



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

ISABELLA CHAVES SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS
BIOTECNOLÓGICOS PARA O CONTROLE DO
CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

São Luís - MA
2022

ISABELLA CHAVES SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS
PARA O CONTROLE DO CARRAPATO BOVINO**

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Trabalho de tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de biotecnologia – RENORBIO, ponto focal Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientador: Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Hermes Ribeiro Luz

São Luís - MA
2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Sousa, Isabella Chaves.

Desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Isabella Chaves Sousa. - 2022.
72 f.

Coorientador (a): Hermes Ribeiro Luz.

Orientador (a): Livio Martins Costa-Junior.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2022.

1. Contagem automática. 2. Monoterpeno. 3. Piretroide. 4. Sinergismo. 5. Software.

I. Costa- Junior, Livio Martins. II. Luz, Hermes Ribeiro. III. Título.



Universidade Federal do Maranhão
Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária – 65080-805 São Luís-MA
Telefone (98) 3272- 9531 E-mail: renorbio@ufma.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE TESE

ALUNA: Isabella Chaves Sousa

TÍTULO DO PROJETO: Desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

PROFESSOR ORIENTADOR: Livio Martins Costa Junior

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior – UFMA –
(Presidente)

Prof. Dr. Hermes Ribeiro Luz – UFMA
(Titular)

Prof. Dr. José Reck Júnior – IPVDF
(Titular)

Prof. Dr. Danilo Rodrigues Barros Brito - IFMA
(Titular)

Prof. Dr. Antonio Carlos Romão Borges – UFMA
(Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Aldilene da Silva Lima – UFMA
(Titular)

DATA DA APROVAÇÃO: 24 de fevereiro de 2022
HORÁRIO: 14:00h

Dedico esse trabalho ao meu pai, Meton Sousa Neto (*in memoriam*), por suas lutas e sonhos que manteve até o último instante. O sonho que aqui realizo é em seu nome.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar pelos caminhos certos e me conceder saúde e força para concluir mais essa importante etapa de minha vida.

Ao meu filho, Miguel Antônio, meu maior amor, que desde cedo teve que aprender a dividir a mãe com experimentos, aulas e computador. A ele agradeço e peço desculpa por todas as falhas.

À minha mãe, Rosa, por todas as orações feitas a meu favor durante o doutorado e por todos os cuidados a mim dispensados.

À mãe titia, Lúcia, por todo o suporte e auxílio sempre que precisei.

Aos meus irmãos Fabíola, Gabriella e Hugo, e meus cunhados Joelson, Cesar e Flávia, pelo incentivo diário e por serem pessoas que sempre me serviram de espelho, tanto pela inteligência quanto pela determinação e competência em tudo que fazem.

Aos meus sobrinhos e afilhados, Maria Clara, Pedro Vinícius, Heitor, Laís Maria, Marcos e Murilo que são presentes de Deus em minha vida e só me dão alegrias e motivos para seguir em frente.

A toda minha família e amigos, por serem uma base essencial para meu desenvolvimento.

Ao meu professor, orientador e grande exemplo, Livio Martins, por toda a atenção, força e sabedoria disponibilizadas a mim durante o período de doutorado. Serei sempre grata por todas as oportunidades e pela compreensão que recebi ao longo desses 4 anos.

Ao professor Hermes Luz, meu coorientador, que chegou ao LCP e trouxe consigo mais um grande exemplo de professor e pesquisador, com sua competência, simpatia, parceria e disposição.

A todos os amigos do Laboratório de Controle de Parasitos da Universidade Federal do Maranhão, em especial: Caio, Matheus, Dauana, Tássia, Geovane, Rayssa, Carol, Aldilene, Naylene, Juliana, Ruth, Olga, Pedro e Ellen pela ajuda nos momentos difíceis (que não foram poucos) e pelas risadas de sempre.

Ao Caio, gostaria de agradecer individualmente, por todas as vezes que me mostrou que eu poderia seguir em frente e que eu era capaz... e, mais ainda, por ter estado ao meu lado

(por vezes me acompanhando, e outras me carregando nos ombros) nos momentos que no fundo sabia que eu não conseguiria sozinha.

