alimentada artificialmente en tubos capilares. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 1992.
- BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (ACARIDIDA: IXODIDAE): (I. Influence of tick size on egg production). **Acarology**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974.
- 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.

BONNET, S.; JOUGLIN, M.; MALANDRIN, L.; BECKER, C.; AGOULON, A.; L'HOSTIS, M.; CHAUVIN, A. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. **Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 197-207, 2007.

BROADWATER, A. H.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; CERAUL, S.; DE SILVA, A. M. Glass capillary tube feeding: A method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 285-292, 2002.

BURG, J. G.; KNAPP, F. W.; SILAPANUNTAKUL, S. Feeding *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) adults through a nylon-reinforced silicone membrane. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 462-466, 1993.

BURGDORFER, W.; PICKENS, E. G. A technique employing embryonated chicken eggs for the infection of argasid ticks with *Coxiella burnetii*, *Bacterium tularensis*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and western equine encephalitis virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 94, n. 1, p. 84-89, 1954.

BURGDORFER, W. The possible role of ticks as vectors of leptospirae I. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. **Experimental Parasitology**, v. 5, n. 6, p. 571-579, 1956.

BURGDORFER, W. Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. **Journal of Infectious Diseases**, v.100, n. 3, p.212-214, 1957.

BURKOT, T. R.; HAPP, C. M.; DOLAN, M. C.; MAUPIN, G. O. Infection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 167-171, 2001.

CHABAUD, A. G. Sur la nutrition artificielle des tiques. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 25, n. 1-2, p. 42-47. 1950.

COSTA, A. L. **Bioecologia de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae) no Estado do Rio de Janeiro: (Oviposição e sazonalidade, considerações preliminares)**. 1982. 37f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

CUNHA, N. C.; RANGEL, C. P.; PIRANDA, E. M.; REZENDE, J.; TEIXEIRA, R. C.; FONSECA, A. H. Avaliação do ganho de peso em fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (acari: Ixodidae) alimentadas artificialmente por meio de tubos microcapilares. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-americano de Rickettsioses**. Ribeirão Preto-SP, 2006. p.215.

DAVEY, R. B.; GARZA JR., J.; THOMPSON, G. D.; DRUMOND, R. O. Ovipositional biology of the Southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 17, n. 2, p. 117-121, 1980.

DAVEY, R. B.; OSBURN, R. L.; MILLER, J. A. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographical areas. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 77, n. 1, p. 1-5, 1984.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; FINLAY, L. Artificial feeding of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) through micropipettes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 315-319, 2000.

DE LA VEGA, R.; CAMEJO, A.; FONSECA, A. H. An automatic system to feed ticks through membranes. **Revista de Salud Animal**, v. 26, n. 3, p. 202-205, 2004.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; CAMEJO, A.; FONSECA, A. H.; RANGEL, C. P. Weight differences between *Boophilus microplus* (IXODOIDEA: IXODIDAE) from Brazil and from Cuba. **Revista de Salud Animal**, v. 29, n. 1, p. 36-38, 2007.

DE MEILLON, B.; GOLDBERG, L. Preliminary studies on the nutritional requirements of the bedbug (*Cimex lectularius*) and the tick (*Ornithodoros moubata*). **Journal of Experimental Biology**, v. 24, n. 3, p. 41-63, 1947.

FINGERLE, V.; RAUSER, S.; HAMMER, B.; KAHL, O.; HEIMERL, C.; SCHULTE-SPECHTEL, U.; GERN, L.; WILSKE, B. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 4, p.1456-1463, 2002.

FONSECA, A. H.; DUTRA, A. E. A.; PINA, I. G. Uso de sangue de frangos e de bovinos na alimentação de *Argas (Persicargas) miniatus* (Koch, 1848) (Acari: Argasidae), através de membrana de silicone. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 167-170, 1999.

FURLONG, J. **Comportamento de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em infestações consecutivas ou simultâneas em bovinos: análise preliminar de parâmetros biológicos**. 1990. 92f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

GERN, L.; ZHU, Z.; AESCHLIMANN, A. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, n. 1, p. 89-93, 1990.

