



**ANA CAROLINE SILVEIRA ARANTES**

**EFEITO DOS ISÔMEROS  $\alpha$ -PINENO E  $\beta$ -PINENO NO  
DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS  
INGURGITADAS DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* (ACARI:  
IXODIDAE)**

**LAVRAS-MG  
2023**

**ANA CAROLINE SILVEIRA ARANTES**

**EFEITO DOS ISÔMEROS  $\alpha$ -PINENO E  $\beta$ -PINENO NO DESEMPENHO  
REPRODUTIVO DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*  
(ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, linha de pesquisa Relação parasita-hospedeiro e controle de carrapatos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Arantes, Ana Caroline Silveira.

Efeitos dos isômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno no desempenho reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) / Ana Caroline Silveira Arantes. - 2023.

53 p. : il.

Orientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Carrapato-do-boi. 3. Acaricida. I. Remedio, Rafael Neodini. II. Título.

**ANA CAROLINE SILVEIRA ARANTES**

**EFFECTS OF THE ISOMERS  $\alpha$ -PINENE AND  $\beta$ -PINENE ON THE  
REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*  
ENGORGED FEMALES (ACARI: IXODIDAE)**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, linha de pesquisa Relação parasita-hospedeiro e controle de carrapatos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 13 de julho de 2023.

Dr. Rafael Neodini Remedio DME/FCS-UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso DQI/ICN-UFLA

Dra. Patricia Rosa de Oliveira UFBA

Documento assinado digitalmente  
 RAFAEL NEODINI REMEDIO  
Data: 26/09/2023 16:33:16-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2023**

*Ao meu pai, Francisco, por nunca medir esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. À minha irmã, Leticia, por todo o amor e o apoio emocional ao longo dessa jornada.  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a UFLA, a universidade dos sonhos. Que proporcionou toda a estrutura e condições necessárias para que este mestrado pudesse ser realizado. Agradeço à CAPES pela concessão de bolsa de mestrado, fundamental para que essa caminhada pudesse ser trilhada e concluída. Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (em especial ao professor Murgas e a Dona Fátima) que não medem esforços para auxiliar os discentes em suas respectivas trajetórias. À professora Graça por ceder mais de uma vez os isômeros utilizados no trabalho e ao Departamento de Medicina por fornecer o espaço e as condições para que os experimentos pudessem acontecer. Meu muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador, professor Rafael Remedio, que em sua infinita paciência e competência, esteve sempre disponível as minhas questões. Que me ensinou sobre processos laboratoriais, me ensinou estatística, me ensinou sobre escrita científica, me ensinou que nada está perdido e sempre temos outros caminhos quando o plano A não sai do jeito que planejamos. Sem sua dedicação, este trabalho não seria possível.

Ao professor Arthur, por todas as coletas de carrapatos, sempre tão disposto a ajudar, sem mesmo nunca ter tido a oportunidade de me conhecer pessoalmente. Sem os carrapatos, não existiria possibilidade deste trabalho acontecer.

Agradeço também ao meu pai, que mesmo sem ter tido a oportunidade de estudar, nunca mediu esforços para que eu nunca parasse de estudar e alcançasse meus sonhos e objetivos.

À minha irmã, que independente de qualquer coisa, sempre foi meu suporte. Agradeço pelo incentivo, apoio emocional, paciência e amor incondicional durante toda essa jornada.

À minha família, principalmente à minha avó, Maria Ana, pelos conselhos, apoio emocional e financeiro sempre que podia. E em memória da minha avó Maria Ferreira que tenho certeza que me guiou durante todo esse tempo lá de cima.

À minha tia Irma, que sempre tirou um tempinho para dedicar suas orações a mim, ao sucesso dos meus experimentos e a essa conquista.

Ao meu noivo, Gilberto, que me apoiou desde o sonho de entrar no mestrado, passando por cada etapa comigo, me apoiando e incentivando a continuar firme e em frente, apesar de qualquer dificuldade, sempre com amor, carinho e compreensão.

