

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

DISSERTAÇÃO

Ponteiras plásticas na Alimentação Artificial de Fêmeas de
***Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) parcialmente**
ingurgitadas

Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim

2014



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

Ponteiras plásticas na Alimentação Artificial de Fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) parcialmente ingurgitadas

Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo 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
Fevereiro/ 2014

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

JAQUELINE RODRIGUES DE ALMEIDA VALIM

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 25/02/2014



Aivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D.) UFRRJ
(Orientador)



Márcia Cristina de Azevedo Prata (Dr^a) EMBRAPA-CNPGL



Thaís Ribeiro Correia Azevedo (Dr^a) UFRRJ



Nathalie Costa da Cunha (Dr^a) UFF

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra primeiramente à Deus que com seu amor sublime me concedeu a vida e sempre foi muito cuidadoso comigo e me deu força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me supriu em todas as minhas necessidades;

Aos meus pais, José de Almeida Valim e Irene Rodrigues de Almeida, pelo apoio e atenção que tiveram comigo em todos os momentos da minha vida sem o qual tudo isso jamais faria sentido;

Ao meu irmão, Jefferson Rodrigues de Almeida Valim, que me apoiou em todos os momentos;

Às minhas Tias Deolinda Rodrigues Modolo e Éster Rodrigues Capuchi pelas sábias palavras nos momentos de dúvidas;

Às minhas primas Rejane Aparecida Rodrigues Modolo, Vanessa Luiza Rodrigues Modolo e Tatiana Rodrigues Pirovani pela amizade sempre carinhosa apesar da distância;

Ao meu primo João Paulo Rodrigues Modolo, além de primo um grande irmão e François Felipe Rodrigues Modolo pelos momentos de alegria;

Ao mais lindo casal de cães “Baraki e sua esposa feiosa”,

A TODOS VOCÊS O MEU SINCERO CARINHO!!!

“Ainda acho que precisamos conhecer o inverno pra compreender o verão, assim como é necessário passar por momentos de tristeza profunda para conseguir identificar e valorizar a felicidade quando ela chegar. E não devemos nunca esquecer das pessoas que amamos.”

A CABANA

Há tempo para tudo

Para tudo há uma ocasião certa, há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu;

Tempo de nascer e tempo de morrer e tempo de se arrancar o que se plantou;

Tempo de matar e tempo de curar, tempo de derrubar e tempo de rir, tempo de prantear e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las;

Tempo de abraçar e tempo de se conter, tempo de procurar e tempo de jogar fora, tempo de rasgar e tempo de costurar, tempo de calar e tempo de falar;

Tempo de amar e tempo de odiar, tempo de lutar e tempo de viver em paz;

O que ganha o trabalhador com todo o seu esforço?

Tenho visto o fardo que Deus impôs aos homens. Ele fez tudo apropriado ao seu tempo;

Também pôs no coração do homem o anseio pela eternidade; mesmo assim ele não consegue compreender inteiramente o que Deus fez;

Descobri que não há nada melhor para o homem do que ser feliz e praticar o bem enquanto vive;

Descobre também que poder comer, beber e ser recompensado pelo seu trabalho é um presente de Deus;

Sei que tudo o que Deus faz permanecerá para sempre; a isso nada se pode acrescentar e disso nada se pode tirar;

Deus assim faz para que os homens o temam;

Aquilo que é, já foi, e o que será, já foi anteriormente; Deus investigará o passado.

Descobri também que debaixo do sol: No lugar da justiça havia impiedade, no lugar de retidão, ainda mais impiedade.

Fiquei pensando: O justo e o ímpio, Deus julgará ambos, pois há um tempo para todo propósito, um tempo para tudo o que acontece.

Também pensei: Deus prova os homens para que vejam que são como os animais.

O destino do homem é o mesmo do animal; o mesmo destino os aguarda. Assim como morre um, também morre o outro.

Todos têm o mesmo fôlego de vida; o homem não tem vantagem alguma sobre o animal.

Nada faz sentido! Todos vão para o mesmo lugar; vieram todos do pó, e ao pó todos retornarão.

Quem pode dizer se o fôlego do homem sobe às alturas e se o fôlego do animal desce para a terra?

Por isso concluí que não há nada melhor para o homem do que desfrutar do seu trabalho, porque esta é a sua recompensa. Pois, quem poderá fazê-lo ver o que acontecerá depois de morto?

Adaptado de Eclesiastes: 3 (Bíblia de estudo Joyce Meyer)

A Deus toda a honra, toda glória e todo louvor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que com seu amor sublime para com a minha vida me concede força pra superar os obstáculos e dificuldades da vida cotidiana.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por oferecer um ensino público, gratuito e de qualidade, fundamental para minha formação profissional e por esses anos de amadurecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e todo seu corpo docente pela minha formação na docência e na pesquisa.

Ao meu orientador, o professor Adivaldo Henrique da Fonseca, pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos e principalmente pelo bom convívio durante esses anos de trabalho.

Aos colaboradores do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio do Projeto Sanidade Animal, Bruna de Azevedo Baêta, Matheus Dias Cordeiro, Priscila Nunes, Gustavo Nunes de Santana Castro, Ricardo de Oliveira Barbosa, Bruna Land, Lucinéia Costa, Vanessa de Almeida Raia, Carla Carolina Dias Uzedo, Jenevaldo Barbosa da Silva, Rafaella Câmara Teixeira e Jéssica Fernandes de Souza pelo auxílio indispensável durante toda a fase experimental deste trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar e principalmente a Charles Passos Rangel que mesmo estando longe contribuiu com incentivo e ânimo para o desenvolvimento do estudo e manutenção desta linha de pesquisa.

A todos os funcionários da secretaria do Departamento de Parasitologia Animal pelo auxílio bem como demais funcionários.

Ao setor de cunicultura em especial aos funcionários Sr. Pedro e Sr. Natalino pelo fornecimento dos animais utilizados no estudo.

À Marília Massard da Fonseca, pela forma amorosa que sempre nos recebeu em sua casa.

Aos grandes amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Íris Soares, Vivian Suane, Aline Quintanilha, Patrícia Barizon Cepeda e Marcio Barizon Cepeda pelos momentos de descontração compartilhados e por me ajudarem a evoluir emocional e espiritualmente.

Aos grandes e eternos amigos conquistados desde a minha chegada à Universidade Rural, Renata Lanna dos Santos, Natália Lores, Ana Carolina de Moraes, Daniele Regis, Simone Bezerra Calado, Jully Aparecida Silva de Moraes, Fabrícia Ferreira e Ferreira, George Eduardo Gabriel Kluck, Guinever Eustáquio do Império, Gabrielle Friess, Aluísio Alves, Nathalia Carvalho, Jéssica Ferreira, Constanza Villardi, Andressa Guimarães, Andressa Mothé, Dwany Carvalho e Adriano Coimbra bem como os demais integrantes da turma Med. Vet. 2006 I pelos 6 anos de convivência.

Ao professor Sérgio Reys que desde a graduação contribui para meu crescimento pessoal e acadêmico com seus sábios conselhos.

A Luciene Soares, Ariane Barcellos, Jéssica e Tânia por me aproximarem cada vez mais de Deus nestes tempos difíceis como também a todos os membros da Primeira Igreja Batista de Seropédica (PIBs) pelo acolhimento e especialmente ao grupo MIMOSOL pelos momentos de comunhão.

Aos amigos de infância Leonardo Valentim e Grasielle Lacerda por sempre estarem presentes como também pela amizade e boa convivência durante esses anos por compartilharem suas experiências e entusiasmo pela vida.

A minha grande amiga Jamili Suhel Mussi por sua amizade fiel e por compartilhar experiências profissionais e pessoais nestes muitos anos.

A todos os meus familiares, que sempre incentivaram e apoiaram meu crescimento pessoal e profissional.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante o Mestrado.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

BIOGRAFIA

Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, filha de José de Almeida Valim e Irene Rodrigues de Almeida, nasceu no município de Belford Roxo, Estado do Rio de Janeiro. cursou o ensino fundamental no Colégio São Francisco de Assis. Em 2001 concluiu o ensino médio no Centro de Ensino Atualizado no Bairro de Heliópolis, Município de Belford-Roxo, Estado do Rio de Janeiro. No ano de 2006, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em dezembro de 2011. Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, dentre elas: Clínica e Cirurgia de pequenos e grandes animais. Foi monitora das disciplinas de Parasitologia Veterinária II e Doenças Parasitárias. Em março de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na Área de Parasitologia Veterinária, nível Mestrado, da UFRRJ, onde foi Bolsista da CAPES. Atualmente obteve aprovação no Programa de Pós-graduação nível doutorado.

RESUMO

VALIM, Jaqueline Rodrigues de Almeida. **Ponteiras plásticas na alimentação artificial de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) parcialmente ingurgitadas.** 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A alimentação artificial de carrapatos vem sendo utilizada para estudar a relação entre vetores e agentes patogênicos, aspectos biológicos, para testar acaricidas e para minimizar a utilização de animais em estudos científicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do peso inicial, do período de alimentação e da temperatura ambiente no ganho de peso e nos parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* parcialmente ingurgitadas alimentadas artificialmente com um novo dispositivo de alimentação (ponteiras plásticas). Além disso, foram analisados também o ganho de peso das fêmeas e a influência da técnica nos aspectos biológicos da fase não parasitária desta espécie, bem como a influência de duas temperaturas 27°C e 37°C. O experimento foi realizado em três etapas: na primeira, os carrapatos foram divididos em quatro grupos com diferentes faixas de peso e submetidos à alimentação artificial por 36 horas. Posteriormente, carrapatos com faixa de peso que obteve melhor resultado na primeira etapa foram separados em quatro grupos de peso homogêneo e submetidos a diferentes períodos de alimentação: seis, 12, 24 e 36 horas. Na terceira etapa, as fêmeas foram alimentadas em duas temperaturas durante o melhor período de tempo encontrado na segunda fase. Os melhores ganhos de peso foram obtidos com fêmeas parcialmente ingurgitadas pesando entre 36 e 80mg, alimentadas a partir de 24 horas. A utilização da técnica com o novo dispositivo não alterou a oviposição das fêmeas, assim como os demais parâmetros biológicos avaliados. Além disso, observou-se que a alimentação dos grupos nas temperaturas de 27°C e 37°C não influenciou no ganho de peso e na biologia das fêmeas de *R. sanguineus*. Embora as fêmeas de *R. sanguineus* não tenham apresentado ingurgitamento total, a técnica de alimentação artificial utilizando o novo dispositivo em fêmeas oriundas de coelhos, não apresentou efeitos deletérios sobre o potencial biótico do ixodídeo em questão. Esse novo dispositivo tem grande potencial para o desenvolvimento de estudos que visem à transmissão de bioagentes, uma vez que proporciona maior ingestão de sangue por carrapatos ixodídeos.

Palavras-chave: ingestão, carrapato marrom do cão, dispositivos.

ABSTRACT

VALIM, Jaqueline Rodrigues de Almeida. **Plastic tips on the artificial feeding female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) partially engorged.** 2014. 40 p. Dissertation (Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Artificial feeding of ticks can be used to study the relationship between vectors and pathogens, biological aspects, to test acaricides and to minimize the use of animals in scientific studies. The aim of this study was to evaluate the influence of the initial weight, feeding period and temperature on weight gain and biological parameters of the non-parasitic phase of partially engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* that were artificially fed using a new feeding device (plastic tips). Moreover, we also analyzed the weight gain of the females and the influence of the technique on biological aspects of non-parasitic phase of this species, as well as the influence of different temperatures 27°C and 37°C. The experiment was conducted in three stages: first, the ticks were divided into four groups with different weights and were subjected to artificial feeding for 36 hours. Subsequently, ticks with the same weight range as the ticks with the best results in the first stage were separated into four groups of homogeneous weight and were subjected to different feeding periods: 6, 12, 24 and 36 hours. In the third stage, the females were fed at two temperatures for the best length of time found in the second stage. The best weight gains were obtained with partially engorged females weighing between 36 and 80 mg, fed for 24 hours. Using the technique for the new device did not alter the females' oviposition, or any other parameters evaluated. Furthermore, it was observed that feeding the groups at temperatures of 27 °C and 37 °C did not affect the weight gain and biology of *R. sanguineus* females. Although the females of *R. sanguineus* had not been submitted to complete engorgement, the technique of artificial feeding of females derived from rabbits, no deleterious effects on the biotic potential in tick question. This new device has great potential for development of studies on bioagent transmission, since it provides higher intake of blood by ixodid ticks.

Key words: intake, brown dog tick, device.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Peso médio de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> antes e depois da alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas, bem como seus ganhos médios de peso, após um período de alimentação de 36 horas.	18
Tabela 2. Parâmetros biológicos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas nas quatro faixas de peso no período de 36 horas.	20
Tabela 3. Pesos médio das fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e o ganho médio de peso das fêmeas na faixa de 36-80mg, após alimentação artificial por 6,12,24 e 36 horas utilizando ponteiras plásticas.	21
Tabela 4. Parâmetros biológicos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas nos quatro períodos de alimentação na faixa de peso compreendida entre 36 a 80mg.	24
Tabela 5. Pesos médio de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (36-80mg), antes e depois da alimentação artificial por 24 horas em duas diferentes temperaturas.	25
Tabela 6. Parâmetros biológicos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas nas quatro faixas de peso no período de 24 horas em duas diferentes temperaturas.	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ganho médio de peso de <i>Dermacentor nitens</i> , <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após seis, 12 e 24 horas de alimentação artificial. (Dados compilados de, Rangel et al., 2008, SAKAI, 2010 e RANGEL, 2011).	6
Figura 2. Ganho médio de peso de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após 6, 12 e 24 horas de alimentação artificial. (Dados compilados de SAKAI, 2010 e CUNHA et al., 2010).	8
Figura 3. Material utilizado e adaptações metodológicas para a disposição das fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> com angulação adaptada para 25°.	14
Figura 4. Ganho médio de peso (mg) de fêmeas de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> nas quatro faixas de peso.	17
Figura 5. Peso inicial de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em função do peso final (mg) nas quatro faixas.	19
Figura 6. Ganho médio de peso(mg) de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> nos quatro períodos de alimentação.	22
Figura 7. Ritmo de Postura Diário das fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> alimentadas nos quatro diferentes períodos.	23
Figura 8. Ganho médio de peso das fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> alimentadas nas temperaturas de 27°C e 37°C	26
Figura 9. Ritmo de Postura Diário das fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> alimentadas na temperatura de 27°C e 37°C	26

LISTA DE ABREVIACOES

BOD	“Biological Oxygen Demand”-Demanda Biológica de Oxignio
IEN	Índice de Eficiência Nutricional
IPO	Índice de Produção de Ovos
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
mg	miligramas
T	Temperatura
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
U	Umidade
%	Porcentagem
CO ₂	Dióxido de Carbono

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	O Carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	3
2.2	Alimentação Artificial	3
2.2.1	Alimentação artificial de carrapatos por meio de tubos capilares	4
2.2.2	Alimentação artificial de carrapatos por meio de ponteiras plásticas	8
2.2.3	Aspectos do ciclo biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	9
2.2.4	Aspectos biológicos da fase não parasitária de fêmeas <i>Rhipicephalus sanguineus</i> obtidas de infestação experimental em coelhos (Temperatura de 27°C e Umidade relativa do ar igual ou superior a 80%).	10
2.3	Peso da fêmea ingurgitada	10
2.3.1	Período de pré-postura	11
2.3.2	Período de postura	11
2.3.3	Peso da postura	11
2.3.4	Índice de produção de ovos e Índice de eficiência nutricional	11
2.3.5	Percentual de eclosão	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1	Local do Experimento	12
3.2	Procedência e Manutenção da Colônia do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em Coelhos (Etapa 1)	12
3.3	Delineamento Experimental	13
3.3.1	Experimento 1 – Padronização das faixas de peso inicial de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> parcialmente ingurgitadas sobre o ganho de peso após alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas	13
3.3.2	Experimento 2 – Avaliação do período de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> por 6, 12, 24 e 36 horas	14
3.3.3	Experimento 3 – Avaliação da influência da temperatura na alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> por meio de ponteiras plásticas	15
3.4	Obtenção do Grupo Controle de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> de Infestação Experimental em Coelhos	15
3.5	Parâmetros Biológicos da Fase Não Parasitária de Fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
4	RESULTADOS.....	17
4.1	Experimento 1 : Padronização das Faixas de Peso Inicial de Fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> Parcialmente Ingurgitadas Sobre o Ganho de Peso após Alimentação Artificial Por Meio de Ponteiras Plásticas	17
4.2	Experimento 2 : Avaliação do Período de Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> nos Períodos de 6, 12, 24 e 36 horas	21
4.3	Experimento 3 : Avaliação da Influência da Temperatura na Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	25
5	DISCUSSÃO.....	27

5.1	Padronização do Peso Inicial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> Sobre o Ganho Médio de Peso quando Submetidas a Alimentação Artificial por meio de Ponteiros Plásticos	28
5.2	Avaliação da influência da Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>R.sanguineus</i> Obtidas de Infestação Experimental em Coelhos nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas	28
5.3	Avaliação das Temperaturas de 27 ⁰ C e 37 ⁰ C sobre a Alimentação Artificial e os Parâmetros Biológicos de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>R.sanguineus</i>	30
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
7	CONCLUSÃO.....	33
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

O carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), pertence à família Ixodidae e está amplamente distribuído no mundo, tendo boa adaptação nas Américas do Norte, Central e do Sul, nas regiões Leste e Oeste da Índia, China, Austrália, Micronésia, Sudeste da Europa, Madagascar e África (SOULSBY, 1966). Este carrapato é originário do continente africano, existindo aproximadamente 70 espécies do gênero *Rhipicephalus* (FREITAS et al., 1978). No Brasil, acredita-se que a introdução da espécie *R. sanguineus* tenha ocorrido por volta do século XVI, quando os colonizadores europeus e seus animais conquistaram as terras brasileiras (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* realiza ciclo de vida, necessitando de três hospedeiros para completar seu ciclo biológico que envolve os seguintes estádios: ovo, larva, ninfa e adultos macho e fêmea, sendo o estágio de fêmea o de maior importância no crescimento da população, já que é o único estágio que poderá dar origem a mais de um indivíduo (PAZ et al., 2008). Os cães são conhecidos como seus hospedeiros em áreas urbanas e rurais sendo comuns reinfestações, visto que cães parecem não desenvolver resistência aos carrapatos e as infestações ocorrem quase que exclusivamente em cães domésticos, no entanto, há relatos de hospedeiros alternativos como coelhos, felinos, pequenos ruminantes e equinos (LABRUNA et al., 2004). Atualmente, é considerado uma importante praga urbana e também nas áreas rurais, havendo a necessidade de atenção redobrada dos organismos de Saúde Pública, sendo ainda, motivo de constante preocupação entre os profissionais veterinários em seus locais de atendimento. Na saúde animal, *R. sanguineus* é considerado um dos carrapatos de maior importância médico-veterinária do mundo uma vez que é vetor natural das bactérias *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e dos protozoários *Babesia canis* (= *Babesia vogeli*), *Babesia gibsoni* e *Hepatozoon canis* (SMITH et al., 1976; GOTHE et al., 1989) e existem relatos de sua participação na transmissão de *Rickettsia rickettsii* para humanos no estado do Rio de Janeiro (CUNHA et al., 2009).