GERN, L.; TOUTOUNGI, L. N.; HU, C. M.; AESCHLIMANN; A. *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 5, n. 4, p. 431-435, 1991.

GERN, L.; LEBET, N.; MORET, A. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. **Experimental and Applied Acarology**, v. 20, n. 11, p. 649-658, 1996.

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.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 103p.

GREGSON, J. D. Tick paralysis an appraisal of natural and experimental data. **Canadian Department of Agriculture**, Monograph n. 9, 1973.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n.125, p. 8-10, 2002.

HABEDANK, B.; HIEPE, T. In-vitro fütterung von zecken, *Dermacentor nuttalli*, OLENEV 1928 (Acari: Ixodidae) über eine silikonmembran. **Dermatologische monatschrift**, v. 179, n. 9, p. 292-295, 1993.

HABEDANK, B.; HIEPE, T; MONTAG, C. Untersuchungen zur Initro-Fütterung von Zecken-Argasidae und Ixodidae. **Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 16, n. 1, p. 107-114, 1994.

HADDON, Jr, W. An artificial membrane and apparatus for the feeding of the human body louse *Pediculus humanus corporis*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 5, n. 2, p. 315-325, 1956.

HITCHCOCK, L. F. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick *Boophilus microplus* Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, n. 1, p. 295-311, 1955.

HOKAMA, Y.; LANE, R. S.; HOWARTH, J. A. Maintenance of adult and nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) by artificial feeding through a parafilm membrane. **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 3, p. 319-323, 1987.

HOOD, S.; EDELSTERN, R. M.; BRANAGAN, D. The maintenance of the argasid tick *Ornithodoros moubata* (Mussay) on embryonated hen eggs. **Tropical Animal Health and Production**, v. 8, n. 1, p. 163-167, 1976.

HOWARTH, J. A.; HOKAMA, Y. Artificial feeding of adult and nymphal *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) during studies on bovine anaplasmosis. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 3, p. 248-256, 1983.

HU, C. M.; GERN L.; AESCHLIMANN A. Changes in the protein profile and antigenicity of different *Borrelia burgdorferi* strains after reintroduction to *Ixodes ricinus* ticks. **Parasite Immunology**, v. 14, n. 4, p. 415-427, 1992.

HU, C. M.; SIMON, M.; KRAMER, M. D.; GERN L. Tick factors and in vitro cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned *Borrelia garinii* isolate from *Ixodes ricinus* hemolymph. **Infection**, v. 24, n. 3, p. 251-257, 1996.

- INDEST, K. J.; HOWELL, J. K.; JACOBS, M. B.; SCHOLL-MEEKER, D.; NORRIS, S. J.; PHILIPP, M. T. Analysis of *Borrelia burgdorferi* *vlsE* gene expression and recombination in the tick vector. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 7083-7090, 2001.
- INOKUMA, H.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. **Veterinary Parasitology**, v. 53, n. 3-4, p. 293-299, 1994.
- JASINSKAS, A.; JAWORSKI, D. C.; BARBOUR, A. G. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 4, p.213-221, 2000.
- JOYNER, L. P.; PURNELL, R. E. The feeding behavior on rabbits and *in vitro* of ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. **Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 715-723, 1968.
- JOYNER, L. P.; CUNNINGHAM, M. P.; PUERNELL, R. E.; BROW, C. G. D. The duration of emission of infective particles of *Theileria parva* by infected ticks artificially. **Research Veterinary Science**, v. 13, n. 4. p. 402-403, 1972.
- KEMP, D. H.; KOUDESTAAL, D.; ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. **Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 243-254, 1975.
- KIRCH, H. J.; TEEL, P. D.; KLOFT, W. J.; DELOACH, J. R. Artificial feeding of *Ornithodoros concanensis* (Acari: Argasidae) nymphs on bovine blood and morphological changes in erythrocytes undergoing hemolysis in the tick midgut. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 450-455, 1991.
- KOCAN, K. M.; WICKWIRE, K. B.; HAIR, J. A.; EWING, S. A.; BARRON, S. J. Percutaneous infection of nymphal *Dermacentor andersoni* with *Anaplasma marginale*. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n. 8, p. 1662-1664, 1986.
- KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D. E.; DE LA FUENTE, J.; CERAUL, S. M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZÁN, C. Capillary tube feeding system for studying tick–pathogeninteractions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 864-874, 2005.
- KRÖBER, T.; GUERIN, P. M. In vitro feeding assays for hard ticks. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 445-449, 2007.
- KUHNERT, F.; DIEHL, P. A.; GUERIN, P. M. The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* in vitro. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 887-896, 1995.
- LANGLEY; P. A. Initiation and regulation of ingestion by hematophagous arthropods. **Journal of Medical Entomology**, v. 13, n. 2, p. 121-130, 1969.
- LI, X.; LANE, R. S. Vector competence of ixodid ticks (Acari) for *Borrelia burgdorferi* as determined with a capillary feeding method. **Journal of Spirochetal and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 1, p. 116–123, 1996.