Aos meus amigos, Agatha Neves, Ana Carolina, Jônatan e Luiz Otávio, por tanto apoio e ajuda, desde a graduação, principalmente quando mais precisei, não me deixando desistir.

Aos meus amigos Alcía, José Henrique, Laís e Julia, que foram parte essencial desta jornada, sempre me acompanhando, me apoiando, fazendo tudo ser mais leve e me acolhendo como uma família.

Ao meu psicólogo, Felipe, por todo suporte nessa jornada, aprendi que sou muito mais forte, competente e capaz do que eu pensava e devo isso às suas sessões.

Às amigas que fiz durante o mestrado, Jennifer e Dasia, que me permitiram fazer parte de suas vidas, que foram tão presentes e parceiras, sem elas este trabalho não seria possível.

À melhor técnica de laboratório da UFLA, Aline, que também se tornou uma amiga. Que esteve presente auxiliando sempre com muito conhecimento e carinho.

Só tenho a agradecer a todos que contribuíram para a realização desta conquista!

**Muito obrigada!**

*“São nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos.” (J.K. Rowling)*



## RESUMO

*Rhipicephalus microplus* são carrapatos de importância na medicina veterinária e na saúde pública por serem vetores de diversos patógenos, especialmente para os bovinos. Devido à seleção de linhagens resistentes a produtos químicos sintéticos usados no controle desses carrapatos e sua toxicidade aos hospedeiros, há a necessidade de identificação de novas substâncias que sejam eficazes e causem menos efeitos adversos. Os pinenos são conhecidos por seus diversos efeitos biológicos, como sua ação inseticida, por exemplo. Por este motivo, no presente estudo, foram avaliados os efeitos do  $\alpha$  e do  $\beta$ -pineno obtidos comercialmente no desempenho reprodutivo do carrapato-do-boi. Para isso, os produtos foram diluídos em diferentes concentrações em solução aquosa de Tween 80 a 2%. Fêmeas de carrapatos *R. microplus* foram previamente pesadas (PF) e, posteriormente, imersas nas soluções-teste por cinco minutos. Em seguida, os animais foram secos com papel toalha e fixados dorso-ventralmente em placas de Petri, totalizando cinco grupos de tratamento para cada pineno e um grupo controle. Os carrapatos foram monitorados diariamente e os seus ovos foram coletados, pesados e incubados a 27°C em estufa BOD. A taxa de eclosão das larvas foi estimada visualmente e os períodos de pré-oviposição e de incubação dos ovos foram determinados. A partir destes dados, foi calculado o índice de produção de ovos, a taxa de fecundidade, a taxa de reprodução estimada, as porcentagens de redução da oviposição e eclosão e a eficácia do produto. O  $\alpha$ -pineno apresentou resultados dose-dependentes, ao contrário do  $\beta$ -pineno, que foi mais efetivo nas menores concentrações. A eficácia do  $\alpha$ -pineno foi de 74% na concentração de 14,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , enquanto o  $\beta$ -pineno apresentou 78% de eficácia a 2,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Os resultados demonstraram diferenças entre os efeitos de ambos os pinenos sugerindo que ambos os compostos, além de apresentarem potencial acaricida, afetam a reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