O estudo da biologia e interação deste ixodídeo com agentes patogênicos possui custo muito elevado demandando mão-de-obra e infraestrutura adequadas. A grande preocupação diz respeito ao frequente uso de animais em experimentações científicas, com isso o desenvolvimento e o aprimoramento da técnica de alimentação artificial em animais é de extrema importância, pois poderá contribuir para a análise de alguns aspectos biológicos e diminuir a quantidade de animais em experimentações, como também realizar o estudo de vacinas visto que é uma técnica de fácil execução e baixo custo. Além da utilização destes dispositivos para avaliação de parâmetros biológicos após a alimentação, a técnica é muito usada para a manutenção de colônias de carrapatos em laboratório como também quantificação da dose mínima necessária para infectar um vetor com um agente e este transmitir para a próxima geração (KEMP; INOKUMA, 1997; HOKAMA et al., 1987).

Dentre os dispositivos utilizados na alimentação artificial, as membranas naturais e artificiais para alimentar argasídeos tem apresentado grandes avanços, porém esta técnica não se adapta aos carrapatos ixodídeos, existindo uma dificuldade, pois a superfície da membrana não apresenta estímulos adequados para a alimentação. Tubos capilares demonstraram sua eficiência em diversos estudos com ixodídeos, revelando-se promissor para estudos de isolamento de agentes patogênicos (Rangel et al., 2008; Sakai, 2010). No Brasil, estudos de alimentação artificial por meio de tubos capilares foram realizados com fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Amblyomma cajenense* (Fabricius, 1787), *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887), *R. sanguineus* e *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897), a partir daí verificou-se que no final da alimentação sobre o hospedeiro ocorre a fase rápida de ingurgitamento (Abel, 2004; Rangel, 2008; Rangel et al., 2008; Sakai, 2010;).

Com objetivo de tornar a técnica eficiente, Rangel (2011) utilizou pela primeira vez ponteiras plásticas, realizando um estudo com o ixodídeo *Rhipicephalus microplus* através da alimentação artificial, os resultados demonstraram-se promissores. Destacando a aplicação prática da técnica de alimentação artificial por ponteiras plásticas e a importância do carrapato *R. sanguineus* como vetor de agente de doenças, o objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica de alimentação artificial

utilizando ponteiras plásticas para a espécie *R. sanguineus*, avaliando a influência da técnica sobre os parâmetros biológicos de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* parcialmente ingurgitadas em coelhos bem como verificar a influência de duas temperaturas (27°C e 37°C) nos parâmetros das fêmeas alimentadas deste ixodídeo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

Rhipicephalus sanguineus é o carrapato com maior distribuição geográfica dentre os demais ixodídeos (DANTAS-TORRES, 2008). Popularmente conhecido como “carrapato vermelho do cão” ou “carrapato dos cães”, seu hospedeiro natural é o cão doméstico e as populações caninas são as principais fontes de manutenção e responsáveis por explosões populacionais destes parasitos no ambiente (DANTAS-TORRES, 2008; SERRA-FREIRE, 2009). Porém, estes carrapatos podem vir a parasitar outros hospedeiros além de cães, inclusive humanos, principalmente ao crescente hábito de associação íntima desses com cães (DANTAS-TORRES et al., 2006; LOULY et al., 2006).

Esses carrapatos estão envolvidos no ciclo epidemiológico de várias doenças animais e de relevância para saúde pública, atuando como vetores biológicos e mecânicos, transmitindo vírus, bactérias, protozoários, filarioses e outros (DANTAS-TORRES, 2008). Em geral, a presença maciça deste carrapato está diretamente ligada ao aumento de cães soropositivos para *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, doenças com alta prevalência (LABRUNA et al., 2006; DANTAS-TORRES, 2008). Podem ainda atuar como bioagentes, causando as chamadas ixodidoses (SERRA-FREIRE, 2009). Recentemente o *R. sanguineus* vem sendo descrito como vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente causal da febre maculosa (Rocky Mountain Spotted Fever), doença com alta taxa de letalidade (DANTAS-TORRES, 2008b; EREMEEVA et al., 2011).

Atualmente, diante de mudanças no estilo de vida, o cão tem um contato cada vez maior com o homem, expondo-o aos agentes comuns entre as duas espécies. Vale ressaltar que *R. sanguineus* é o vetor de *Rickettsia conorii* para humanos na Europa, agente da febre botonosa e também vetor da *Rickettsia rickettsii*, agente da febre maculosa no Brasil (LOULY et al., 2006). *R. sanguineus* desenvolve-se bem com altas densidades e tem alta prevalência em algumas cidades do Brasil, podendo causar aumento da incidência de outras enfermidades tais como a babesiose e a febre maculosa que são zoonoses emergentes (FERNANDES, 2000). Estudos afirmam que pessoas que vivem em ambientes com cães muito parasitados por *R. sanguineus* podem ser incluídas no grupo de risco para o parasitismo pelo ixodídeo (DANTAS-TORRES et al., 2006).

2.2 Alimentação Artificial

De modo geral a alimentação artificial além de permitir a manutenção de colônias em laboratório, expõem artrópodes hematófagos aos agentes patogênicos, sem a utilização de hospedeiros infectados além de fornecer uma variada fonte de alimentação para fins experimentais (DE LA VEJA et al., 2000; WALKER et al., 1979). O tempo de exposição, a fonte de alimentação variam de acordo com os objetivos do estudo e a espécie em questão. Membranas naturais e artificiais foram utilizadas em muitos estudos com carrapatos argasídeos visto que este dispositivo não favorecem a alimentação para os ixodídeos que demandam maior tempo de exposição as estruturas (JOYNER; PURNELL, 1968; KEMP et al., 1975; MOURA et al., 1997).

Várias são as tentativas de ingurgitamento e avaliação dos aspectos biológicos em carrapatos alimentados artificialmente. O grande objetivo é minimizar o número de hospedeiros vertebrados necessários à manutenção de colônias desses artrópodes em laboratório. Nesses estudos podem ser utilizados carrapatos em diferentes estágios de desenvolvimento. Em geral, são utilizados carrapatos adultos em jejum, que logo após exposição aos capilares são colocados sobre seus hospedeiros para completarem sua alimentação, ou, então, carrapatos adultos previamente alimentados, por algumas horas, em animais de laboratório. Neste caso, os períodos de exposição ao hospedeiro variam de acordo com a espécie de carrapato e com os objetivos do estudo. Kocan et al. (2005) observam-se diferenças nos estudos de infecção de carrapatos, destacando que este sistema de alimentação artificial pode apresentar uso potencial para identificar aspectos de interações patógeno-vetor que não são reconhecidas nos carrapatos alimentados naturalmente.

Durante a década de 90 a técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares foi aplicada em estudos sobre as propriedades antigênicas e do conteúdo de prostaglandinas E2 da saliva dos carrapatos (BENAVIDES; WALKER, 1992; INOKUMA et al., 1994), anos mais tarde Almazán et al. (2005) alimentaram artificialmente o carrapato *Ixodes scapularis* por meio de tubos capilares para a detecção de antígenos capazes de induzir uma resposta vacinal a várias espécies de carrapatos. No entanto, uma maior aplicabilidade desta técnica está associada a estudos envolvendo a transmissão *in vitro* de agentes patogênicos para então avaliar interação patógeno-vetor.

Considerando que os vetores amplificam a espiroqueta *B. burgdorferi*, a alimentação artificial das espécies de carrapatos envolvidas na sua transmissão, por meio do aperfeiçoamento da técnica utilizando ponteiras plásticas com sangue de pacientes, parece um método bastante promissor para o isolamento e identificação do agente etiológico desta doença no Brasil (projeto financiado pela FAPESP, Barros-Battesti, D. M. dados não publicados).

2.3.1 Alimentação artificial de carrapatos por meio de tubos capilares

A primeira proposta de estudo que empregou a alimentação artificial por meio de tubos capilares em carrapatos ixodídeos foi feita por Gregson (1937). Posteriormente Chabaud (1950) alimentou artificialmente *Hyalomma excavatum* (Koch, 1844), *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (citado como *Dermacentor pictus*) e *R. sanguineus*.

Na década de 50 ocorreu o primeiro relato de utilização da técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares em estudos envolvendo a transmissão de patógenos. Este estudo foi desenvolvido nos Estados Unidos por Burgdorfer (1957), que alimentou artificialmente machos e fêmeas de *Dermacentor andersoni* (Stiles, 1908) e *Amblyomma maculatum* (Koch, 1844) com uma suspensão da bactéria *Leptospira pomona* por quatro a seis horas. Finalizado o período de alimentação *in vitro* esses carrapatos foram expostos sobre cobaias, que tornaram-se infectados com *L. pomona*. No mesmo estudo, os autores utilizaram metodologia semelhante na tentativa de transmissão do vírus rábico pelo carrapato *D. andersoni*, sendo observada a eficiência da técnica na transmissão do referido patógeno.

Na África, Purnell e Joyner (1967) utilizaram a técnica de tubos capilares para demonstrar a ocorrência do processo de salivação dos carrapatos durante o período de alimentação *in vitro*. Os autores utilizaram fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901) previamente infectadas com *Theileria parva* (Theiler, 1902), e após a alimentação artificial, verificaram que estes carrapatos foram capazes de contaminar os capilares com sangue livre de infecção.

Até o momento não há relatos de ingurgitamento total em relação aos carrapatos ixodídeos, entretanto estudos realizados na França por Rau e Hannoun (1968) obtiveram sucesso ao alimentar adultos e ninfas do carrapato argasídeo *Argas reflexus reflexus* (Fabricius, 1794) por meio de tubos capilares, com sangue de frango ou pombo heparinizado. Os autores observaram que houve o ingurgitamento total dessas fêmeas as quais fizeram posturas férteis e as ninfas mudaram para os próximos estágios, não havendo, portanto interferência na biologia do carrapato.

Certos do potencial da técnica, pesquisadores empregaram ainda a alimentação artificial com os objetivos de avaliar a especificidade de carrapatos ixodídeos e a relação destes com seus hospedeiros. Na Austrália, Willadsen et al. (1984) alimentaram artificialmente fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (citado como *Boophilus microplus*) por meio de tubos capilares contendo sangue de bovinos, coelhos, ratos e cobaias. Os autores verificaram que os carrapatos foram capazes de ingerir todos os tipos de sangue, mas o sucesso no ingurgitamento e na oviposição ocorreu apenas quando os carrapatos foram alimentados com sangue do hospedeiro natural, demonstrando assim a alta especificidade deste ixodídeo.

Na Suíça, Lösel et al. (1993) avaliaram o comportamento de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. appendiculatus* alimentadas por meio de tubos capilares contendo soro de coelhos previamente infestados com carrapatos e soro obtido dos mesmos animais antes da infestação. Os resultados revelaram ganho de peso significativamente menor quando as fêmeas foram alimentadas com soro de coelhos infestados. Os autores utilizaram ainda soro de bovinos neste estudo, e não observaram

diferença significativa no ganho de peso, demonstrando assim a resistência adquirida por animais de laboratório e a diferença entre o hospedeiro natural.

Na técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares o estágio e o grau de ingurgitamento dos carrapatos podem variar de acordo com o objetivo do estudo. De La Vega et al. (2000) obtiveram bons resultados ao alimentar artificialmente fêmeas de *R. microplus* recém mudadas, por meio de tubos capilares por 35 minutos utilizando sangue heparinizado ou desfibrinado de bovinos. Logo depois, estas fêmeas foram expostas novamente ao hospedeiro natural para completar o ingurgitamento. A alimentação artificial não prejudicou a biologia dos carrapatos, ou seu desenvolvimento posterior.

Em estudo proposto por Broadwater et al. (2002) ninfas do carrapato *I. scapularis* (Fay, 1821) foram alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares repletos com solução contendo *B. burgdorferi* (Johnson et al., 1984), o agente causador da Doença de Lyme, sendo observado que as ninfas infectadas *in vitro* mudaram para adultos e, que esses adultos quando alimentados em roedores de laboratório foram capazes de transmitir o patógeno.

Nos Estados Unidos Kocan et al. (2005) demonstraram o uso potencial deste sistema na identificação de aspectos sobre as interações entre patógenos e vetores quando infectaram artificialmente por meio de tubos capilares *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) com *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910). O principal objetivo foi criar um modelo alternativo para estudar esta interação. Primeiramente foi realizada a infecção *in vitro* de *D. variabilis* pré-alimentados em ovelhas por três dias, e, para tanto, foi empregado um sistema de alimentação *in vitro* baseado na metodologia proposta por Broadwater et al. (2002). O processo de alimentação teve duração de quatro dias e, portanto, trocas diárias dos capilares foram necessárias para garantir o acesso dos carrapatos a dietas frescas. Ao se comparar a infectividade de *A. marginale* em *D. variabilis* machos alimentados *in vitro* e em bovinos, os autores observaram diferenças. A infecção intestinal dos carrapatos alimentados por meio de tubos capilares foi detectada na PCR quando o sangue utilizado apresentou alta riquétsemia, além disso notou-se que nenhum dos carrapatos alimentados artificialmente desenvolveram infecção da glândula salivar. Os autores esclareceram que este sistema de alimentação artificial pode representar uso potencial para identificar aspectos de interações patógeno-vetor que não são reconhecidos nos carrapatos alimentados naturalmente.

Gonsioroski et al. (2012) testaram o efeito de imunoglobulinas na fisiologia do ixodídeo *R. microplus*, carrapatos pesando entre 25 e 60mg foram alimentados artificialmente por meio de tubos capilares. Os resultados revelaram um aumento de peso de 94 a 168% submetidos a um período de 24 horas de exposição aos dispositivos. Nos parâmetros de oviposição observou-se um decréscimo, provavelmente induzido pelos anticorpos monoclonais (BrBm2).

No Brasil as pesquisas envolvendo a alimentação artificial de carrapatos ixodídeos por meio de tubos capilares são recentes e foram desenvolvidas de maneira pioneira no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Entre os estudos realizados com as quatro principais espécies de carrapatos ixodídeos, *R. sanguineus* se destacou por apresentar o menor ganho de peso quando submetidos a essa técnica de alimentação *in vitro*, sugerindo a necessidade de adaptações metodológicas para a execução da técnica (Figura 1).

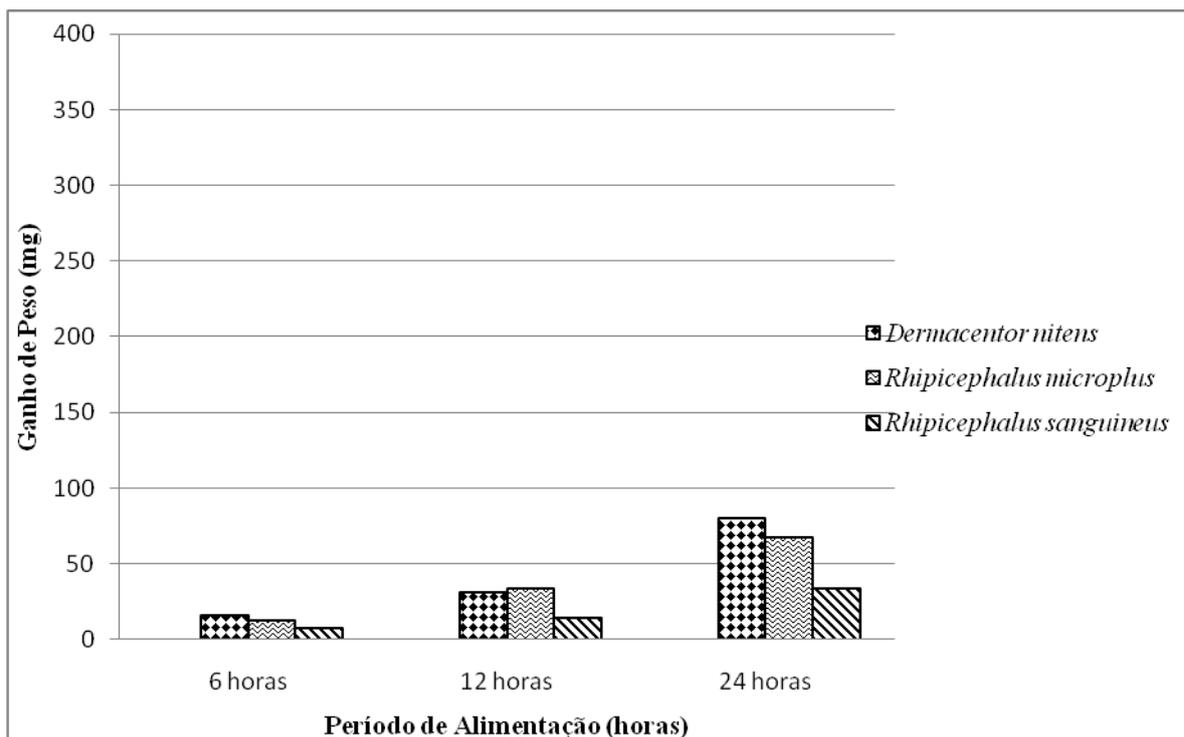


Figura 1. Ganho médio de peso de *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* após seis, 12 e 24 horas de alimentação artificial (Dados compilados de RANGEL et al., 2008, SAKAI, 2010 e RANGEL, 2011).