- LONDT, J.G.H. The preoviposition period of *Boophilus decoloratus* (Koch, 1844) (Acarina: Ixodidae). **Journal of Entomological Society of Southeastern Africa**, v.37, p.405-412, 1974.
- LÖSEL, P. M.; GUERIN, P. M.; DIEHL, P. A. Contrasting effects of sera from rabbits and cattle infested with ticks on the *in vitro* feeding performance of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Veterinary Parasitology**, v. 47, n. 1-4, p. 355-360, 1993.
- MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E., CERAUL, S. M.; AZAD, A. Infection and transovarial transmission of Rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 1, n. 1, p. 45-53, 2001.
- MAGALHÃES, F. E. P. **Aspectos biológicos, ecológicos e de controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pedro Leopoldo-MG-Brasil.** 1989. 117f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- MANGO, C. K. A.; GALUN, R. *Ornithodoros moubata*: breeding *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 282-288, 1977.
- McLEAN, L.; KINGSLEY, M. G. A technique for electrically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v.202, p. 1358-1369, 1964.
- MELÉNDEZ, R. D.; CORONADO, A.; MUJICA, F.; CERUTTI, F.; MOSQUERA, O. Levels of natural resistance to two *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Corra breed bulls. **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 3, p. 691-696, 1998.
- MOURA, S. T.; FONSECA, A. H.; FERNANDES, C. G. N.; BUTLER, J. F. Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 545-548, 1997.
- MONIN, R.; GERN, L., AESCHLIMANN, A. A study of the different modes of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*. **Zentralblatt Bakteriologie**, v. 18, p. 14-20, 1989.
- MUSYOKI, J. M.; OSIR, E. O.; KIARA, H. K.; KOKWARO, E. D. Comparative studies on the infectivity of *Theileria parva* in ticks fed *in vitro* and those fed on cattle. **Experimental and Applied Acarology**, v. 32, n. 1-2, p. 51-67, 2004.
- OSBORNE, R. W.; MELLOR, P. S. Use of a silicone membrane feeding technique in the laboratory maintenance of a colony of *Ornithodoros moubata*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 17, n. 1, p. 31-38, 1985.
- OSBORNE, R. W.; MELLOR, P. S. Development and mortality of *Ornithodoros moubata* after feeding through an artificial membrane. **Tropical Animal Health and Production**, v. 18, n. 1, p. 41-47, 1986.
- PIERCE, A. E.; PIERCE, M. H. A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae: Acarina) on the embryonated hen egg. **The Australian Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 144-146, 1956.