**Palavras-chave:** Acaricida. Controle. Carrapato-do-boi. Produtos naturais. Eficácia.

## ABSTRACT

*Rhipicephalus microplus* are important ticks in veterinary medicine and public health because they are vectors of several pathogens, especially for cattle. Due to the selection of resistant strains to synthetic chemicals used to control these ticks and their toxicity to hosts, there is a need to identify new substances that are effective and cause fewer adverse effects. Pinenes are known for their various biological effects, such as their insecticidal action, for example. For this reason, in the present study, the effects of  $\alpha$  and  $\beta$ -pinene commercially obtained on the reproductive performance of the cattle tick were evaluated. For this, the products were diluted in different concentrations in a 2% Tween 80 aqueous solution. Female *R. microplus* ticks were previously weighed and subsequently immersed in the test solutions for five minutes. Then, the animals were dried with paper towels and fixed dorsoventrally in Petri dishes, totaling five treatment groups for each pinene and a control group. Ticks were monitored daily, and their eggs were collected, weighed and maintained at 27°C in a BOD incubator. The larval hatching rate was visually estimated, and the pre-oviposition and egg incubation periods were determined. From these data, the egg production index, the fecundity rate, the estimated reproduction rate, the percentages of oviposition and hatching reduction and the effectiveness of the product were determined.  $\alpha$ -pinene showed dose-dependent results, unlike  $\beta$ -pinene, which was more effective at lower concentrations. The efficacy of  $\alpha$ -pinene was 74% at 14.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , while  $\beta$ -pinene showed efficacy of 78% at 2.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . The results showed differences in the effects of both pinenes suggesting that both compounds, in addition to presenting acaricidal potential, affected the reproduction of engorged females of *R. microplus*.

**Keywords:** Acaricide. Control. Cattle-tick. Natural products. Efficacy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Figura 2- Representação do ciclo de vida dos carrapatos monoxenos.

Figura 3- Representação da distribuição geográfica dos países que mais relataram resistência de *Rhipicephalus* spp. a acaricidas químicos sintéticos comumente utilizados.

Figura 4- Fórmulas estruturais dos enantiômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno.

Figura 5- Fêmeas selecionadas sendo lavadas em água corrente.

Figura 6- Fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas imersas em solução  $\alpha$ -pineno diluída na concentração de 14,0  $\mu\text{l/mL}$  em Tween 80 a 2% em água destilada.

Figura 7- Fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas imersas em solução  $\beta$ -pineno diluída na concentração de 5,0  $\mu\text{l/mL}$  em Tween 80 a 2% em água destilada.

Figura 8- Placas de Petri contendo os carrapatos *R. microplus* após tratamento, em incubadora BOD sob condições controladas.

Figura 9- Fêmea de *Rhipicephalus microplus* ingurgitada com a cutícula enrijecida, indicativo de morte do carrapato.

Figura 10- Fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, dispostas em Placas de Petri, realizando a postura dos ovos.

Figura 11- Pesagem da massa de ovos de carrapatos *Rhipicephalus microplus*.

Figura 12- Alterações observadas em peça bucal de fêmea tratada com  $\beta$ -pineno.

Figura 13- Ovos com aspecto seco e não aderidos uns aos outros sem taxa de eclosão.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagem de mortalidade das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas a diferentes concentrações  $\alpha$ -pineno.

Tabela 2- Porcentagem de mortalidade das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas a diferentes concentrações  $\beta$ -pineno.

Tabela 3- Peso médio das fêmeas antes da oviposição (PF), peso da massa de ovos (PM), índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE), taxa de fecundidade (TF), período pré-oviposição (PPO), período de incubação (PI), taxa de reprodução estimada (RE), porcentagem de redução da oviposição e da eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) em fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas tratadas com concentrações subletais de  $\alpha$ -pineno.

Tabela 4- Peso médio das fêmeas antes da oviposição (PF), peso da massa de ovos (PM), índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE), taxa de fecundidade (TF), período pré-oviposição (PPO), período de incubação (PI), taxa de reprodução estimada (RE), porcentagem de redução da oviposição e da eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) em fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas tratadas com concentrações subletais de  $\beta$ -pineno.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1- Porcentagens de redução da oviposição e eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) nos grupos tratados com concentrações subletais de  $\alpha$ -pineno em relação ao grupo controle (Tween 80 a 2% em água destilada).

Gráfico 2- Porcentagens de redução da oviposição e eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) nos grupos tratados com concentrações subletais de  $\beta$ -pineno em relação ao grupo controle (Tween 80 a 2% em água destilada).