Iniciando os estudos sobre alimentação *in vitro* por meio de tubos capilares, *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) foi escolhida como espécie piloto por Abel (2004) no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ. Este trabalho foi realizado em duas etapas: na primeira foram utilizadas fêmeas previamente alimentadas em coelhos, que foram removidas antes do término do ingurgitamento e submetidas à alimentação por meio de tubos capilares por períodos de 2, 6 e 12 horas com sangue citratado bovino. O ganho de médio de peso foi significativo a partir de 2h. Na segunda etapa, fêmeas com 45 dias de jejum foram alimentadas com sangue citratado da espécie bovina utilizando tubos capilares por diferentes períodos de tempo: 12, 24 e 48 horas, duas horas por dia e seis horas por dia durante oito dias consecutivos, sendo cada grupo composto por 20 carrapatos, logo depois os carrapatos foram expostos a coelhos para completar a alimentação. Os resultados revelaram que os grupos alimentados por 24 horas, por oito dias durante duas horas por dia e o grupo alimentado por oito dias por seis horas por dia apresentaram maior ganho de peso, não havendo diferença estatística entre eles.

Após o sucesso da utilização de capilares na alimentação de *A. cajennense*, a equipe do LDP da UFRRJ decidiu aprofundar os estudos nessa linha de pesquisa com a espécie *R. microplus* por se tratar de uma espécie com grande importância econômica. Os primeiros estudos resultaram na dissertação de mestrado de Rangel (2008), que utilizou fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* alimentadas artificialmente com sangue citratado da espécie bovina por períodos de seis, 12, 24 e 36 horas, observando que as fêmeas alimentadas artificialmente não atingiram ingurgitamento total, os valores de ganho de peso foram 12,33mg, 33,41mg, 67,53mg e 79,47mg para os quatro referidos períodos de alimentação, observou-se também que a técnica utilizando tubos capilares não causou nenhum efeito deletério sobre parâmetros como Índice de Eficiência Nutricional (IEN) e Índice de Eficiência Reprodutiva (IER).

Para verificar a influência do peso inicial na alimentação artificial dos carrapatos, Rangel et al. (2008) desenvolveram um experimento com fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) oriundas de infestação natural em equinos. Duas faixas de pesos, 40 a 60 miligramas e de 61 a 100 miligramas, foram estabelecidas e para cada faixa de peso foram formados quatro grupos homogêneos. Em seguida as fêmeas foram alimentadas artificialmente por meio de

tubos capilares por seis, 12, 24 e 36 horas com sangue citratado bovino. Os autores verificaram que as fêmeas pertencentes ao grupo com maior peso inicial tiveram maior ganho de peso no final da alimentação em relação ao outro grupo, sugerindo que o peso inicial influencia no ganho de peso final após alimentação artificial. Neste estudo, os carrapatos alimentados artificialmente nas duas faixas de peso por períodos mais prolongados apresentaram parâmetros da fase não-parasitária próximos aos observados em condições de laboratório para essa espécie.

Em 2010, foram realizadas duas tentativas de alimentação por meio de tubos capilares do carrapato *R. sanguineus*. Cunha et al. (2010) avaliaram o ganho de peso de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* separando os carrapatos em quatro grupos homogêneos compostos por 10 fêmeas cada. Os grupos foram submetidos a diferentes tempos de alimentação: duas, seis, 12 e 24 horas, sendo observado que o peso dos grupos alimentados *in vitro* foi maior à medida que o tempo de exposição ao tubo capilar aumentou. Quanto aos parâmetros biológicos foi observada diferença significativa neste estudo entre os grupos experimentais alimentados por duas e 24 horas, no que se refere aos parâmetros biológicos não houve influência negativa sobre a fase não-parasitária do ixodídeo avaliado.

Sakai (2010) utilizou a técnica de tubos capilares para alimentar fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* previamente alimentadas em coelhos e cães. O objetivo principal foi avaliar o ganho de peso dos carrapatos e a influência da técnica nos aspectos biológicos da fase não parasitária desta espécie. Diversos experimentos foram realizados objetivando determinar as faixas de peso com melhor ganho de peso após 24 horas de exposição aos capilares. Posteriormente, avaliou-se o comportamento alimentar dos carrapatos nos períodos de seis, 12, 24, 36 e 42 horas. Na aplicação da técnica as fêmeas de *R. sanguineus* foram fixadas com a face ventral voltada para cima em bandejas de poliestireno com auxílio de fita adesiva dupla face. Os dispositivos contendo sangue citratado de cão foram posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos. Logo depois, as bandejas com os carrapatos dispostos foram mantidas a temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar superior a 80%. Após alimentação artificial, os carrapatos foram pesados para avaliação do ganho de peso, fixados em placas de Petri e mantidos sob as mesmas condições controladas de temperatura e umidade citadas anteriormente, para acompanhamento dos aspectos biológicos. Não foi observada diferença estatística na ingestão de sangue nas diferentes faixas de peso dos carrapatos previamente alimentados em coelhos. É importante destacar que nos carrapatos expostos aos capilares por períodos mais prolongados verificou-se maior ingestão de sangue. Apesar das fêmeas de *R. sanguineus* não terem apresentado ingurgitamento total, a técnica de alimentação em tubos capilares não desencadeou efeitos deletérios sobre os aspectos biológicos da fase não parasitária dessa espécie, visto que parâmetros como percentual de eclosão e peso da postura apresentaram valores em torno de 51% e 34,88mg, 65% e 38,81, 62% e 37,68mg, 75% e 44,43mg e 57% e 49,74mg, nos períodos de seis, 12, 24, 36 e 42 horas, respectivamente.

Os resultados encontrados para o ganho de peso das fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas por meio de tubos capilares nos estudos realizados por Cunha et al., (2010) e Sakai (2010) diferiram porque os autores partiram de pesos iniciais diferentes, isto demonstrou a necessidade de se avaliar outros fatores que podem influenciar na ingestão de sangue *in vitro* e na redução do tempo de exposição dos carrapatos aos capilares, bem como a busca por adaptações na metodologia e uso de dispositivos de alimentação buscando a maior eficiência da técnica (Figura 2).

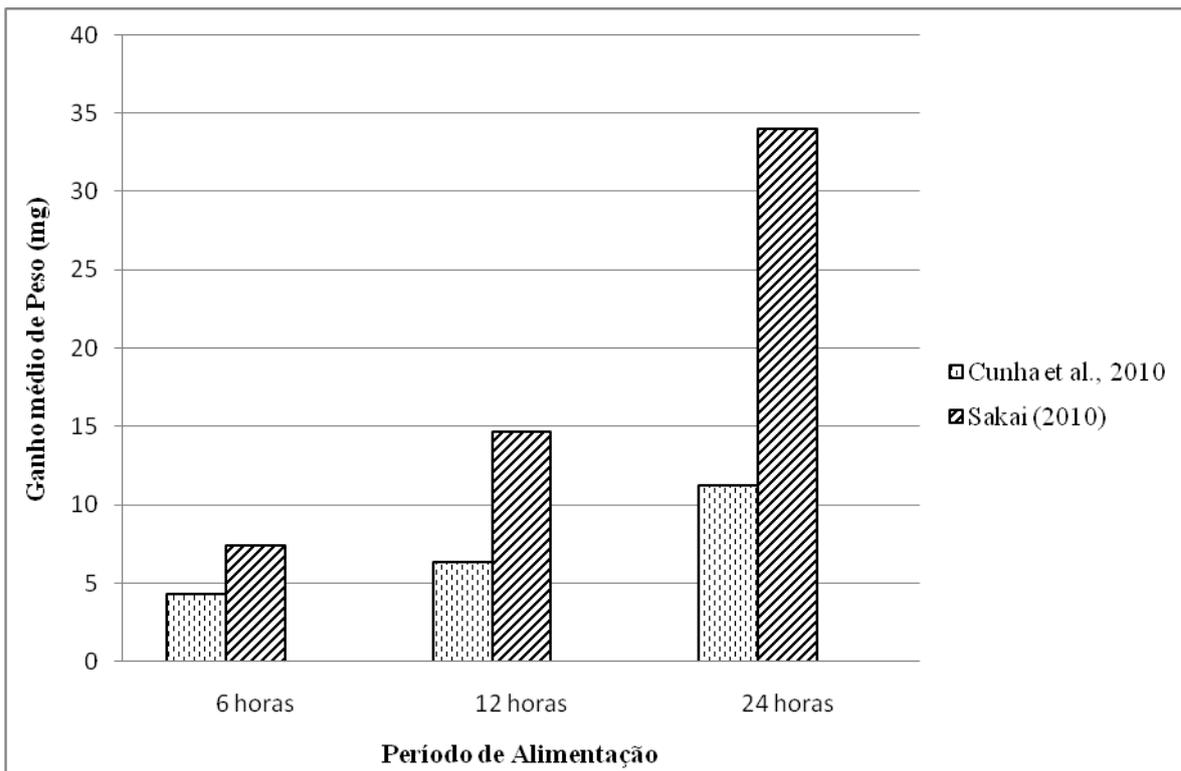


Figura 2. Ganho médio de peso de *Rhipicephalus sanguineus* após 6, 12 e 24 horas de alimentação artificial. (Dados compilados de SAKAI, 2010 e CUNHA et al., 2010).

2.3.2 Alimentação artificial de carrapatos por meio de ponteiras plásticas

Rangel (2011) realizou pela primeira vez a técnica de alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas, que teve como principal objetivo o aprimoramento da técnica fazendo com que o tempo de alimentação fosse reduzido e as fêmeas parcialmente ingurgitadas ingerissem maior quantidade de sangue. O dispositivo demonstrou-se eficiente, uma vez que não ocorreu o ressecamento do sangue no interior das ponteiras, possibilitando a alimentação dos carrapatos de forma contínua sem a necessidade de substituição do conteúdo dos dispositivos. Durante a realização do estudo foram avaliados os efeitos das faixas de peso inicial dos carrapatos, o intervalo entre a coleta e o início da alimentação artificial, bem como a influência de diferentes formas de apresentação do sangue bovino, temperaturas e dispositivos adaptados para a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*. Neste estudo o autor constatou que as fêmeas com peso inicial de 40 a 69mg apresentaram maior tendência de ganho de peso sendo capazes de retomar seu processo de alimentação, mesmo após um intervalo de até 12 horas entre a coleta dos carrapatos e o início da alimentação *in vitro*. Além disso, verificou-se que independente da forma como o sangue bovino foi apresentado, os carrapatos alcançaram grau de ingurgitamento equivalente. Quando alimentados sob a temperatura de 37°C, não foi observada diferença estatística entre o peso das fêmeas alimentadas por 12 e 24 horas. A utilização de ponteiras plásticas permitiu a ingestão contínua de sangue, sem que fosse necessária a realização de trocas sucessivas das ponteiras plásticas, de forma que fêmeas com peso médio inicial de 48,9mg apresentaram peso médio final de 200,17mg. A técnica não apresentou efeito deletério sobre os aspectos biológicos da fase não-parasitária de *R. microplus*. Os resultados na comparação entre os grupos experimentais, o menor peso da postura foi observado em fêmeas alimentadas sob temperatura de 32°C por 12 horas, que apresentaram média de 36,65mg. Na avaliação da influência da temperatura na realização da técnica foi realizada a comparação entre a alimentação por meio de tubos capilares e ponteiras plásticas. No grupo exposto a tubos capilares em ambiente controlado à temperatura de 32°C por 24 horas, o peso médio foi de 64,90mg, considerado

estatisticamente igual aos pesos médios de 68,20mg e 75,12mg obtidos para a postura nos grupos de carrapatos alimentados por meio de tubos capilares em ambiente de 37°C por 12 e 24 horas, respectivamente. Foi observado peso médio da postura superior, 100,94mg, no grupo de carrapatos alimentados por meio de ponteiras plásticas em estufa a 37°C por sete horas, que diferiu estatisticamente dos demais grupos alimentados *in vitro*. Este estudo contribuiu para a amplificação das pesquisas envolvendo a transmissão de bioagentes, uma vez que proporcionou o aperfeiçoamento da técnica.

2.2.1 Aspectos do ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*

Em geral o ciclo vital de *R. sanguineus* bem como os demais membros da família Ixodidae apresenta quatro estágios de desenvolvimento, sendo que três destes são ativos e dependem do repasto sanguíneo para desempenho pleno de suas funções biológicas (FACCINI; BARROS-BATTESTI, 2006). Os estágios comuns aos ixodídeos são ovo embrionado, larva, ninfa e adultos (SONENSHINE, 1991; SERRA-FREIRE, 2009).

Durante seu ciclo de vida os carrapatos apresentam duas fases distintas, a de vida livre e a parasitária (SERRA-FREIRE, 2009). Ambas as fases são importantes no desenvolvimento do parasito e se complementam. A fase parasitária ocorre sobre o hospedeiro, a larva eclode realiza o repasto sanguíneo se desprendendo ao ambiente, faz a ecdise, atingindo o estágio de ninfa, alcança novo hospedeiro, realiza novo repasto sanguíneo, se desprende, faz ecdise e atinge o estágio de adulto, este por sua vez, faz repasto num novo hospedeiro (SONENSHINE, 1991; SERRA-FREIRE, 2009). *R. sanguineus* é uma espécie de carrapato trioxeno, ou seja, em cada estágio ativo de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto) se alimenta apenas uma vez e a muda (ecdise) ocorre no ambiente em que vive e mantém relação com seu hospedeiro (GUGLIELMONE et al., 2006; BARROS-BATTESTI, 2006; DANTAS-TORRES, 2008).

As teleóginas de *R. sanguineus* podem chegar a pesar até 250mg e chegam a ovipor cerca de 4.000 ovos durante uma postura ininterrupta. A quantidade de ovos que uma fêmea de carrapato ovipõe está relacionada ao seu peso corporal (GUGLIELMONE et al., 2006; DANTAS-TORRES, 2008; DANTAS-TORRES, 2010). Após seu desprendimento, a teleógina realiza a postura, para isso ela busca abrigos onde passa pelo período de pré-oviposição. Estes abrigos são tidos como estratégias que estes artrópodes utilizam para fugir de possíveis predadores e depositar seus ovos o mais perto possível de prováveis hospedeiros (DANTAS-TORRES, 2010).

O período de pré-oviposição pode variar entre três a 14 dias e a oviposição pode durar até 21 dias. As larvas e as ninfas quando fixadas em seus hospedeiros alimentam-se de três a cinco dias e de cinco a sete dias, respectivamente. Uma vez fora de seus hospedeiros as metalarvas e metaninfas fazem a ecdise em um período aproximado de oito a 11 dias e de 11 a 23 dias, respectivamente, sob condições ideais (GUGLIELMONE et al., 2006; DANTAS-TORRES, 2008; SERRA-FREIRE, 2009). As fêmeas adultas podem se alimentar por períodos de cinco a 21 dias (KOSHY et al., 1983; PEGRAM et al., 1987; PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947) e o ingurgitamento pode modificar a compreensão de alguns caracteres. Em *R. sanguineus*, os espinhos da coxa I, que normalmente alcançam a coxa II nas fêmeas não ingurgitadas podem não fazê-lo nos espécimes ingurgitados. Isto porque a cutícula entre as coxas I e II se expande durante o ingurgitamento, separando-as (BARROS-BATTESTI, 2006; JITTAPALAPONG et al., 2000; KOCH, 1982; PEGRAM et al., 1987; SWEATMAN, 1967).

Após a eclosão dos ovos surgem as larvas, que são extremamente pequenas, medindo 0,54mm de comprimento e 0,39mm de largura, possuem apenas três pares de pernas e, quando não alimentadas podem sobreviver por até 8 meses (GODDARD, 1987). As ninfas possuem quatro pares de pernas e se assemelham aos adultos, exceto por serem menores e não possuir abertura genital, medindo de 1,14mm a 1,3mm de comprimento e 0,57mm a 0,66mm de largura, podendo pesar 0,29mg após período de quatro dias de alimentação (SARTOR, 1994). Geralmente, o tempo estimado para que as ninfas se tornem adultas é de até 47 dias (PEGRAM et al., 1987; PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947).

O número de gerações anuais de *R. sanguineus* é incerto, pois, em períodos frios pode haver prolongamento nos tempos requeridos para muda, oviposição e incubação (BARROS-BATTESTI, 2006). As condições climáticas e a latitude são os principais fatores reguladores do ciclo biológico dos carrapatos. A temperatura exerce um papel dominante, regulando a duração de cada fase de desenvolvimento passada fora do hospedeiro (oviposição e incubação dos ovos), incluindo os períodos de ingurgitamento e ecdise. Aparentemente existe uma forte relação entre a temperatura e o tamanho da população de *R. sanguineus*, tendo em vista que estes ixodídeos são mais abundantes em número de espécies em locais mais úmidos, sendo que algumas espécies podem sobreviver em jejum por pouco mais de um ano (BARROS-BATTESTI, 2006; DANTAS-TORRES et al., 2012).