- POLLACK, R. J.; TELDFORD III, S. R.; SPIELMAN, A. Retal infección and aspiration of material through the guts of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 6, p. 809-815, 1991.
- PURNELL, R. E. Infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva* using an artificial feeding technique. **Research in Veterinary Science**, v. 11, n. 4, p. 403-405, 1970.
- PURNELL, R. E.; JOYNER, L. P. Artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* from the salivary secretion. **Nature**, v. 216, n. 5114, p. 484-485, 1967.
- PURNELL, R. E.; SANSOM, B. F.; SELLWOOD, S. A. Uptake of ³H-thymidine during artificial feeding of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*. **Research in Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 102-103, 1972.
- RAU, U.; HANNOUN, C. The use of a capillary-tube technique for artificially feeding *Argas reflexus reflexus* ticks. **Bull World Health Organ**, v.39, n.2, p. 332-333, 1968.
- RECHAV, Y.; ZYZAK, M.; FIELDEN, L. J.; CHILDS, J. E. Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 4, p. 414-419, 1999.
- RECHAV, Y.; DREY, C.; FIELDEN, L. J.; GOLDBERG, M. Production of pheromones by artificially fed males of the ticks *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 761-765, 2000.
- RIEK, R. F. The cattle tick and tick fever. **Australian Veterinary Journal**, v. 41, n. 7, p. 211-215, 1965.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 256p.
- SOARES, C. A. G.; LIMA, C. M. R.; DOLAN, M. C.; PIESMAN, J.; BEARD, C. B.; ZEIDNER, N. S. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the *isac* gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 4, p. 443-452, 2005.
- SONENSHINE, D. E. The midgut. In: SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. Editora Oxford University Press, New York, 1991, v. 1, p. 159-185.
- SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; HYNES, W. E.; MACALUSO, K. R.; AZAD, A. F. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 127-134, 2002.
- STONE, B. F.; COMMINS, M. A.; KEMP, D. H. Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 5, p. 447-454, 1983.

SUTHERST, R. W.; WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. **Guide to studies on tick ecology**. Austrália: CSIRO, 1978. 59p.

TAWFIK, M. S.; GUIRGIS, S. S. Biochemical and physiological studies of certain ticks. Experimental feeding of *Argas* through membranes. **Journal of Medical Entomology**, v. 6, n. 2, p. 191-195, 1969.

TEIXEIRA, R. C.; RANGEL, C. P.; COSTA, C. M.; SILVA, J. B. DA; FONSECA, A. H. Utilização da técnica de microcapilares para alimentação artificial de ninfas de *Amblyomma cajennense*. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-americano de Rickettsioses**. Ribeirão Preto-SP, 2006. p.213.

TOUTOUNGI L. N.; GERN L. Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. **Experimental and Applied Acarology**, v. 17, n. 8, p. 581–586, 1993.

UCHIKAWA, K. A membrane feeding method for *Argas japonicus* (Ixodoidea: Argasidae) and applications of this method for culturing the tick and for oral infecting of Japanese encephalitis virus. **Japanese Journal of Sanitary Zoology**, v. 27, n. 3, p. 207-216, 1976.

VOIGT, W. P.; YOUNG, A. S.; MWAURA, S. N.; NYAGA, S. G.; NJIHIA, G. M.; MWAKIMA, F. N.; MORZARIA, S. P. *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. **Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 257-263, 1993.

WALADDE, S. M.; OCHIENG, S. A.; GICHUHI, P. M. Artificial-membrane feeding of the ixodid tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, to repletion. **Experimental and Applied Acarology**, v. 11, n. 4, p. 297-306, 1991.

WALADDE, S. M.; OCHIENG, S. A. Advances in the artificial feeding of ticks. **Insect Science and its Application**, v. 13, n. 4, p. 579-583, 1992.

WALADDE, S. M.; YOUNG, A. S.; OCHIENG, S. A.; MWAURA, S. N.; MWAKIMA, F. N. Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed as nymphs *in vitro* on infected blood through an artificial membrane. **Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 249-256, 1993.

WALADDE, S. M.; YOUNG, A. S.; MWAURA, S. N.; NJIHIA, G. N.; MWAKIMA, F. N. Optimization of the *in vitro* feeding of *Rhipicephalus appendiculatus* nymphs for the transmission of *Theileria parva*. **Parasitology**, v. 111, n. 4, p. 463-468, 1995.

WALKER, A. R.; BROWN, C. G. D.; BELL, L. J.; McKELLAR, S. B. Artificial infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva*. **Research in Veterinary Science**, v. 26, n. 2, p. 264-265, 1979.

WETZEL, H. Artificial membrane for *in vitro* feeding of piercing-sucking arthropods. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 25, n. 1, p. 117-119, 1979.