## LISTA DE SIGLAS

B.O.D	Demanda bioquímica de oxigênio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
IPO	Índice de produção de ovos
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
PF	Peso das fêmeas
PI	Período de incubação
PM	Peso da massa de ovos
PPO	Período pré-oviposição
RE	Taxa de reprodução estimada
TE	Taxa de eclosão de ovos
TF	Taxa de fecundidade
TIA	Teste de imersão de adultos
%Rovip	Porcentagem de redução de oviposição
%Reclo	Porcentagem de redução de eclosão
%C	Porcentagem de eficácia

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>15</b>
<b>2. Referencial teórico</b>	<b>17</b>
2.1 Rhipicephalus (Boophilus) microplus	17
2.2 Controle de carrapatos e resistência	19
2.3 Óleos essenciais e extratos vegetais	21
2.4 $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno e suas propriedades	23
2.5 Tween 80	27
<b>3. Objetivos</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>28</b>
4.1 Rhipicephalus microplus	28
4.2 Teste de Imersão de Adultos	28
4.3 Análises estatísticas	32
<b>5. Resultados</b>	<b>32</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>39</b>
<b>7. Considerações finais</b>	<b>43</b>
<b>8. Agradecimentos</b>	<b>43</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>44</b>

## 1. Introdução

A atividade mais importante e mais rentável do agronegócio é a pecuária, possuindo por volta de 1,49 bilhão de cabeças de gado no mundo todo (PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020). Com aproximadamente 224,6 milhões de cabeças, o Brasil ocupa a segunda posição em maior rebanho bovino do mundo (IBGE, 2022). Neste contexto, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), conhecido como carrapato-do-boi, é considerada a espécie de maior importância para a pecuária no mundo quando se trata de ectoparasitos (ABBAS et al., 2014). A alta prevalência de patógenos que são transmitidos por esses ectoparasitos é de grande importância na medicina veterinária e na saúde pública. Além disso, a infestação de carrapatos traz prejuízos econômicos que podem ser causados por meio de perda de sangue, estresse e irritação, diminuição da produção de leite e carne, perda do couro, prostração, diminuição da função imunológica, danos à pele, entre outros (DANTAS-TORRES, 2009; ABBAS, 2014; PASCOETI et al., 2016).

Doenças causadas por patógenos transmitidos por carrapatos, como a theileriose e a babesiose, além de riquetsioses, como a anaplasmosse, são as patologias mais comuns em pequenos e grandes ruminantes, afetando a subsistência de comunidades agrícolas na África, Ásia e América Latina (ADENUBI et al., 2016). Além disso, do ponto de vista econômico, o carrapato-do-boi é o responsável pelas maiores perdas mundiais, ocasionando prejuízos que podem chegar a US\$3,24 milhões de dólares por ano só no Brasil (EMBRAPA, 2021).

Para contornar este problema, o uso de acaricidas químicos sintéticos é o principal método de controle atualmente, gastando-se milhões de dólares ao ano com esta alternativa (BANUMATHI et al., 2017; BORGES et al., 2011; CASTREJÓN et al., 2003; CRUZ et al., 2013).

Os produtos químicos mais utilizados são também os mais tóxicos (CETIN, et al., 2010). As dosagens empregadas são maiores que as recomendadas, em virtude da ocorrência de resistência, além da aplicação geralmente não seguir as normas básicas de segurança (CETIN et al., 2010; ADENUBI et al., 2016; HIGA et al., 2016; ALVES et al., 2012). Neste sentido, alguns produtores fazem uso indiscriminado desses produtos, causando, na maioria das vezes, redução de sua eficácia e gerando grandes possibilidades de seleção de linhagens resistentes ao composto usado no controle (ADENUBI et al., 2016; ALVES et al., 2012).

Outro agravante, segundo Gromboni et al. (2007), é que são descartados, de forma indiscriminada, centenas de galões de resíduos deixados por esses acaricidas químicos sintéticos que, ao entrarem em contato com o solo e com a água, os contaminam.