Durante a busca por hospedeiros os carrapatos utilizam várias estratégias como comportamentos de busca ativa e de emboscada. Independente de qual seja a estratégia principal adotada pelo carrapato ele se utiliza de situações inerentes ao metabolismo de seus hospedeiros, como substâncias eliminadas ou até mesmo mecanismos de regulação térmica (SERRA-FREIRE, 2009). Quanto a busca por hospedeiros *Rhipicephalus sanguineus* é um carrapato que preferencialmente adota a estratégia de busca ativa por seus hospedeiros, usando como estímulos o CO₂ (SONENSHINE, 1993; LOULY, 2003). Esses padrões comportamentais foram adquiridos de acordo com a evolução das duas espécies envolvidas na relação parasito-hospedeiro (DANTAS-TORRES, 2010).

No processo de alimentação primeiramente os carrapatos caminham sobre a pele do hospedeiro, tocando-a com a extremidade dos palpos maxilares, onde localizam-se estruturas sensoriais. Assim que é encontrado o ponto adequado, prendem-se firmemente e forçam o hipostômio, que possui fileiras de dentes quitinosos dirigidos para trás contra a pele do hospedeiro, penetrando-a lentamente e funcionando como um órgão de fixação ao animal durante todo o repasto sanguíneo. As quelíceras também penetram na pele e com movimentos cortantes dilaceram-na (REY, 1973).

Em relação ao tamanho, machos e fêmeas são semelhantes, sendo que as fêmeas medem de 2,4 a 2,7mm de comprimento; de 1,44 a 1,68mm de largura; e os machos medem em média de 2,28 a 3,18mm de comprimento; de 1,11 a 1,1,68mm de largura. Ambos têm formas alongadas e cor marrom-avermelhadas com pequenas pontuações espalhadas ao longo do escudo dorsal, exceto quando as fêmeas estão ingurgitadas, quando aumentam a porção do corpo tornando-se mais largas, de cor esverdeada e podendo atingir o peso de 115mg após sete dias de repasto sanguíneo (COOLEY, 1946; DANTAS-TORRES, 2008; SARTOR, 1994).

2.2.4 Aspectos Biológicos da fase não parasitária de Fêmeas *Rhipicephalus sanguineus* Obtidas de Infestação Experimental em Coelhos (Temperatura de 27°C e Umidade relativa do ar Igual ou Superior a 80%).

2.3 Peso da fêmea ingurgitada é compreendido como o peso das fêmeas após a alimentação artificial e oriundas de queda natural.

Cunha et al. (2010) ao alimentar artificialmente por meio de tubos capilares fêmeas de *R. sanguineus* oriundas de coelhos, observaram pesos médios das fêmeas 66,0; 60,10 e 73,60 mg após alimentação artificial com sangue citratado canino utilizando de tubos capilares por 6,12,24 horas, respectivamente. Ao estudar os parâmetros de oviposição no Brasil, Coelho (1993), obteve fêmeas ingurgitadas com peso variando entre 82,60 a 228,60mg e com peso de 166,02mg. Verificando os aspectos biológicos de fêmeas ingurgitadas em coelhos, Bellato e Daemon (1997), obtiveram espécimes com pesos variando de 128,50 a 236,0mg e peso médio de 178,80mg. Bastos (1997) ao analisar o poder infestante de fêmeas com diferentes idades obteve pesos médios de 173,39; 171,59 e 181,66mg ao utilizar fêmeas com idades de 15,30 e 45 dias, respectivamente. O efeito de diferentes razões sexuais sobre a fase parasitária e não parasitária, obteve fêmeas com peso variando entre 22,70 a 225,30mg e peso médio de 148,63mg foi avaliado por Amorim (1998), Penna (1999) ao estudar a biologia de *R. sanguineus* quando imersos em água destilada, obteve fêmeas com peso médio de 151,40mg.

Pinto (2000) ao estudar a sensibilidade natural do carrapato frente à diferentes raças de coelhos observou fêmeas com pesos médios de 142,83; 151,07 e 121,13mg, obtidas de coelhos das raças Califórnia, Nova Zelândia e Mestiços (Nova Zelândia x Califórnia), respectivamente.

Szabó et al. (2005) ao estudarem os aspectos biológicos da espécie, observaram peso médio das fêmeas ingurgitadas de 173,40mg. Melo (2007) obteve fêmeas ingurgitadas com peso variando de 79,0 a 244,0mg, e peso médio de 148,34mg. Sakai (2010) obteve fêmeas ingurgitadas com peso variando de 61,32 a 90,33.

2.3.1 Período de Pré-postura tido como o período em dias entre o término da alimentação das fêmeas até o primeiro dia da postura.

Em relação ao período médio de pré-postura Cunha et al. (2010) obteve valores de 4,10; 4,0 e 4,10 dias e 6,90. Coelho (1993) observou que as fêmeas alimentadas em coelhos tiveram um período de pré-postura de 3,85 dias. No estudo conduzido por Bellato e Daemon (1997) o período de pré-postura variou de 2,0 a 4,0 dias, com média de 3,19 dias. Bastos (1997) verificou períodos médios de pré-postura de 4,13; 4,67 e 4,80. Amorim (1998) observou que os períodos de pré-postura variaram de 3,0 a 21,0 dias, com média de 15,0 dias, Penna (1999) verificou período médio de pré-postura de 4,30 dias. Pinto (2000) obteve períodos médios de pré-postura de 3,72; 3,77; 3,37 dias. Szabó et al. (2005) obteve período médio de pré-postura de 2,50 dias. Os períodos de pré-postura no experimento conduzido por Mello (2007) foram de 1,0 a 3,0 dias, com média de 1,80 dias. Os períodos de pré-postura no estudo realizado por Sakai (2010) foram de 3,80 a 3,20 dias.

2.3.2 Período de Postura avaliado como o primeiro e o último dia de postura de cada fêmea, sendo que a partir da separação e pesagem diária da postura de cada fêmea foi verificado o ritmo de postura diário.

O Período de Postura observado por Cunha et al. (2010) foi de 6,90; 7,60 e 6,90 dias, Coelho (1993) verificou que o período médio de postura foi de 10,81 dias. De acordo com Bellato e Daemon (1997) o período de postura foi de 9,0 a 18,0 dias com média de 13,71 dias. período médio de postura de 12,10 dias. Pinto (2000) obteve períodos de postura de 12,75; 13,73; 14,07 dias. Mello (2007) obteve período de postura de 8,0 a 15,0 dias, com média de 11,40 dias, Piranda et al. (2008) ao estudarem o efeito da temperatura sobre a viabilidade das fêmeas verificaram período médio de postura de 14,70 dias, variando de 9,0 a 18, dias, já no estudo conduzido por Sakai (2010) obteve período de postura de 12,70 a 14,70 dias.

2.3.3 Peso da Postura foi calculado com base no peso total das posturas diárias de cada fêmea.

Os pesos médios das posturas foram de 42,60; 46,90 e 41,60mg, respectivamente, para o estudo realizado por Cunha et al (2010). Bellato e Daemon (1997) obteve posturas com pesos de 67,40 a 156,0mg, e peso médio de 114,27mg. Os pesos médios das posturas no estudo de Bastos (1997) foram de 110,82; 116,29; 117,0mg e 39,99. Os pesos médios da postura no estudo de Amorim (1998) foi de 93,32mg variando de 8,40 a 156,30mg. Para Szabó et al. (2005) o peso médio da postura foi de 103,90mg. O peso médio das posturas foi de 105,60mg, variando entre 95,0 a 114,0mg, no estudo realizado por Mello (2007). O peso médio das posturas ficou entre 34,88 a 49,74mg no estudo realizado por Sakai (2010).

2.3.4 Índice de Produção de ovos e Índice de Eficiência Nutricional foram calculados de acordo com a expressão proposta por (BENNETT, 1974)

Os índices de Produção dos ovos das fêmeas alimentadas artificialmente não foram citados no trabalho realizado por Cunha et al. (2010). Coelho (1993) observou que os IPOs e IENs foram de

64,50% e de 79,92%, respectivamente. Bellato e Daemon (1997) observaram que os IPOs 63,89%, variaram de 50,90 a 67,60% e IENs 79,77%”, com variação de 66,10% a 83,80%. Bastos (1997) observou que os IPOs e IENs foram de 63,91; 67,68; 64,40% e de 82,93; 83,45; 80,21%, respectivamente, segundo as diferentes idades das fêmeas. Amorim (1998) obteve IPOs de 60,40%, variando de 10,66 a 78,03% e o IEN foi de 77,70%, variando 13,13 a 99,25%. Penna (1999) registrou IPO de 54,50% e IEN de 66,30%. Pinto (2000) obteve IPOs e IENs de 63,23; 65,59; 65,21% e de 83,26; 84,34; 88,64%, respectivamente.

Mello (2007) observou que o IPO variou de 59,0 a 75,0% com índice médio de 68,40% e o IEN não foi mencionado. Piranda (2008) verificou que o IPO foi de 66,0%, variando entre 33,20 a 88,20% e o IEN não foi mencionado pelos autores. O IPO observado por Sakai (2010) variou de 55,68 a 54,42% e o IEN foi de 83,90 a 79,71mg.

2.3.5 Percentual de Eclosão definido com o percentual de eclodibilidade das larvas.

Os percentuais de eclosão das larvas no estudo conduzido por Cunha et al. (2010) foram de 73.0%, 75.0% e 68.0% para os grupos alimentados por 6, 12 e 24 horas respectivamente. Coelho (1993) obteve porcentagem média de eclosão das larvas de 95,88%. A porcentagem média de eclosão de 84,43%, variou de 7,0 a 99,0%, nos achados de Bellato e Daemon (1997). Porcentagens médias de eclosão das larvas no estudo de Bastos (1997) foram de 94,20; 78,93 e 89,60%, respectivamente. Amorim (1998) verificou que a porcentagem média de eclosão das larvas de 85,16%, variou de 1,0 a 100%. A porcentagem média de eclosão das larvas no estudo de Pinto (2000) foi de 89,45; 92,43 e 80,53%, respectivamente. Szabó et al. (2005) verificou que 59,90% das larvas eclodiram. Mello (2007) observou que 95% a 100% das larvas eclodiram. Piranda (2008) analisando a porcentagem de eclosão larval observou uma média de 72,10%, variando entre 1,0 a 99,0%. A porcentagem de eclosão das larvas variou de 51,0 a 57,0%, no trabalho conduzido por Sakai (2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

O trabalho foi conduzido nas dependências do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), pertencente ao Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, RJ.

3.2 Procedência e Manutenção da Colônia de *Rhipicephalus sanguineus* em Coelhos (Etapa 1)

Os carrapatos utilizados foram obtidos de infestação natural de cães errantes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, RJ. Para este procedimento os cães foram contidos de forma adequada de forma que não houvesse nenhum tipo de estresse para estes animais. Após a coleta, os carrapatos foram levados ao Laboratório de Doenças Parasitárias, lavados em água destilada, secos em papel filtro e a identificação foi confirmada com base na chave para gêneros proposta por BARROS-BATTESTI et al.,(2006).

Para a manutenção da colônia, as fêmeas de *R. sanguineus* foram acondicionadas em Placas de Petri e mantidas em câmara climatizada com Demanda Biológica de Oxigênio “Biological Oxygen Demand” (B.O.D) à temperatura de 27°C±1°C e umidade acima de 80%. No 18º dia após o início da

postura, os ovos foram recolhidos, pesados em balança analítica (Bioprecisa FA2104N), separados em alíquotas de 100mg e colocados em seringas plásticas com uma das extremidades cortada e vedada com algodão hidrófilo. Posteriormente, as seringas foram mantidas em câmara climatizada(B.O.D) sob as mesmas condições de temperatura e umidade já citadas.

Foram realizadas observações diárias para avaliar o dia de início da eclosão larval e desta maneira estabelecer a idade de infestação das larvas e ninfas, estas foram submetidas a jejum mínimo de 15 dias e após a ecdise das ninfas para adultos, os adultos foram submetidos a jejum de 20 dias para posteriormente serem infestados nos coelhos. Para a realização das infestações experimentais foram utilizadas larvas, ninfas e adultos em coelhos mestiços (*Oryctolagus cuniculus*), Nova Zelândia x Califórnia cedidos pelo setor de Cunicultura, Instituto de Zootecnia da UFRRJ, com idade de 60 a 90 dias, machos e fêmeas, pesando entre um quilo e meio e três quilos de peso corporal e sem contato prévio com carrapatos ou produtos acaricidas. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do LDP, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. As larvas, ninfas e adultos com 15 a 20 dias de idade, foram alimentadas em coelhos com toucas de algodão aderidas ao dorso de acordo com Neitz et al. (1971) . As larvas e ninfas ingurgitadas foram recuperadas a partir do 5º dia de infestação para realização da ecdise. No sétimo dia de alimentação, fêmeas parcialmente ingurgitadas foram recolhidas cuidadosamente por torção manual sobre o próprio eixo.

O estudo foi conduzido de acordo com o protocolo ético proposto pela Sociedade Brasileira de Laboratório de Ciência Animal (SBCAL) e foi previamente aprovado pela comissão ética da UFRRJ, sendo assim o protocolo experimental aprovado pertence ao número: 007330.

3.3 Delineamento Experimental

O estudo foi dividido em três experimentos:

3.3.1 Experimento 1 – Padronização das faixas de peso inicial de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* parcialmente ingurgitadas submetidas a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas.

A partir do sétimo dia de infestação em coelhos, as fêmeas parcialmente ingurgitadas foram coletadas em diferentes faixas de peso inicial com o objetivo de determinar a melhor faixa de peso para alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas. Os pesos iniciais estabelecidos foram estipulados de acordo com aqueles propostos por Cunha et al. (2010) para a mesma espécie de ixodídeo, com modificações : >20 a 35;>35 a 50;>50 a 65;>65 a 80mg.

Posteriormente, as fêmeas selecionadas foram levadas ao LDP, lavadas em água destilada, secas em papel filtro, e examinadas em microscópio estereoscópico (Wild Heerbrugg) para verificação da integridade do aparelho bucal, formando os 4 grupos de faixas de peso diferentes com 13 fêmeas cada. Em seguida, essas fêmeas foram fixadas em bandejas de isopor, com auxílio de fita adesiva dupla face e as ponteiras plásticas foram posicionadas sobre o aparelho bucal do carrapato (figura 4). A angulação para que o dispositivo fosse acoplado ao aparelho bucal das fêmeas parcialmente ingurgitadas precisou sofrer um ajuste em relação à angulação proposta por Rangel et al. (2011), sendo a nova angulação ajustada para aproximadamente 25° (figura 3), para isto houve a necessidade de se realizar cortes com o auxílio de uma tesoura nas bordas das bandejas de poliestireno de modo que o dispositivo pudesse ser posicionado sobre o recipiente, ainda assim bolinhas feitas de massa de modelar foram colocadas na direção dos cortes na bandeja para dar suporte as ponteiras para que estas não saíssem do aparelho bucal das fêmeas parcialmente ingurgitadas.

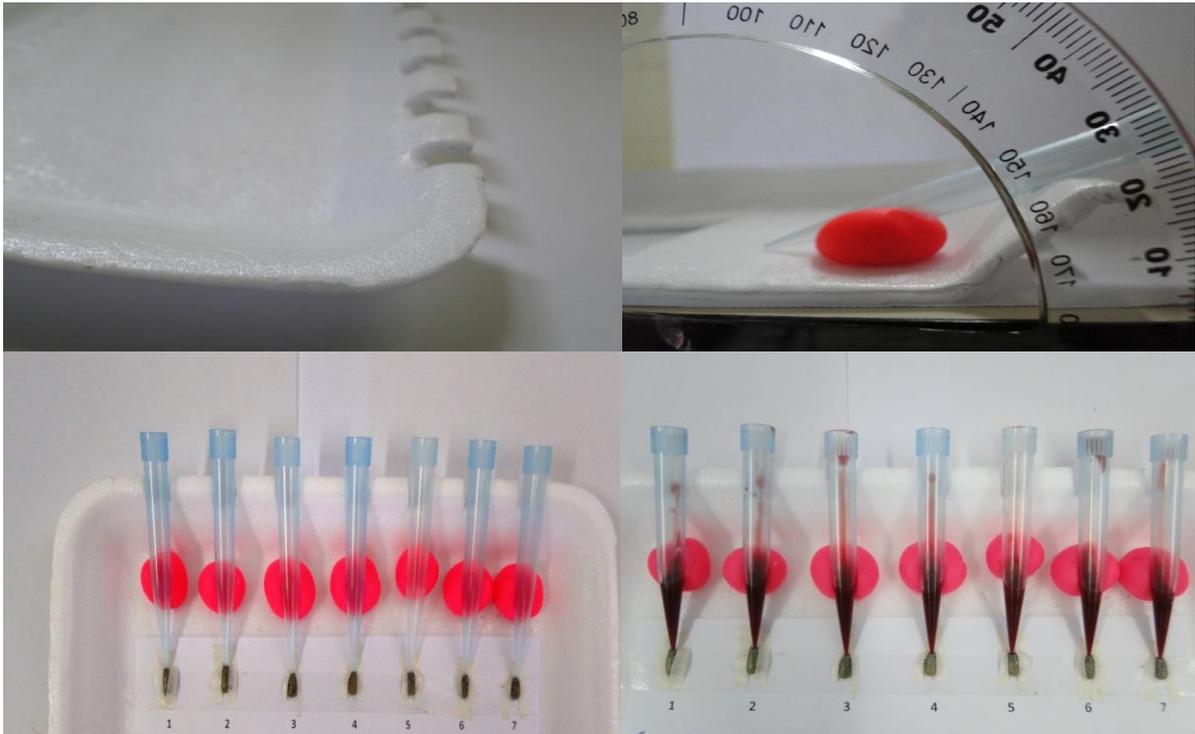


Figura 3. Material utilizado e adaptações metodológicas para a disposição das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* com angulação adaptada para 25°.