Ao Núcleo de computação aplicada (NCA) da Universidade Federal do Maranhão, em especial ao prof. Aristófanês Silva e seu orientando Wesley Kelson, peças fundamentais no desenvolvimento do software descrito nessa tese. Ao querido Kelson, principalmente, agradeço pela paciência e disponibilidade.

Ao Instituto Federal do Maranhão (IFMA) pela parceria no desenvolvimento do trabalho *in vivo*, em especial, a todos os técnicos, alunos e professores do setor de bovinos com os quais tive o prazer de conviver durante a realização do experimento.

À UFMA pela possibilidade de realização desta pós-graduação, bem como por todos os equipamentos e instalações físicas disponibilizados durante esta pesquisa.

À CAPES, em parceria com a FAPEMA, pela concessão de bolsa de estudo durante o período do doutorado. À FAPEMA agradeço ainda pelo auxílio financeiro essencial para o desenvolvimento das pesquisas realizadas pelo LCP.

À Ceva Saúde Animal pela parceria fundamental para o desenvolvimento das formulações utilizadas neste trabalho.

Ao professor Guilherme Klafke pela parceria na análise dos dados no artigo do contador automático.

A todos os amigos do Laboratório Cernitas, em especial ao Prof. Daniel Chaves, por sempre ser um grande incentivador da minha vida acadêmica e profissional.

À coordenação, representada pelo professor Adeilton Maciel, e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da RENORBIO.

A todos os funcionários e colaboradores desta instituição pela parceria e ajuda, em destaque à Camila e Adriana (RENORBIO), Sr. Zeca, Wesley, Rodrigo e todos os funcionários do Biotério Central, D. Dinalva, D. Dica, Sr. Josuel e Sr. Uilton.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma participaram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae), conhecido popularmente como carrapato dos bovinos, é considerado o principal ectoparasito em países de regiões tropicais e subtropicais. O controle deste carrapato é realizado principalmente pela utilização de carrapaticidas sintéticos, e inúmeros relatos de populações resistentes são descritos no mundo todo. Diante deste cenário, é imprescindível o desenvolvimento de novos produtos para o controle desse parasito, assim como novos métodos que avaliem com maior precisão e menor subjetividade a resistência carrapaticida e a seleção de drogas potenciais para o controle de *R. (B.) microplus*. O presente estudo foi dividido em dois capítulos. O capítulo I teve como objetivo desenvolver e validar um novo método de contagem automática para avaliar a mortalidade larval de carrapatos. Um software para diferenciação de larvas vivas e mortas foi desenvolvido em diferentes etapas: obtenção de vídeos; segmentação de imagens usando o algoritmo de vaga-lume; detecção de larvas com a técnica de transformação de simetria radial rápida (FRST); e rastreamento das larvas baseado no deslocamento de partículas ao longo do tempo. Para validação do software desenvolvido, testes de imersão larval de *R. (B.) microplus* com ivermectina, cipermetrina e fipronil foram realizados em triplicata. A avaliação da mortalidade larval foi realizada por meio de gravações de vídeos nos tempos de 60, 40 e 20s para posterior análise no software de contagem. Além disso, foram realizadas contagens manuais das mesmas amostras por três analistas diferentes, cada um responsável pela contagem de uma réplica de cada teste. Não houve diferença estatística nas CL₅₀ determinadas nas avaliações manuais e automática para ivermectina e fipronil. Para cipermetrina, a CL₅₀ calculada após avaliação manual foi até 2,2 vezes menor que a da avaliação automática. O tempo de aquisição dos vídeos foi de 2.9 a 4.4 vezes mais rápido que a avaliação manual. O tempo médio de processamento de cada vídeo foi de 5,73 min, independente da duração dos mesmos. O capítulo II teve como objetivo avaliar a atividade carrapaticida *in vivo* e *in vitro* de uma formulação contendo piretróide sintético associado a um monoterpeno. A partir de associações entre o monoterpeno e o piretróide, foram realizados testes *in vitro* sobre larvas de *R. (B.) microplus*, verificando-se um possível sinergismo. No teste *in vitro* sobre fêmeas ingurgitadas a formulação com a associação de piretróide + monoterpeno (0,4 mg/mL) apresentou um percentual de controle de 57,50%, valor superior aos obtidos com as formulações com piretróide isoladamente. Nos testes *in vivo*, a associação de piretróide + monoterpeno (0,4 mg/mL) apresentou um percentual de controle médio (67,3%) superior ao da formulação com apenas o piretróide (57,7%), com os melhores resultados visualizados entre os dias +1 e +7, quando o percentual de controle apresentou valores de 93,75% e 71,84%, comparado aos 50,20% e 40,05% da formulação de apenas piretróide. De acordo com os resultados obtidos nesta tese, demonstramos que o método desenvolvido para contagem automática de larvas de carrapato foi validado, podendo ser considerado uma alternativa viável para determinação do percentual de mortalidade de larvas de carrapatos. Além disso, a formulação desenvolvida neste trabalho (piretróide sintético + monoterpeno) tem potencial para ser utilizada no controle de *R. (B.) microplus* e deve ser considerada como base para estudos posteriores.