Incluem-se ainda os problemas de saúde que podem afetar os humanos, uma vez que a maioria dos produtores rurais não utiliza equipamentos de proteção adequados. Além disso, quando o tempo de carência dos produtos não é respeitado, os resíduos que ficam na carne e no leite podem ser prejudiciais à saúde humana (BANUMATHI et al., 2017; ADENUBI et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2016; GAZIM et al., 2017).

As questões mencionadas têm motivado a busca por estratégias alternativas de controle, por meio da utilização de produtos que sigam os critérios da saúde única e não sejam tóxicos para o ambiente, para os animais e para os humanos, além de apresentarem custo reduzido, serem mais acessíveis e não ocasionarem resistência tão rapidamente (ALVES et al., 2012; GHOSH et al., 2006).

Neste sentido, os produtos de origem vegetal se destacam, pois se encaixam em todos esses requisitos citados. Assim, a procura por produtos vegetais, como os óleos essenciais, com propriedades acaricidas, que possam ser usados em associação ou até mesmo como substitutos por completo de produtos sintéticos já usados no mercado, tem sido realizada (PAZINATO et al., 2014; ADENUBI et al., 2016; BANUMATHI et al., 2017).

Uma das vantagens do uso desses compostos é que a resistência se desenvolve lentamente, pois geralmente há uma mistura de diferentes agentes ativos com diferentes mecanismos de ação (ADENUBI et al., 2016). Apesar disto, existem algumas desvantagens no uso dos óleos essenciais, uma vez que eles são compostos por diversos princípios ativos e devido a isto, a toxicidade e a atividade biológica destes produtos podem variar (RIVAS et al., 2012). Fatores, como o clima e o solo, também podem influenciar nas características dos óleos essenciais (RIVAS et al., 2012). Visto isso, o uso de princípios ativos isolados dos óleos essenciais parece ser uma alternativa mais viável, superando a variabilidade que os óleos essenciais apresentam (PALERMO et al., 2021).

Os princípios ativos têm ganhado mais visibilidade, visto os bons resultados alcançados em pesquisas (MATOS et al., 2014; PEREIRA-JUNIOR et al., 2019; KONIG et al., 2020). Monoterpenos, como  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, são conhecidos por exercerem várias atividades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-proliferativa, antioxidante, fungicida e até inseticida (SILVA et al., 2012; TURKEZ & AYDIN, 2013; SALEHI et al., 2019). Nesse contexto, os pinenos têm despertado o interesse de pesquisadores como potenciais acaricidas naturais.

## 2. Referencial teórico

### 2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios de animais vertebrados em pelo menos uma fase do ciclo de vida. Podem parasitar uma enorme variedade de hospedeiros e, por este motivo, transmitir diferentes patógenos a eles (BANUMATHI, 2017; ADENUBI, 2016; DANTAS TORRES, 2009). Além disso, podem causar paralisia, toxicoses e reações alérgicas (JONGEJAN & UILENBERG, 2005). Sendo assim, são considerados de grande importância médica e médico-veterinária (BANUMATHI, 2017; ADENUBI, 2016; DANTAS TORRES, 2009).

Esses artrópodes são bem distribuídos geograficamente, sendo encontrados em quase todas as partes do mundo, e são mais prevalentes na época de chuvas e maiores temperaturas (verão), em que a incidência de infestação e doenças também é maior (ADENUBI, 2016).

Os carrapatos podem transmitir protozoários, bactérias e vírus, estando entre os mais importantes vetores de doenças que podem ser gravemente debilitantes ou fatais para humanos, animais de criação, de companhia e silvestres em todo o mundo (ADENUBI, 2016), uma vez que podem infestar qualquer espécie de animal vertebrado, desde anfíbios até os mamíferos (DANTAS TORRES, 2009).

Com relação a taxonomia, os carrapatos são divididos em três famílias principais: Ixodidae (12 gêneros), cujos membros são conhecidos como carrapatos duros; Argasidae (5 gêneros), também denominados carrapatos moles, e Nuttalliellidae, monotípicos, mais ancestrais (MANS et al., 2011).