O sangue utilizado na alimentação artificial foi coletado com Vaccuntainer, acoplado ao tubo contendo anticoagulante citrato de sódio, diretamente da veia cefálica de três cães saudáveis, não tratados recentemente com acaricidas. Os tubos de sangue foram armazenados sob refrigeração a 4°C por no máximo 24 horas. Para preenchimento das ponteiros plásticos, os tubos contendo sangue foram retirados da geladeira e mantidos à temperatura ambiente momentos antes do início da alimentação. Os dispositivos de alimentação citados acima foram preenchidos com 250 microlitros de sangue citratado de cão e dispostos sobre o aparelho bucal dos carrapatos previamente fixados nas bandejas de poliestireno (figura 3).

Durante o período de alimentação os carrapatos foram mantidos no interior de câmara climatizada do tipo B.O.D (temperatura de 37°C e umidade acima de 80%) por 36 horas, nesta etapa ocorreu a determinação da melhor faixa de peso. A cada 1 hora e meia, as ponteiros foram substituídas e/ou desobstruídas com auxílio de uma agulha. Ao final do período de alimentação as ponteiros plásticas foram retiradas, e os carrapatos descolados da fita adesiva foram pesados em balança analítica, para avaliação do ganho de peso após a alimentação artificial. Após avaliação do ganho de peso dos grupos alimentados por diferentes períodos, as fêmeas alimentadas artificialmente foram fixadas em Placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada do tipo (B.O.D) à 27°C e 80% de umidade relativa para posterior avaliação dos parâmetros biológicos relativos à fase não parasitária.

3.3.2 Experimento 2 – Avaliação do período de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*.

De acordo com os resultados obtidos no experimento 1, fêmeas de *R. sanguineus* parcialmente ingurgitadas em coelhos obtidas a partir do sétimo dia de alimentação, pesando entre 36 a 80mg foram selecionadas para a realização da segunda etapa do estudo.

Após verificação da integridade do aparelho bucal os carrapatos foram pesados, separados em quatro grupos de pesos homogêneos com 12 fêmeas cada. As fêmeas foram fixadas em bandejas de poliestireno com auxílio de fita dupla face e alimentadas artificialmente por meio de ponteiros

plásticas em câmara climatizada do tipo BOD com 37°C e Umidade relativa de 80%, nos seguintes períodos de tempo: 6, 12, 24, 36 horas.

Procedeu-se a realização do processo de alimentação artificial, como descrito anteriormente. Após avaliação do ganho de peso dos grupos alimentados por diferentes períodos, as fêmeas alimentadas artificialmente foram fixadas em Placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada do tipo B.O.D nas condições acima citadas para posterior avaliação dos parâmetros biológicos da fase não parasitária.

3.3.3 Experimento 3 – Avaliação da influência da temperatura na alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* por meio de ponteiras plásticas.

Após a padronização da melhor faixa de peso (experimento 1) e do melhor período de alimentação (experimento 2), foram formados dois grupos para avaliação da influência da temperatura na realização da técnica. Dois grupos com 13 carrapatos parcialmente ingurgitados pesando entre 36 e 80 mg foram submetidos a alimentação artificial por 24 horas em estufa tipo BOD com temperaturas controladas de 27°C e 37°C, ambas com umidade relativa de 80%.

Com a mesma metodologia de alimentação por meio de ponteiras plásticas descrita acima, realizou-se a alimentação artificial. Após avaliação do ganho de peso dos grupos alimentados por diferentes períodos, as fêmeas alimentadas artificialmente foram fixadas em Placas de Petri e acondicionadas em estufa B.O.D nas condições acima citadas para posterior avaliação dos parâmetros biológicos da fase não parasitária.

3.4 Obtenção do grupo controle de *Rhipicephalus sanguineus* de infestação experimental em coelhos.

Os carrapatos foram coletados aleatoriamente, após queda natural. Para cada experimento, 12 carrapatos foram lavados, secos em papel filtro, pesados, fixados em Placas de Petri e levados para câmara climatizada (BOD) nas condições já citadas, para acompanhamento dos parâmetros biológicos da fase não parasitária. Os grupos controle formados nos três experimentos foram mantidos a temperatura de 27°C.

3.5 Parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus*.

Além da observação do ganho de peso antes e após a alimentação artificial nos três experimentos foram realizadas observações diárias para acompanhar os seguintes aspectos relativos à fase não parasitária:

Parâmetros Avaliados	Descrição
Peso das fêmeas alimentadas	Pesos das fêmeas após a alimentação artificial e pesos das fêmeas do grupo controle.
Peso das quenóginas	Peso obtido três dias após o término das posturas de cada fêmea.
Peso da massa de ovos	Peso total da postura de cada fêmea.
Índice de eficiência nutricional (IEN) Calculado segundo Bennet (1974)	$\text{IEN} = \frac{\text{peso da postura(mg)}}{\text{Peso inicial da fêmea} - \text{quenóquina}} \times 100$
Índice de produção de ovos (IPO) Calculado segunda Bennet (1974)	$\text{IPO} = \frac{\text{peso da postura (mg)}}{\text{peso da fêmea alimentada}} \times 100$
Período de pré-postura	Número de dias decorridos entre o final da alimentação e o primeiro dia de postura.
Período de postura	Período entre o primeiro e o último dia de postura de cada fêmea.
Percentual de eclosão	Estimativa visual da quantidade de larvas eclodidas em relação à postura total de cada fêmea.
Ritmo de postura	Pesos diários das posturas de cada fêmea.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística das variáveis quantitativas foram utilizadas análise de variância e teste de Tukey, com significância de 5%. Para as variáveis qualitativas foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com significância de 5%. Ambas as análises foram baseadas em Sampaio (2002). Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa computacional GraphPad InStat version 3.05 (2000).

4 RESULTADOS

4.1. Experimento 1 : Avaliação da Influência da Determinação do Peso Inicial de Fêmeas de *R.sanguineus* Parcialmente Ingurgitadas sobre o Peso Final após Alimentação Artificial por meio de Ponteiros Plásticas.

O ganho de peso das fêmeas foi crescente a medida em que aumentou a faixa de peso inicial (figura 4). O ganho médio de peso nas diferentes faixas, após alimentação por 36 horas foi de 40,3mg, 65,7mg, 53,4mg, 52,5mg nas faixas de peso >20 a 35, >36 a 50, >51 a 65 e >66 a 80mg, respectivamente.

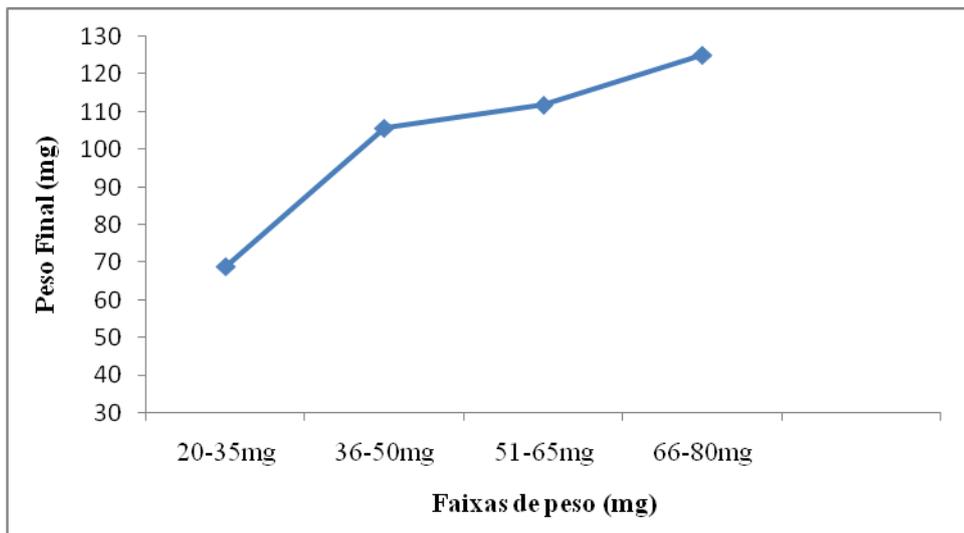


Figura 4. Peso final (mg) nas quatro faixas de peso.

Na tabela 1 encontram-se os valores médios, desvios padrão e limites mínimos e máximos de pesos das fêmeas de *R. sanguineus* (n=13) obtidas de infestação experimental em coelhos antes e depois da alimentação artificial. . Apesar de não haver diferença estatística significativa entre as diferentes faixas de peso, as fêmeas das três últimas faixas apresentaram tendência de melhores ganhos de peso (tabela 1), ou seja, partindo-se de um peso inicial compreendido entre 36 e 80mg foi possível melhores resultados em relação a ingestão de sangue. Estes resultados foram utilizados como referência para a formação dos grupos no experimento onde se procurou avaliar o período ideal de tempo para a alimentação dos carrapatos por meio de ponteiras plásticas.

Tabela 1. Peso médio de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* antes e depois da alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas, bem como seus ganhos médios de peso, após um período de alimentação de 36 horas.

Faixas de Peso	Fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> alimentadas artificialmente por 36 horas		
	Peso Antes média±dp (mín - máx)	Peso Depois média±dp (mín - máx)	Ganho de peso média±dp (mín - máx)
Grupo 1 - 20-35mg	28,7 ± 3,92 (21,7 – 34,1)	69,0 ^a ± 22,51 (28,7 – 114,4)	40,3 ^a ± 20,6 (2,8 – 82,3)
Grupo 2 - 36-50mg	40,0 ± 3,8 (35,4 – 46,6)	105,7 ^b ± 39,1 (46,3 – 163,1)	65,7 ^a ± 38,7 (5,3 – 124,2)
Grupo 3 - 51-65mg	58,3 ± 5,2 (51,1 – 65,8)	111,8 ^b ± 33,8 (58,3 – 180,7)	53,4 ^a ± 35,3 (4,1 - 127,1)
Grupo 4 - 66-80mg	72,5 ± 4,5 (68,1 – 80,0)	125,08 ^b ± 38,5 (72,7 – 178,7)	52,5 ^a ± 39,8 (4,6 – 109,8)
Controle		177,33 ^c ± 21,67 (142,6 – 211,5)	

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

Avaliando os dados referentes ao peso das fêmeas alimentadas artificialmente, houve diferença significativa entre os grupos, sendo que a partir da faixa de peso compreendida entre 36-80mg obteve-se melhores resultados (figura 5).

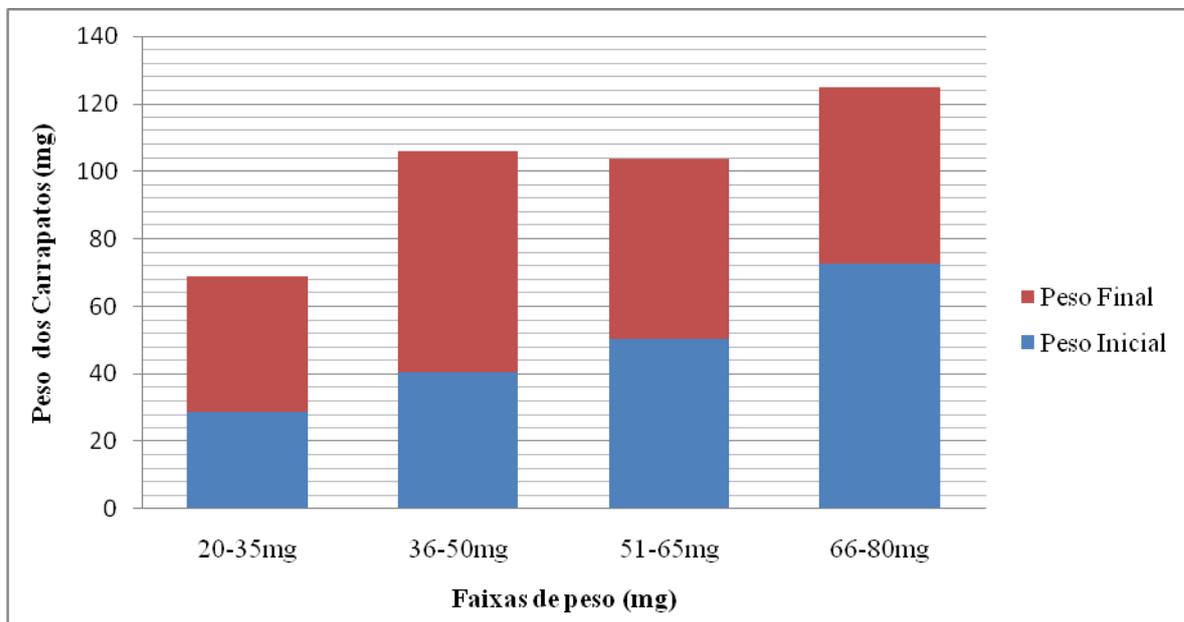


Figura 5. Peso inicial em função do peso final (mg) de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* nas quatro faixas de peso.

O período de pré-postura apresentou diferença significativa entre os grupos com valores superiores ao do grupo controle. O período de postura não apresentou diferença significativa com valores próximos do grupo controle, no entanto o grupo 4 (na faixa de peso entre 66 e 80mg) apresentou valor superior ao grupo controle. Quanto ao peso da massa de ovos, houve diferença significativa onde todos os grupos diferiram significativamente do grupo controle. Nos parâmetros referentes ao índice de eficiência reprodutiva e ao Índice de eficiência nutricional houve diferença significativa entre os grupos, principalmente em relação ao índice de eficiência nutricional que apresentou valores bem próximos do demonstrado pelo grupo controle, revelando que a técnica de alimentação artificial não interfere na biologia do ixodídeo em questão.

Por fim, avaliando os parâmetros biológicos referentes ao experimento 1 do estudo, observa-se que o percentual de eclosão dos grupos alimentados por 36 horas não apresentou diferença significativa (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biológicos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas nas quatro faixas de peso no período de 36 horas.

Parâmetros biológicos	Pesos iniciais das fêmeas semi-ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> alimentadas artificialmente por 36 horas (mg)				
	20-35	36-50	51-65	66-80	Controle
Peso das fêmeas alimentadas (mg)	69,0 ± 22,51 ^a (28,7 – 114,4)	105,7 ± 39,1 ^b (46,3 – 163,1)	111,8 ± 33,8 ^b (58,3 – 180,7)	125,08 ± 38,5 ^b (72,7 – 178,7)	177,33 ± 21,67 ^c (142,6 – 211,5)
Período de pré-postura (dias)	5,18 ± 0,6 ^{ab} (4 - 6)	5,45 ± 0,68 ^a (4 - 6)	4,78 ± 0,67 ^{ab} (4 - 6)	4,67 ± 0,5 ^b (4 - 5)	3,6 ± 0,51 ^c (3 - 4)
Período de postura (dias)	13,64 ± 1,75 ^a (10 - 16)	14,54 ± 3,11 ^a (11 - 20)	14,22 ± 3,96 ^a (11 - 21)	16,78 ± 2,17 ^a (12 - 19)	14,6 ± 2,64 ^a (10 - 19)
Peso da massa de ovos (mg)	38,67 ± 10,48 ^a (26 – 57,4)	49,99 ± 26,66 ^a (9,7 – 89,2)	57,18 ± 22,88 ^a (20,6 – 95,2)	64,73 ± 23,41 ^a (33,3 – 108,2)	112,94 ± 17,41 ^b (86,5 - 145)
Índice de eficiência nutricional (%)	84,18 ± 7,3 ^a (69,59 – 94,61)	74,17 ± 13,13 ^a (44,51 - 89,36)	77,88 ± 12,17 ^a (63,34 – 95,66)	83,39 ± 9,15 ^a (65,39 – 94,69)	83,53 ± 3,45 ^b (78,56 – 88,71)
Índice de produção de ovos (%)	45,38 ± 8,58 ^a (25,27 – 55,15)	36,00 ± 20,28 ^a (0 – 54,11)	45,23 ± 5,96 ^a (34,98 – 53,1)	40,23 ± 16,92 ^a (0 – 58,23)	60,38 ± 6,4 ^b (43,25 – 68,78)
Percentual de Eclosão (%)	78,45 ± 13,24 ^a (60,0 – 99,0)	78,45 ± 39,24 ^a (0 – 99,0)	92,44 ± 6,27 ^a (85,0 – 99,0)	80,33 ± 31,22 ^a (0 – 99,0)	94,87 ± 6,61 ^a (75,0 – 99,0)

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

4.2. Experimento 2 : Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas.

Na Tabela 3 encontram-se os pesos médios, desvios padrão e limites mínimos e máximos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus*, antes e depois da alimentação artificial, bem como seus ganhos de peso médios das fêmeas alimentadas nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas. O peso dos carrapatos foi maior a medida em que se aumentou o tempo de exposição ao dispositivo. As fêmeas alimentadas por 6, 12, 24 e 36 horas apresentaram ganho de peso médio de 11,2mg, 34,0mg, 40,8mg e 70,25mg, respectivamente.

Na avaliação do melhor tempo para alimentação artificial, o grupo alimentado por 36 horas (tabela 3) apresentou as melhores médias de ganho de peso e peso médio final, porém não diferiu estatisticamente do grupo alimentado por 24 horas.

Tabela 3. Pesos médio das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* e o ganho médio de peso das fêmeas na faixa de 36-80mg, após alimentação artificial por 6,12,24 e 36 horas utilizando ponteiras plásticas.