Palavras-chave: Software; contagem automática; monoterpeno; piretroide; sinergismo.

ABSTRACT

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae), popularly known as cattle tick, is considered the main ectoparasite in tropical and subtropical countries. The control of this tick is carried out mainly by the use of synthetic acaricides, and numerous reports of resistant populations are described worldwide. Given this scenario, it is essential to develop new products for the control of this parasite, as well as new methods that assess with greater precision and less subjectivity the tick resistance and the selection of potential drugs for the control of *R. (B.) microplus*. The present study was divided into two chapters. Chapter I aimed to develop and validate a new automatic counting method to assess tick larval mortality. A software for differentiating live and dead larvae was developed in different stages: obtaining videos; image segmentation using the firefly algorithm; larvae detection with the fast radial symmetry transformation (FRST) technique; and tracking of larvae based on particle displacement over time. To validate the developed software, larval immersion tests of *R. (B.) microplus* with ivermectin, cypermethrin and fipronil were performed in triplicate. The assessment of larval mortality was performed by recording videos at 60, 40 and 20s for further analysis in the counting software. In addition, manual counts of the same samples were performed by three different analysts, each responsible for counting a replica of each test. There was no statistical difference in LC₅₀ determined in manual and automatic assessments for ivermectin and fipronil. For cypermethrin, the LC₅₀ calculated after manual assessment was 2.2 times lower than that of automatic assessment. Video acquisition time was 2.9 to 4.4 times faster than manual evaluation. The average processing time for each video was 5.73 min, regardless of their duration. Chapter II aimed to evaluate the *in vivo* and *in vitro* acaricide activity of a formulation containing synthetic pyrethroid associated with a monoterpene. From the associations between the monoterpene and the pyrethroid, *in vitro* tests were carried out on *R. (B.) microplus* larvae, verifying a possible synergism. In the *in vitro* test of engorged females, the formulation with the association of pyrethroid + monoterpene (0.4 mg/mL) presented a percent control of 57.50%, a value higher than that obtained with the formulations with pyrethroid alone. In the *in vivo* tests, the association of pyrethroid + monoterpene (0.4 mg/mL) presented an average percent control (67.3%) higher than the formulation with only pyrethroid (57.7%), with the best results. visualized between days +1 and +7, when the percentage of control presented values of 93.75% and 71.84%, compared to 50.20% and 40.05% of the pyrethroid formulation alone. According to the results obtained in this study, we demonstrate that the method developed for automatic counting of tick larvae was validated and can be considered a viable alternative for determining the percentage of tick larvae mortality. Furthermore, the formulation developed in this work (synthetic pyrethroid + monoterpene) has the potential to be used in the control of *R. (B.) microplus* and should be considered as a basis for further studies.

Keywords: Software; automatic counting; monoterpene; pyrethroid; synergism.