Algumas características são de grande importância taxonômica na identificação dos Ixodidae. As fêmeas possuem um escudo na parte dorsal que pode chegar a cobrir cerca de um terço do seu corpo, enquanto os machos têm o escudo cobrindo todo o seu corpo. Por esse motivo, são denominados “carrapatos duros”. Mesmo assim, quando ingurgitadas, as fêmeas podem chegar até cem vezes o seu tamanho original (SONENSHINE et al., 2014).

Seu aparelho bucal, chamado capítulo, é projetado anteriormente ao corpo e possui várias protuberâncias na parte ventral. São quelicerados e sem mandíbula verdadeira, e possuem um hipostômio. A dentição do hipostômio pode ser observada e é considerada uma característica importante para a taxonomia (SONENSHINE et al., 2014).

Existem mais de novecentas espécies já descritas de carrapatos e, dentre eles, o carrapato-do-boi ou carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é considerado a espécie mais importante quando se trata de parasitos de gado dos países

tropicais (Figura 1) (ABBAS, 2014). Isto porque estes animais podem causar enormes perdas econômicas em rebanhos em países tropicais como o Brasil e em outros lugares do mundo, como a Índia e a Ásia (ADENUBI, 2016). A atividade pecuária é de extrema importância econômica para o Brasil, visto que o país possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com 213,8 milhões de indivíduos desta espécie (DE SOUZA et al., 2019). Porém, a produtividade agropecuária é reduzida quando há infestação de ectoparasitos, como os carrapatos (ALVES et al., 2012; LAGE et al., 2013; CALVANO et al., 2019).

**Figura 1. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.**



**Fonte: Do autor, 2023.**

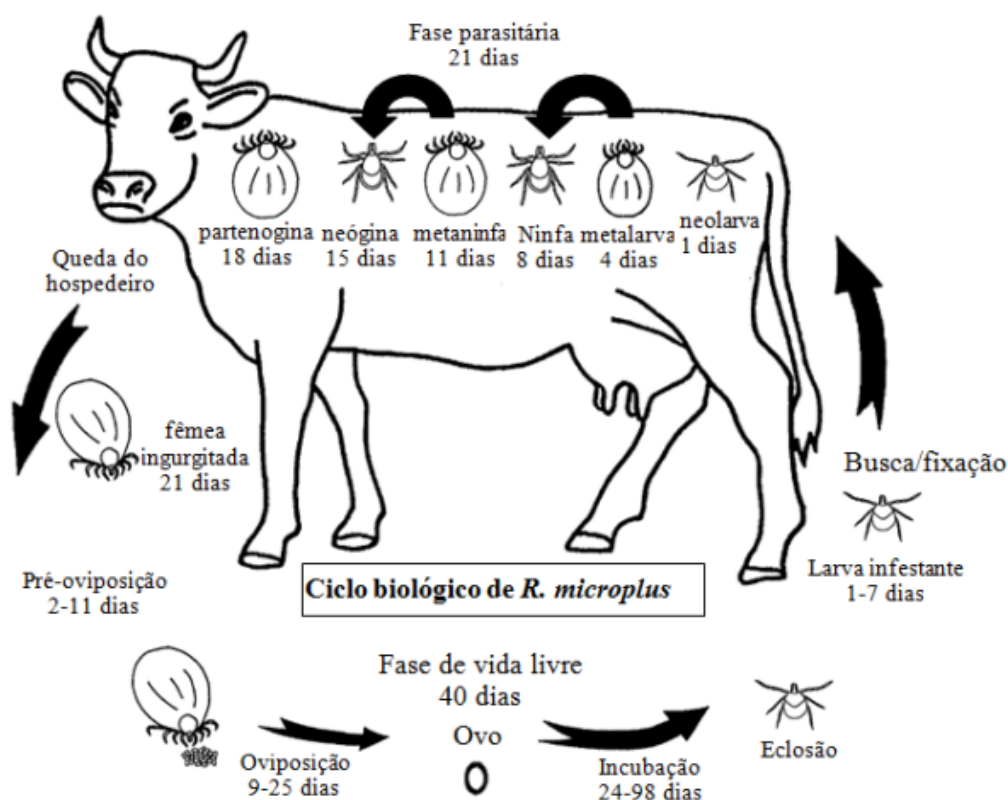
Os prejuízos econômicos podem ser causados por meio de perda de sangue, estresse e irritação, prostração, diminuição da produção de leite e carne, diminuição da função imunológica, danos à pele e transmissão de diversos patógenos, principalmente *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp., causadores da "tristeza parasitária bovina" (ABBAS, 2014; PASCOETI et al., 2016). Deste modo, são considerados uma grande ameaça para os pecuaristas uma vez que as doenças transmitidas por carrapatos afetam cerca de 80% da população mundial de bovinos (DE MENEGHI, 2016; FERNANDÉZ-SALAS, 2012).