Período de Alimentação	Peso Antes média±dp (mín - máx)	Peso Depois média±dp (mín - máx)	Ganho de peso média±dp (mín - máx)
Grupo 1 - 6 horas	49,3 ^a ± 8,5 (38,0 – 63,4)	60,5 ^a ± 13,9 (41,7 – 82,3)	11,2 ^a ± 7,8 (1,0- 23,4)
Grupo 2 - 12 horas	48,6 ^a ± 9,2 (38,0 – 70,5)	82,6 ^a ± 27,6 (57,4 – 137,6)	34,0 ^a ± 29,1 (2,8 – 91,9)
Grupo 3 - 24 horas	51,3 ^a ± 12,3 (35,6 – 78,4)	92,1 ^{ab} ± 34,3 (48,5 – 166,6)	40,8 ^{ab} ± 27,3 (2,8 – 88,2)
Grupo 4 - 36 horas	50,3 ^a ± 11,7 (36,6 – 73,2)	120,6 ^b ± 40,2 (58,6 -180,7)	70,25 ^b ± 40,4 (18,0 – 127,1)
Controle		171,16 ^c ± 33,31 (125,9 -218,57)	

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

A Tabela 3 e a Figura 6 demonstram que a média em que se aumenta o tempo de exposição ao novo dispositivo (ponteiras plásticas) ocorre aumento do ganho de peso, além disso todos os grupos diferiram significativamente do grupo controle. A partir de 24 horas de alimentação são obtidos os melhores resultados de ingestão de sangue o que pode ser explicado pela adaptação do ângulo para a disposição dos carrapatos sobre as bandejas para a execução da técnica para *R. sanguineus*.

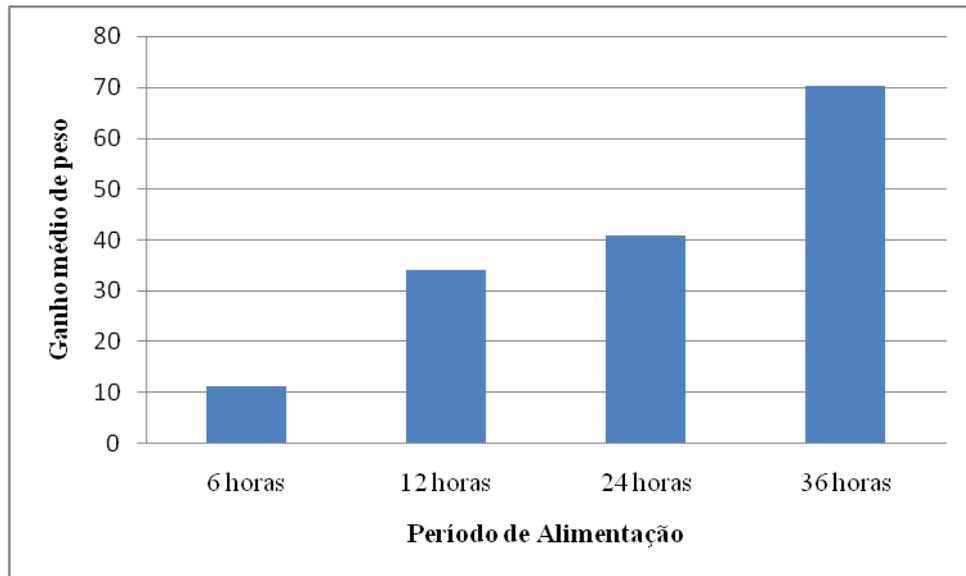


Figura 6. Ganho médio de peso(mg) de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* nos quatro períodos de alimentação.

Na avaliação dos parâmetros biológicos das fêmeas alimentadas artificialmente nos diferentes períodos de alimentação, o peso das fêmeas apresentou diferença significativa a partir de 24 horas e foi crescente a medida em que se aumentou o tempo de exposição ao dispositivo. O período de pré-postura entre os grupos não apresentou diferença significativa, diferindo apenas do grupo controle, apresentando valores superiores aos deste grupo. O período de postura apresentou diferença significativa a partir de 24 horas fato não observado entre os grupos 24 e 36 horas e grupo controle. O peso da massa de ovos apresentou diferença significativa a partir de 12 horas, além disso todos os grupos diferiram do grupo controle, assim como demonstrado pelo ritmo de postura diária, onde o grupo controle obteve valores de postura maiores e por maior tempo (figura 7).

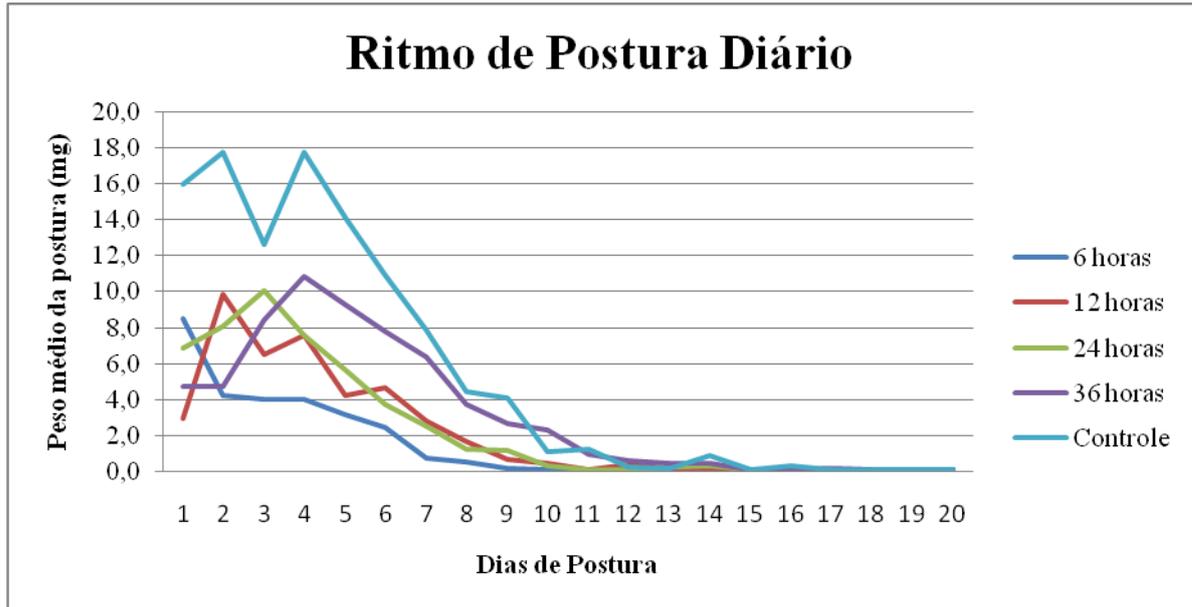


Figura 7. Ritmo de Postura Diário das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas artificialmente nos quatro diferentes períodos.

O Índice de eficiência nutricional e percentual de eclosão não apresentaram diferença significativa entre os grupos testados e grupo controle revelando que a técnica não influencia na capacidade do carrapato ingerir sangue e no seu potencial biótico. Por fim, no Índice de produção de ovos, os grupos testados não diferiram entre si, porém apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros biológicos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas nos quatro períodos de alimentação na faixa de peso compreendida entre 36 a 80mg.

Parâmetros biológicos	Períodos de alimentação artificial de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> pesando entre 36 e 80 mg				
	6 horas	12 horas	24 horas	36 horas	Controle
Peso das fêmeas alimentadas (mg)	60,5 ± 13,9 ^a (41,7 – 82,3)	82,6 ± 27,6 ^a (57,4 – 137,6)	92,1 ± 34,3 ^{ab} (48,5 – 166,6)	120,6 ± 40,2 ^b (58,6 – 180,7)	171,16 ± 33,31 ^c (125,9 – 218,57)
Período de pré-postura (dias)	5,2 ± 0,42 ^a (5 - 6)	5,2 ± 0,63 ^a (5 - 7)	5,00 ± 0,0 ^a (5 - 5)	5,0 ± 0,82 ^a (5 - 5)	4,00 ± 0,0 ^b (4 - 4)
Período de postura (dias)	12,6 ± 2,80 ^a (8 - 17)	12,3 ± 2,00 ^a (7 - 14)	14,5 ± 2,07 ^{ab} (12 - 18)	15,28 ± 4,39 ^{ab} (11 - 21)	17,07 ± 2,69 ^b (10 - 20)
Peso da massa de ovos (mg)	27,37 ± 9,33 ^a (14,4 – 44,0)	41,61 ± 22,31 ^{ab} (8,1 – 85,1)	48,78 ± 22,17 ^{ab} (17,3 – 86,1)	58,97 ± 33,37 ^b (9,7 – 108,2)	114,21 ± 25,52 ^c (74,5 - 147,8)
Índice de eficiência nutricional (%)	72,09 ± 7,98 ^a (62,06 - 81,03)	73,47 ± 19,95 ^a (23,97 - 91,02)	78,98 ± 13,35 ^a (53,23 – 91,14)	68,93 ± 19,28 ^a (28,28 – 87,54)	84,22 ± 5,92 ^a (68,41 – 89,75)
Índice de produção de ovos (%)	43,39 ± 3,72 ^a (38,08 – 48,12)	49,18 ± 9,52 ^a (34,80 – 59,80)	47,8 ± 8,62 ^a (35,02 - 58,53)	42,66 ± 11,77 ^a (19,93 – 52,16)	63,73 ± 4,4 ^b (51,87 – 68,83)
Percentual de Eclosão (%)	96,3 ± 4,35 ^a (90,0 – 99,0)	97,4 ± 2,07 ^a (95,0 – 99,0)	97,54 ± 2,02 ^a (95,0 – 99,0)	93,28 ± 6,60 ^a (80,0 – 99,0)	98,08 ± 1,75 ^a (95,0 – 99,0)

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

4.3. Experimento 3 : Avaliação da Influência da Temperatura na Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*

Na Tabela 5 estão expostos os valores de ganho médio de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* alimentadas nas faixas de peso 36-80mg durante o período de 24 horas, em temperaturas controladas de 27°C e 37°C e umidade relativa de 80%. A faixa de peso e o período de tempo utilizados nessa etapa foram definidos nas etapas anteriores do estudo, a partir da execução desta etapa (experimento 3) constatou-se que não houve diferença significativa entre os ganhos de pesos médios e os pesos finais das fêmeas submetidas às temperaturas de 27°C e 37°C. Os valores de ganho de peso e parâmetros biológicos desta etapa estão expressos nas Tabelas 5 e 6, não havendo qualquer influência nos parâmetros biológicos da espécie estudada.

Tabela 5. Pesos médio de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (36-80mg), antes e depois da alimentação artificial por 24 horas em duas diferentes temperaturas.

Temperaturas	Peso Antes média±dp (mín - máx)	Peso Depois média±dp (mín - máx)	Ganho de peso média±dp (mín - máx)
27°C	48,1 ^a ±9,6 (38,0±72,2)	78,1 ^a ±18,6 (43,7±103,8)	29,9 ^a ±18,1 (5,7 – 61,6)
37°C	51,3 ^a ±12,3 (35,6±78,4)	92,1 ^a ±34,3 (48,5±166,6)	40,8 ^a ±27,3 (2,8 – 88,2)
Controle		167,38 ^b ±17,90 (128,9 – 190,7)	

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

Tabela 6. Parâmetros biológicos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* submetidos à alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas nas quatro faixas de peso no período de 24 horas em duas diferentes temperaturas.

Parâmetros Biológicos	Temperaturas de alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas por 24 horas na faixa entre 36-80mg e controle		
	27°C	37°C	Controle
Peso das fêmeas(mg)	78,1±18,6 ^a (43,7 – 103,8)	92,1±34,3 ^a (48,5 – 166,6)	167,3±17,9 ^b (128,9 – 190,7)
Período de pré- postura (dias)	4,31±0,63 ^a (4,0 – 6,0)	5,0± 0,0 ^b (5,0 – 5,0)	4,54±0,78 ^{ab} (3,0 – 6,0)
Período de postura (dias)	13,2±1,0 ^a (12- 15)	14,5 ± 2,07 ^{ab} (12 - 18)	15,23±2,0 ^b (9,0 – 17,0)
Peso de massa de ovos (mg)	44,4±13,3 ^a (22,3 – 65,4)	48,78 ± 22,17 ^a (17,3 – 86,1)	108,2±14,9 ^b (85,3 – 130,7)
Índice de eficiência nutricional (%)	83,7±6,1 ^a (74,0 – 91,0)	78,98 ± 13,35 ^a (53,23 – 91,14)	76,1a±3,5 ^a (71,3 – 81,9)
Índice de produção de ovos (%)	54,2±5,9 ^a (42,5 – 64,6)	47,8 ± 8,62 ^a (35,02 – 58,53)	62,7±3,5 ^b (56,2 – 68,0)
Percentual de eclosão(%)	96,5±2,0 ^a (95,0 – 99,0)	97,3±2,0 ^a (95,0 – 99,0)	97,1±2,0 ^a (95,0 – 99,0)

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

Analisando os dados referentes ao Índice de produção de ovos, nota-se que o desempenho dos grupos nas duas temperaturas (27°C e 37°C), não foi considerado ruim o que reforça a hipótese de que uma alteração no parâmetro de temperatura não prejudica a capacidade da fêmea em converter o sangue ingerido em ovos viáveis. Os valores médios dos IPOs oscilaram entre 54,2, 47,8, respectivamente.

Os pesos médios das fêmeas alimentadas nos grupos submetidos a 27°C e 37°C foram 78,1mg e 92,1mg, respectivamente. O peso final após a alimentação diferiu significativamente entre os grupos testados e o grupo controle. Apenas no peso de massa de ovos e no Índice de eficiência reprodutiva houveram diferenças significativas entre os grupos testados e o grupo controle, uma vez que esses dois são influenciados pelo peso final das fêmeas, e conseqüentemente afetou o ritmo de postura.

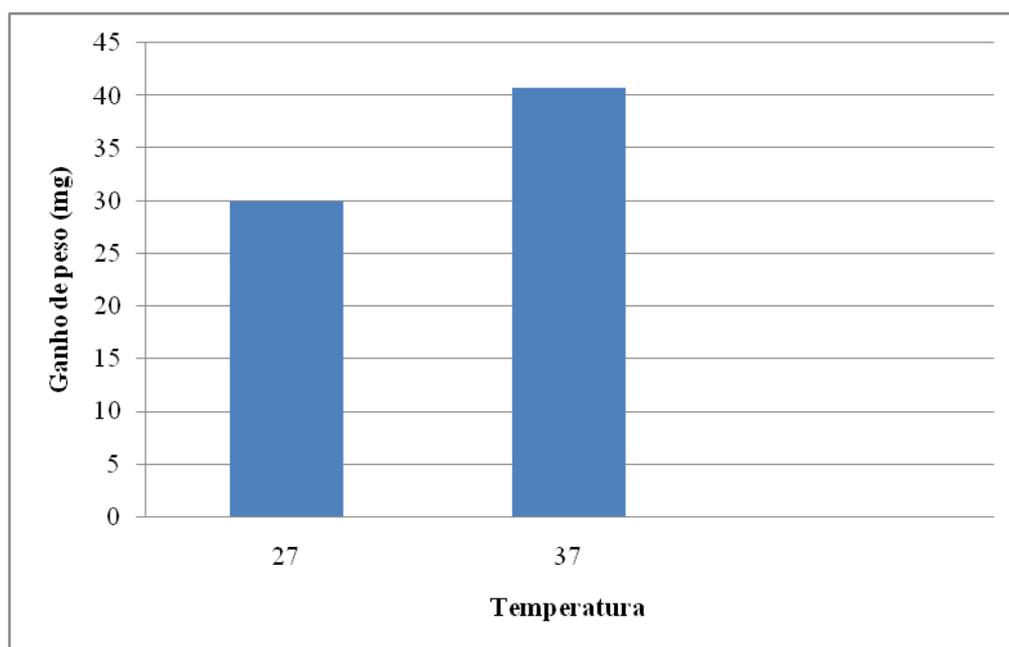


Figura 8. Ganho médio de peso das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas na temperatura de 27°C e 37°C

A Figura 8, a média do ganho de peso dos grupos alimentados a 27°C e 37°C, isso demonstra que um leve aumento da temperatura (37°C) faz com que as fêmeas venham ingerir mais sangue que se estivessem a uma temperatura de 27°C.

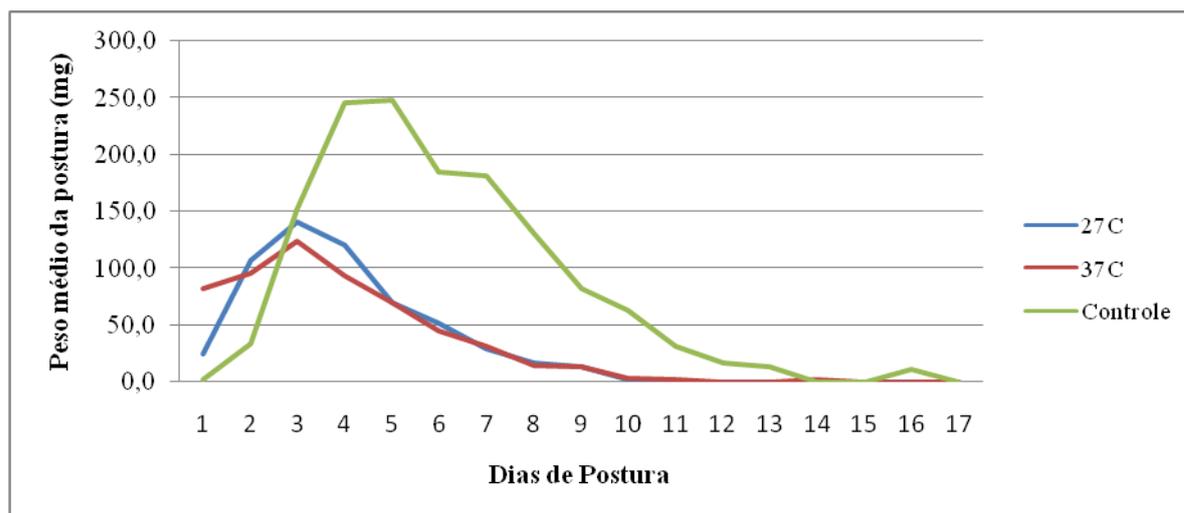


Figura 9. Ritmo de postura das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas artificialmente nas temperaturas de 27°C e 37°C

5 DISCUSSÃO

Ao utilizar a técnica de alimentação artificial em estudos experimentais Burgdorfer (1957) observou que a alimentação dos carrapatos ocorreu rapidamente quando foram oferecidas suspensões frescas. No presente estudo, as ponteiras plásticas foram trocadas com intervalos de 1 a 2 horas durante a alimentação, a partir daí os carrapatos receberam sangue fresco frequentemente. Durante o período de alimentação artificial dos carrapatos foi observado um pequeno ressecamento do sangue na parte final do novo dispositivo em contato com o aparelho bucal do espécime, o que foi solucionado com um dispositivo apropriado (fio de aço) para a desobstrução das ponteiras. De acordo com Purnell e Joyner (1967) isto ocorre devido ao ressecamento do sangue na extremidade das ponteiras, isto contribuiu para a entupimento do dispositivo o que dificultou a ingestão de sangue, que foi solucionado com um fio de aço apropriado para desobstrução.

Rangel (2011) na alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, propôs a utilização das ponteiras plásticas em substituição dos tubos capilares e observou que esse novo dispositivo garantiu o ingurgitamento dos espécimes em sete horas. Neste estudo a utilização das ponteiras plásticas, embora não tenha permitido o ingurgitamento dos grupos, possibilitou uma maior ingestão de sangue pelos carrapatos. O tempo de alimentação foi reduzido de 36 para 24 horas, sendo que o peso médio dos carrapatos alimentados por 24 horas foi superior ao peso médio de carrapatos *R. sanguineus* submetidos a alimentação artificial por meio de tubos capilares, no mesmo período de tempo, em estudo realizado por Sakai (2010), isto pode ser explicado pelas adaptações metodológicas adotadas para a espécie no presente estudo que apesar de terem sido utilizadas as mesmas faixas de peso houve a necessidade de uma angulação de 25° nas bandejas para que o dispositivo fosse adequadamente inserido no aparelho bucal dos carrapatos para favorecer o fluxo de sangue. As ponteiras plásticas também permitiram maior conteúdo de sangue (250 µl) o que proporciona maior ingestão pelo ixodídeo, além disso, ocorre a separação de fases no interior do novo dispositivo, fato não ocorrido quando se utiliza tubos capilares, uma vez que estes suportam quantidade menor de sangue e ocorre rápida obstrução da extremidade tendo necessidade de trocas dos dispositivos em intervalo de tempo menor. No presente estudo, além da observação da redução do conteúdo das ponteiras, a separação das fases do sangue no interior da ponteira ocorreu e a excreção de guanina, um indicativo marcante da ingestão de sangue, conforme observado por Purnell e Joyner (1967), Abel (2004) e Rangel (2008).

Alguns autores acreditam que o posicionamento do aparelho bucal dos carrapatos nos dispositivos de alimentação artificial bem como o tamanho extremamente curto dos palpos de *R. sanguineus* podem exercer certa influência na ingestão de sangue (BILLETER et al., 2012). No presente estudo os palpos de fêmeas *R. sanguineus* foram inseridos nas ponteiras plásticas durante a

alimentação artificial, este encaixe foi favorecido pela adaptação do ângulo de disposição do novo dispositivo (ponteiras plásticas), sendo necessário um ângulo de 25^o, diferente do ângulo de 45^o proposto por Rangel (2011) para a alimentação de *R. microplus*. Entretanto, isto não impediu a ingestão de volume significativo de sangue, corroborando as achados de Purnell e Joyner (1967) para a espécie *R. appendiculatus*, que inseriram todo o capítulo dos carrapatos dentro do tubo e a alimentação ocorreu de maneira normal. Há relatos de que outros gêneros parecem reagir de maneira diferente. Broadwater et al. (2002) observaram que ninfas de *I. scapularis* ao serem alimentadas artificialmente, ingeriram pequenas quantidades do meio de cultura, provavelmente devido a artificialidade do método e a inserção dos palpos no interior dos capilares. De acordo com estes autores o volume ingerido do meio de cultura pode ter sido prejudicado porque, em condições naturais de alimentação, os palpos desta espécie permanecem fora do hospedeiro.

5.1 Avaliação do Peso Inicial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* Sobre o Ganho Médio de Peso quando Submetidas a Alimentação Artificial por meio de Ponteiras Plásticas.

Até o momento, a maneira mais apropriada para avaliar a ingestão de sangue das fêmeas alimentadas é a pesagem destas antes e após a alimentação artificial, uma vez que esta metodologia demonstrou baixo custo, simplicidade e facilidade de execução na avaliação deste parâmetro. De La Vega et al. (2000), Abel (2004), Rangel (2008), Rangel et al. (2008), Sakai (2010) e Rangel (2011) empregaram a pesagem dos carrapatos antes e após como método confirmatório da ingestão de sangue pelos carrapatos alimentados artificialmente. No entanto, outras metodologias também demonstraram êxito na avaliação do ganho de peso dos carrapatos submetidos a alimentação *in vitro*. Um estudo realizado por Purnell e Joyner (1967) utilizou tubos capilares com uma especificação padrão para que o volume ingerido pelo carrapato pudesse ser avaliado através da medição do comprimento da coluna no tubo. Anos mais tarde, Kocan et al. (2005) trabalhou com microesferas fluorescentes para observar a ingestão de sangue, neste estudo os autores objetivaram desenvolver o sistema de alimentação artificial utilizando tubos capilares para infectar os carrapatos com *A. marginale*, assim as microesferas foram implementadas para confirmar a infecção nos esfregaços de tecidos dos ixodídeos.

No estudo realizado por Cunha et al. (2010) o ganho médio de peso de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* alimentadas artificialmente foi inferior aos encontrados no presente estudo. Essa diferença pode ter ocorrido porque no trabalho de Cunha et al. (2010) não foi definida a faixa de peso inicial das fêmeas, além de utilizarem espécimes com grandes variações de peso inicial.

Na execução da técnica de alimentação artificial é extremamente importante determinarmos o peso médio inicial das fêmeas, pois somente desta maneira podemos avaliar em qual faixa de peso dos carrapatos será possível alcançar os objetivos do estudo que se pretende desenvolver. Rangel et al. (2008) utilizaram duas faixas de peso inicial do carrapato *D. nitens*, esses autores notaram que os grupos de carrapatos com peso de 61 a 100mg, apresentaram maior ganho médio de peso em relação aos grupos que pesavam inicialmente entre 40 a 60mg, quando alimentados artificialmente. Neste estudo, os autores observaram que as quatro faixas de peso (20-35mg, 36-50mg, 51-65mg, 66-80mg) de fêmeas de *R. sanguineus* oriundas de infestação em coelhos ao serem analisadas, mostraram que não houve diferença significativa em relação ao ganho de peso após a alimentação artificial por 36 horas, porém foram constatados os melhores ganhos de peso a partir da faixa 2 (36-50mg), isto demonstra que o peso inicial exerce forte influência sobre o ganho de peso.

5.2 Avaliação da influência da Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* Obtidas de Infestação Experimental em Coelho nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas.

Analisando os diferentes períodos de alimentação foi observado ganho médio de peso crescente à medida que se aumentou o tempo de alimentação artificial, estes dados estão de acordo com os registrados por Cunha et al. (2010) e Sakai (2010). O peso médio final das fêmeas após alimentação artificial encontrado por Cunha et al. (2010) foram 66,0mg, 69,9mg e 73,6mg quando alimentados por 6,12 e 24 horas, respectivamente, estes valores foram muito semelhantes aos encontrados por Sakai (2010) com peso médio final de 61,32mg, 69,73mg e 70,80mg nos períodos citados acima e utilizando o mesmo dispositivo, tubos capilares, porém no presente estudo com a adaptação do novo dispositivo (ponteiras plásticas) os valores foram discretamente superiores. A partir de 24 horas de alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas não foi observada diferença significativa entre o ganho médio de peso dos grupos. Há que se ressaltar que a ingestão significativa de sangue pode variar conforme a espécie de carrapato. Rangel (2008) e Rangel et al. (2008) ao trabalharem com alimentação artificial de *R. microplus* e *D. nitens*, respectivamente, observaram ingestão significativa de sangue a partir de 24 horas.

A técnica de alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas não permitiu o ingurgitamento total de *R. sanguineus* em nenhum dos períodos de alimentação, no entanto, esse resultado era esperado por ser tratar de uma situação artificial. Além disso, mesmo não havendo ingurgitamento total, houve sucesso na técnica, uma vez que as fêmeas parcialmente ingurgitadas ingeriram quantidade significativa de sangue, suficiente para realizarem postura. Quanto ao parâmetro de postura, o fato de os grupos experimentais não atingirem o ingurgitamento total demonstra que ocorre influência, havendo uma leve diminuição em relação ao grupo controle, porém essa diferença não afetaria a manutenção da colônia ou estudos de transmissão de patógenos utilizando as larvas já que a biologia do carrapato em questão não sofre prejuízo, demonstrando ser uma técnica viável e segura.

Poucos são os trabalhos sobre a alimentação artificial de *R. sanguineus* que avaliaram a influência da técnica sobre a biologia da fase não parasitária desta espécie de carrapatos. Na literatura foram encontrados detalhes sobre os aspectos biológicos de *R. sanguineus* alimentados artificialmente apenas nos estudos realizados por Cunha et al. (2010) e Sakai (2010). Portanto, parte das referências utilizadas na discussão a seguir foi baseada nos grupos controles de artigos que descreveram os aspectos biológicos de *R. sanguineus* alimentados sobre hospedeiros experimentais.

Os pesos médios das fêmeas alimentadas artificialmente por diferentes períodos de tempo diferiram estatisticamente do peso médio dos carrapatos do grupo controle. Esses resultados foram semelhantes aos observados por Coelho (1993), Bellato e Daemon (1997), Bastos (1997), Amorim (1998), Penna (1999), Pinto (2000), Szabó et al. (2005) e Melo (2007). O ingurgitamento total talvez não pôde ser atingido porque ao adquirir um certo grau de ingurgitamento através da alimentação artificial, observa-se que não ocorre o favorecimento do encaixe do dispositivo no aparelho bucal do carrapato, o que inviabiliza a continuidade da ingestão de sangue.

Os valores do período médio de pré-postura foram maiores para os grupos alimentados artificialmente quando comparados ao grupo controle e aos observados por Amorim (1998). Penna (1999), Szabó et al. (2005) e Melo (2007). Nos estudos conduzidos por Coelho (1993) e Pinto (2000) foi observado que o período médio de pré-postura também foi menor que o das fêmeas do grupo alimentado artificialmente por 6 horas. Bastos (1997) verificou um período médio de 4,13 dias, menor do que aquele verificado para os grupos alimentados nos quatro períodos. Os grupos alimentados artificialmente foram superiores aos observados por Cunha et al. (2010), a partir daí ressalta-se que não houve grandes influências da alimentação artificial neste parâmetro biológico, ou seja, o potencial biótico da espécie não é afetado, porém é importante destacar que os parâmetros relativos a postura vão sofrer uma certa alteração devido ao não ingurgitamento total dos carrapatos.

No que se refere ao período médio de postura, os grupos alimentados artificialmente apresentaram valores menores aos do grupo controle, assim quando comparado com Coelho (1993), Bastos (1997), Penna (1999) e Melo (2007). No experimento conduzido por Pinto (2000) o período

médio de postura foi de 12,75 dias para fêmeas obtidas de coelhos da raça Califórnia, estando próximo aos valores registrados para os grupos alimentados artificialmente por 6 e 12 horas. O grupo alimentado por 24 horas apresentou resultados semelhantes aos encontrados por Pinto (2000) que observou período médio de postura de 14,07 dias para fêmeas obtidas de coelhos mestiços.

Em relação aos parâmetros referentes aos IPOs e IENs, estes não sofreram nenhum processo que pudesse prejudicar o desenvolvimento normal, demonstrando que o novo dispositivo é adequado para alimentar artificialmente os carrapatos não afetando o potencial biótico da espécie em questão quando submetida a alimentação artificial. Os IPOs e IENs para os quatro grupos alimentados em 6, 12, 24 e 36 horas apresentaram média de 43,39 e 72,09%. Estes resultados reforçam a hipótese de que a técnica não exerce influência alguma sobre os aspectos biológicos que não estão ligados diretamente à postura. Isso ressalta que a influência sobre os aspectos biológicos esta ligada ao grau de ingurgitamento dos carrapatos e não a técnica de alimentação artificial.

O percentual médio de eclosão se aproximou do valor obtido para o grupo controle, se aproximando também dos valores observados por Coelho (1993), Bellato e Daemon (1997), Bastos (1997), Amorim (1998), Penna (1999), Pinto (2000) e Mello (2007). Portanto, percentual médio de eclosão das larvas não sofreu influência da técnica utilizando ponteiras plásticas para a execução da alimentação artificial não causando dessa maneira interferência no potencial biótico da espécie.

5.3 Avaliação das Temperaturas de 27^o C e 37^o C sobre a Alimentação Artificial e os Parâmetros Biológicos de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*

Segundo Chabaud (1950), o sucesso da alimentação artificial depende da padronização de uma temperatura adequada para a ingestão das dietas oferecidas. O ideal é que seja uma temperatura próxima a encontrada pelos vetores no hospedeiro natural. Várias alternativas são utilizadas para simular as condições ideais e que favoreçam o desenvolvimento da técnica. Nos experimentos realizados por Chabaud (1950) e Purnell e Joyner (1967), a temperatura do sistema de alimentação artificial foi mantida com auxílio de uma luminária. Enquanto, Inokuma et al. (1994) utilizaram uma placa aquecedora na tentativa de manter constante a temperatura da dieta oferecida por meio de tubos capilares.

No presente estudo, os grupos formados foram submetidos às temperaturas de 27^o e 37^oC, e observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos, apesar de melhores resultados serem no ganho de peso ser observado no grupo alimentado na temperatura de 37^oC.

As temperaturas estabelecidas para a experimentação nos diferentes trabalhos variaram muito, de acordo com a espécie de carrapato, desde 27^oC a 37^oC (ABEL, 2004; WILLADSEN et al., 1984). A alimentação artificial de *D. nitens* e *A. cajennense* em estufa em temperatura de 27^oC foi suficiente para garantir que os carrapatos completassem seu ingurgitamento *in vitro* fato ocorrido no estudo conduzido por RANGEL et al. (2008). No entanto, quando utilizada esta mesma temperatura para alimentar fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus*, os carrapatos não ingeriram a quantidade de sangue necessária para completar seu ingurgitamento (CUNHA et al., 2010; SAKAI, 2010).

No estudo realizado por Rangel (2011) para avaliar a influência da temperatura na execução da técnica em *R. microplus*, dois grupos foram alimentados artificialmente nas temperaturas de 27^oC e 37^oC, os resultados revalaram que houve diferença significativa, sendo que o grupo submetido a 37^oC obteve uma maior ingestão de sangue. No entanto, foi possível observar carrapatos que não foram capazes de ingerir sangue, em ambas as faixas de temperatura, fato não observado no presente estudo.

A utilização de estufas com temperatura e umidade controladas proporcionou o desenvolvimento do trabalho, visto que todas as atividades inerentes ao processo de alimentação foram realizadas dentro da estufa. Esses valores de temperatura foram ideais para a realização do experimento, uma vez que os carrapatos foram capazes de se alimentar e pareciam em condições

normais de motilidade após serem retirados das bandejas. Nos carrapatos alimentados em estufa a 37°C, houve um ressecamento mínimo na extremidade da ponteira, as desobstruções do dispositivo foi realizada em intervalos maiores.

Moura (1994) comprovou a importância do controle da temperatura do sangue como estímulo alimentar do ixodídeo *A. cajennense* alimentados pelo sistema de membrana de silicone, fato observado também por Galun (1967); Pipkin e Connor (1968); Galun et al. (1969) e Langley (1976). Os resultados encontrados por estes autores consideraram que a temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ foi a mais propícia para alimentar os carrapatos e também estão de acordo com estudos envolvendo alimentação artificial de artrópodes hematófagos empregando membranas, como os de Macdonald e Scott (1952), que trabalharam com ácaros causadores de sarna em roedores; Carvalho (1961) com triatomíneos; Davis et al. (1983) com ceratopogonídeos e argasídeos, como Galun e Kindler (1965) e (1968); Tawfik e Guirgis (1969); Mango e Galun (1977); Butler et al. (1984) e Hokama et al. (1987); ou com carrapatos ixodídeos como Winkhardt (1979); Stone et al. (1983) e Waladde et al. (1991). No estudo desenvolvido por Kemp et al. (1975) diferentes temperaturas foram usadas sendo que a mais apropriada foi a de 35°C de um meio de cultura parcialmente definido para alimentar larvas de *R. microplus*, através de pele de bovinos.

Os pesos médios das fêmeas alimentadas nos grupos submetidos a 27°C e 37°C foram 78,1mg, 92,1mg. O grupo controle apresentou peso de 167,3mg, respectivamente, havendo diferença significativa entre os grupos alimentados artificialmente e o grupo controle, no entanto, o peso do grupo alimentado sob temperatura de 37°C foi o que mais se aproximou do grupo controle.

Estes achados são importantes para verificar que em condições em que a estufa de temperaturas controladas esteja impossibilitada de ser utilizada não ocorrerá o impedimento da execução da técnica com o novo dispositivo, podendo até ser realizada em temperatura ambiente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aprimoramento dessa técnica permitirá maior praticidade na sua reprodução, melhor ingestão de sangue e redução do tempo de exposição dos carrapatos as ponteiras para que se atinja um ingurgitamento satisfatório, como observado por Rangel (2011) para a espécie *R. microplus*. Além disso, a técnica de alimentação de *R. sanguineus* por meio de ponteiras plásticas poderá ser útil nos estudos sobre a transmissão de hemoparasitas que tem como vetores carrapatos ixodídeos, neste caso de acordo com os resultados encontrados no presente estudo as faixas de peso necessárias para a formação dos grupos poderão estar em um intervalo menor para a execução da técnica, podendo serem utilizadas as faixas de peso referentes aos grupos 1 e 2 que pesaram entre 20-35 a 36-50mg de peso inicial, isto numa situação de transmissão experimental de agentes.

Em relação a necessidade de tornar a técnica mais fácil, rápida e redução na mão-de-obra quanto a execução, existe a possibilidade da redução do tempo de exposição ao novo dispositivo, com base nos achados deste estudo, ao invés de se utilizar o tempo de 24 horas pode-se levar em consideração a utilização do tempo de 12 horas para estudos que visem a transmissão de hemoparasitas, uma vez que os resultados referentes ao IPO(Índice de Produção de Ovos) nestes dois grupos(12 e 24 horas) foram muito semelhantes o que demonstra a viabilidade da técnica para pesquisas envolvendo transmissão de patógenos.

Outra possibilidade do uso da alimentação artificial de carrapatos que merece destaque é o avanço no emprego dessa metodologia nos estudos de anticorpos monoclonais como o realizado com o ixodídeo *R. microplus*, onde o objetivo principal foi empregar estes anticorpos monoclonais para identificar e caracterizar antígenos que podem ser usados como imunógenos vacinais, bem como observar o efeito das imunoglobulinas na fisiologia destes artrópodes (GONSIOROSKI et al., 2012). Ainda dentro dos benefícios em relação ao avanço nos estudos envolvendo o sistema de alimentação artificial com o novo dispositivo (ponteiras plásticas), será possível avaliar a competência vetorial dos ixodídeos aos diferentes patógenos, desvendar mais aspectos da interação entre vetor-patógeno, identificar e desenvolver novas vacinas (TAJERI e RAZMI, 2011).

Os testes com acaricidas sistêmicos e vacinas poderão ser aperfeiçoados com a utilização do novo dispositivo, aspectos relacionados à fisiologia da alimentação e componentes da saliva de carrapatos poderão ser investigados (DE LA VEJA et al., 2000; KROBER; GUERIN, 2007). O estabelecimento de colônias de carrapatos em laboratório enfrenta dificuldades no que diz respeito à adaptação do carrapato aos hospedeiros alternativos e à manutenção de animais para a sua alimentação (RANGEL et al., 2008). Atualmente vem sendo muito questionada a utilização de animais em experimentação científica, há que se ressaltar que o aperfeiçoamento da técnica de alimentação artificial contribui em demasia para a não utilização de animais de companhia para obtenção de fêmeas parcialmente ingurgitadas. Com o aperfeiçoamento da técnica existe a possibilidade da sua utilização na transmissão de patógenos/hemoparasitas como *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* bem como agentes da Febre maculosa, visto que os carrapatos ingeriram mais sangue nas mesmas faixas de peso quando se utilizou tubo capilar.

7 CONCLUSÃO

- A alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas com sangue citratado de cão demonstrou ser adequada para alimentar fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R.sanguineus* oriundas de coelhos;
- Os melhores ganhos de pesos das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R.sanguineus* estão dentro da faixa de peso de 36 a 80mg oriundas de coelhos, sendo assim num estudo envolvendo a transmissão de bioagentes podem ser utilizadas as faixas de peso do grupo 1 e 2 (20-35mg e 36-50mg, respectivamente), visto que a produção de ovos não foi comprometida;
- O tempo de exposição aos dispositivos (ponteiras plásticas) referente a 24 horas foi suficiente para que os grupos ingerissem quantidade significativa de sangue;
- A utilização da técnica com o novo dispositivo não prejudicou a biologia dos carrapatos alimentados artificialmente;
- A avaliação de duas temperaturas (27°C e 37°C) não influenciou nos parâmetros biológicos dos carrapatos, isto permitirá a realização da técnica mesmo quando não houver câmara climatizada em condições ideais de temperatura e umidade;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGLEY, P.A. Initiation and regulation of ingestion by hematophagous arthropods. **Journal of Medical Entomology**, v. 13, n. 2, p. 121-130, 1976.
- AGUIAR, D. M.; Cavalcante, G. T.; Rodrigues, A. A. R.; Labruna, M. B.; Camargo, L. M. A.; Camargo, E. P.; Gennari, S. M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1, p. 71-77, 2006.
- 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.
- AMORIM, M. G. R. **Efeito de diferentes razões sexuais sobre as fases parasitária e não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e comportamento sexual de machos e fêmeas**. 1998. 63f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- BALASHOV, Y.S. **Bloodsucking ticks (Ixodoidea): vectors of diseases in man and animals**. Cairo: USNAMRU/Med. Zool. Dep., 1972. 319p. (Transl. 500- T500).
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da região neotropical**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223p.
- BASTOS, K. M. S. **Ritmo de queda e potencial infestante de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório**. 1997. 49f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- BELLATO, V.; DAEMON E. Efeitos de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n.1, p. 21-27, 1997.
- BELLATO, V.; DAEMON, E. Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.1, p. 15-19, 1997.
- BENNET, G.H. Oviposition of *Boophilus microplus*. I. Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v.16, n.2, p. 250-257, 1974.
- BILLETER, S. A., KASTEN, R. W., KILLMASTER, L. F., BREITSCHWERD, E. B., LEVIN, M. L., LEVY, M. G., KOSOY, M. Y., CHOMEL, B. B. Experimental infection by capillary tube feeding of *Rhipicephalus sanguineus* with *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffi*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** v. 35, n. 3, p. 9– 15, 2012.
- BONOLDI, V. L. **Estudo laboratorial de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos em pacientes com Doença de Lyme-simile (Síndrome Baggio-Yoshinari)**. 2010. 114f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.
- 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.

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.

BUTLER, J.F.; HESS, W.R.; ENDRIS, R.G. & HOLCHER, K.H. In vitro feeding of ornithodoros ticks for rearing and assessment of diseases transmission pp. In D.A. Griffiths and C.E. Bowman (ed.), **Acarology**, v. 2, n. 3, p. 1075-1081, 1984.

CARNEIRO, M.E.; DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.6, n. 1, p.1-9, 1997.

CARVALHO, G. Método indireto alimentação de insetos hematófagos, **Revista Brasileira de Biologia**. v. 21, n. 2, p. 193-196, 1961.

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

COELHO, C. F. **Biologia da fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) sob condições de laboratório: aspectos da oviposição**. 1993. 52f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

COOLEY, R. A. The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus*, and *Haemaphysalis* (Ixodoidea) of the New World. **National Institute of Health Bulletin**, Washington. v. 187, p. 1-54, 1946.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009

CUNHA, N. C.; RANGEL, C. P.; PIRANDA, E. M.; REZENDE, J.; TEIXEIRA, R. C.; FONSECA, A. H. Assessment of weight gain and biological parameters of *Rhipicephalus sanguineus* females fed artificially via capillary tubes. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 928-933, 2010.

DANTAS-TORRES, F.. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v.152, n. 1, p. 173-185, 2008.

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

DAVIS, E.L.; BUTLER, J.F.; ROBERTS, R.H.; REINERT, J.F. & KLEINE, D.L. Laboratory blood feeding of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) through a reinforced membrane. **Journal of Medical Entomology**. v. 20, n. 1, p. 177-282, 1983.

DESPINS, J.L. Effects of temperature and humidity on ovipositional biology and egg development of the tropical horse tick, *Dermacentor (Anocentor) nitens*. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 2, p. 332-337, 1992.

EREMEEVA, M. E.; ZAMBRANO, M.; ANYA, L.; BEATI, L.; KARPATY, S. E.; SANTOS-SILVA, M. M.; SALCEDA, B.; MACBETH, D.; OLGUIN, H.; DASCH, G. A.; ARANDA C. A.

Rickettsia rickettsii in *Rhipicephalus* Ticks, Mexicali, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 48, n. 2, p. 418-421, 2011.

ESHKY, A.A.; TAYLOR, A.C.; ATKINSON, R.J.A. The effects of temperature on aspects of respiratory physiology of the semi-terrestrial Crabs, *Uca inversa* (Hoffmann) and *Metopograpsus messor* (Forsk.) from the Red Sea. **Comp. Biochemical. Physiology.**, v. 114, n. 1 p. 297-304 , 1996.

FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Aspectos gerais da biologia e identificação e carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 1 ed. São Paulo: Instituto Butantan, cap. 2,2006, p. 05-12

FRANQUE, M. P.; SANTOS, H. A.; LINAREZ, F. F. M.; MASSARD, C. L. Infestação experimental de equinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 15-19, 2009.

FREITAS, M.G.; COSTA, H.M.A.; COSTA, J.O. **Entomologia e Acarologia Médica Veterinária**. 4 ed. Belo Horizonte,1978, 250p.

GALUN, R. Feeding stimuli and artificial feeding. Bull. Wld. Hlth. Org. v. 36, n. 2, p. 590-593, 1967.

GALUN, R. & KINDLER, S.H. Chemical basis of feeding in the tick *Ornithodoros tholozani*. **Journal Insect physiology.**, v. 14, n.2, p. 1409, 1968.

GALUN, R., KOSOWER, E.M. & KOSOWER, N.S. 1969. Effect of Methyl phenyldiazencarboxylate (Azoester) on the feeding behavior of blood sucking invertebrates. **Nature**, v. 224, n. 3, p. 181-182, 1969.

GLÓRIA, M.A.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. *et al.* Biologia comparativa da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticidas em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 2 , n. 3, p. 79-84, 1993.

GLÓRIA, M.A.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. *et al.* Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can., 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**., v.2, n. 2, p.85-91, 1993.

GODDARD, J. **Ticks of medical importance occurring in the western hemisphere**. USAF School of Aerospace Medicine, Texas 1987. 69p.

GONSIOROSKI, A. V.; BEZERRA, I. A.; UTIUMI, K. U.; DRIEMEIER, D.; FARIAS, S. E.; VAZ JR, I. S.; MASUDA, A. Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. **Experimental Parasitology.**, v. 130, n.1, p.359-363, 2012.

GOTHE, R.; WEGEROT, S.; WALDEN, R.; WALDEN, A. Epidemiology of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs in Germany. **Kieintierpraxis**, v. 34, n. 2 , p. 309-320, 1989.

GREGSON, J. D. Notes on some phenomenal feeding of ticks. **Proceedings of the Entomological Society of British Columbia**, v.34, n. 8, p. 8-11, 1937.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3 Butantan, 2006. 223p.

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 Medical Entomology**. v. 24, n. 2, p. 319-323, 1987.

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.

JOANISSE, D.R.; STOREY, K.B. Mitochondrial enzymes during overwintering in two species of cold-hardy gall insects. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v.24, n. 2, p.145-150, 1994.

JOYNER, L. P.; PURNELL, B. E. The feeding behaviour on rabbits and *in vitro* of the Ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. **Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 715-723, 1968.

JITTAPALAPONG, S.; STICH R. W.; GORDON, J. C.; WITTUM, T. E.; BARRIGA, O. O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. **Journal Medical Entomology**. v. 37, n. 2, p. 601-611, 2000.

KOCH, H.G.; TUCK, M.D. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 79, n. 3, p.11-14, 1986.

KEMP, D. H.; KOUDSTAAL, 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.

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 pathogen interactions 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.

KOCH, H. G. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. **Ann Entomology Society of America**, Lanham; v. 75, n. 5, p. 583-586, 1982

LABRUNA, M. B., C. E. KERBER, F. FERREIRA, J. L. H. FACCINI, D. T. De WAAL, and S. M. GENNARI. 2001. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 1-14, 2001.

LABRUNA, M. B. Biologica-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, n. 2, p. 123 - 124, 2004.

LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: BARROS-BATESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical, um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1 ed. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. cap. 10, p. 115-138.

LANGLEY, P.A. Initiation and regulation of ingestion by hematophagous arthropods. **Journal of Medical Entomology**. v. 13, n. 2, p. 121-130, 1976.

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. 355-60, 1993.

LOULY, C. C. B. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus*, no canil da policia militar de Goiânia-Goiás, Brasil**. 2003, 54 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal Higiene e Tecnologia de Alimentos), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; OLIVEIRA, V. F.; BORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis do município de Goiânia, Go. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MACDONALD, E. SCOTT, J.A. Methods of feeding tropical rat mites on blood and others fluida throug a membrane. **Experimental Parasitology**. v.1, n. 3, p. 283-290, 1952.

MANGO, C.K.A. GALUN, R. 1977. *Ornithodoros moubata*: breeding in vitro. **Experimental Parasitology**. v. 42, n. 2, p. 282-288, 1977.

MARQUE FONTES, E. Aplicação de métodos alternativos à experimentação animal em estudos farmacológicos e toxicológicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 514, n. 1, p. 85-88, 1995.

MELO, R. M. P. S. **Morfologia e biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) submetido ao regulador de crescimento de artrópodes fluazuron**. 2007. 43f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

MOURA, S. T. **Utilização de Membrana de Silicone para Alimentação Artificial de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)** 1994.66F.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

NEITZ, W. O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H. S. Laboratory investigations on the life-cycle of karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.38, n.3, p.215-224, 1971.

ONOFRIO, V. C.; VENZAL, J. M.; PINTER, A.; SZABÓ, M. P. J. Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Editora Vox/ ICTTD-3/Butantan, São Paulo, v.1, p.29-39, 2006.

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.

PAZ, G. F.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no canil da escola de veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 17, n. 1, p. 41-44, 2008.

PENNA, A. P. **Efeito da imersão em água destilada sobre as fases de vida livre do ciclo evolutivo de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)**. 1999. 37f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

PETROVA-PIONTOVSKAYA, S. P. Comparative data on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* Latr. and *Rhipicephalus turanicus* Pom. under laboratory conditions. **Zoologicheskii Zhurnal**, Moscow, v. 25, n. 2, p. 173-176, 1947.

PIPKIN, A.C. CONNOR, J.C. A temperature controlled feeding apparatus for hematophagous arthropods. **Journal Medical Entomology**. v. 5, n. 2, p. 507-509, 1968.

PINTO, F. S. **Investigações preliminares sobre a sensibilidade parasitária de duas raças de coelhos à *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)**. 2000. 20f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

PIRANDA, E. M.; CANÇADO, P. H. D.; RAIA, V. A.; ALMEIDA, T. K.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H. The effect of temperature and fasting period on the viability of free-living females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 45, n. 3-4, p. 211-217, 2008.

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. 1, p. 484-485, 1967.

RANGEL, C. P. **Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) por meio de tubos capilares**. 2008. 34f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

RANGEL, C. P.; CUNHA, N. C.; REZENDE, J.; SILVA, F. J. M.; CORRÊA, F. N.; TEIXEIRA, R. C.; SILVA, J. B.; BAÊTA, B. A.; FONSECA, A. H. Alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Dermacentor (Anocentor) nitens*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 35-39, 2008.

RANGEL, C. P. **Eficiência da Alimentação *in vitro* de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 74f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

SARTOR, A. A. **Aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório**. 1994. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

SAKAI, R. S. **Alimentação Artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari Ixodidae) por meio de tubos capilares**. 2010. 50f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

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.

SERRA-FREIRE, N. M. Doenças causadas por carrapatos. In: MARCONDES, C. B. **Doenças Transmitidas e Causadas Por Artrópodes**. 1. ed. São Paulo, Atheneu, cap. 27, , 2009, p. 377-402.

SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M.; HUXOLL, D. L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 1, p. 119 – 26, 1976.

- 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. **Biology of ticks**. vol. 1. New York: Oxford University Press, 1991, 447 p.
- SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. vol. 2. New York: Oxford University Press, 1993, 465 p.
- SOULSBY, E. J. L. **Biology of Parasites. Emphasis on Veterinary Parasitology**. Academic Press. New York and London, p. 72-77, 1966.
- STONE, B.F.; COMMINS, M.A. & KEMP, D.H. Artificial feeding of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. *Int. J. Parasitology*. v. 13, n. 3, p. 447-454, 1983.
- SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v.130, n.1-2, p.131-140, 2005.
- SWEATMAN, G. K. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 53, n. 2 p. 432-445, 1967.
- TAWFIK, M.S. & GUIRGIS, S.S. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Experimental feeding of *Argas (Persicargas) arboreus* Kaiser, Hoogstral and Kols (Argasidae) through membranes. **Journal of Medical Entomology**. v. 6, n. 2, p. 191-195, 1969.
- TAJERI, S., RAZMI, G. R. *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) imbibe bovine blood in vitro by utilizing an artificial feeding system. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, p. 332-335, 2011.
- WALADDE, S.M., KEMP, D.H. & Rice, M.J. Feeding electrograms and fluid uptake measurements of cattle tick *Boophilus microplus* attached on artificial membranes. *Int. J. Parasitology*. v. 8, n. 2, p. 89-95, 1979.
- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H.; MCKENNA, R. V. Bloodmeal ingestion and utilization as a component of host specificity in the tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.70, n. 3, p. 415-420, 1984.
- WINKHARDT, H.J. Untersuchungen über den Entwicklungszyklus von *Dipetalonema rugosicauda* (syn. *Wehrdikmansia* r.) (Nematoda: Filaroidea). **Tropenmed. Parasitology**. v. 30, n. 2, p. 455-462, 1979.