Os carrapatos *R. microplus* pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida (Metastigmata) e família Ixodidae (SONENSHINE; ROE, 2014) (Figura 1). Pertencem ao gênero *Rhipicephalus*, uma vez que recentes estudos moleculares mostraram grande relação filogenética entre *Rhipicephalus* e *Boophilus* (ALVES et al., 2012). Os carrapatos-do-boi são classificados como Metastriata, por possuírem um sulco posterior à abertura anal.

Os carrapatos *R. microplus* são parasitos monoxenos, ou seja, permanecem no mesmo hospedeiro nos seus três estágios parasitários (larva, ninfa e adulto), deixando-os apenas

quando adultos para fazer a postura dos ovos. As fêmeas ingurgitadas descem do hospedeiro e depositam seus ovos no ambiente, de onde eclodem as larvas, que apresentam apenas três pares de pernas. As larvas procuram e fixam-se em um novo hospedeiro e, após duas ecdises, tornam-se adultas, com quatro pares de pernas. As fêmeas adultas se desprendem do hospedeiro para a postura dos ovos no ambiente e o ciclo se repete para que a manutenção da espécie seja realizada (Figura 2) (COLWELL; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2011).

**Figura 2. Representação do ciclo de vida monoxeno dos carrapatos-do-boi.**



**Fonte: Adaptado de Sonenshine et al. (2014).**

## 2.2 Controle de carrapatos e resistência

O custo estimado com controle de carrapatos e com doenças transmitidas por eles é de 13,9 bilhões a 18,7 bilhões de dólares ao ano (DE MENEGHI, 2016). A forma mais comum e utilizada para controlar a infestação desses artrópodes é a aplicação direta de acaricidas químicos nos seus hospedeiros (DE MENEGHI, 2016; HIGA, et al., 2019).

Contudo, de acordo com De Meneghi (2016), este método é insustentável quando repetido de forma indiscriminada ao longo dos anos (Figura 3). Além disso, de acordo com Lage et al. (2013), no Brasil, a maioria destes acaricidas químicos comerciais não apresenta eficácia superior a 70% por causa da seleção de cepas de carrapatos resistentes a estes

produtos. Casos de resistência foram detectados, inclusive, para quase todos os produtos químicos registrados para uso contra a espécie *R. microplus* (CASTRO-JANER, 2009).

**Figura 3. Representação da distribuição geográfica dos países que mais relataram resistência de *Rhipicephalus* spp. a acaricidas químicos sintéticos comumente utilizados.**



**Fonte: Rodriguez-Vivas et al. (2018).**

Segundo Abbas et al. (2014), a resistência é reconhecida como a falha de determinada droga na tarefa de controlar o parasitismo; apesar disso, a definição formal de resistência é uma mudança na suscetibilidade da espécie alvo para uma droga. O Grupo Científico da Organização Mundial da Saúde (1965) propôs a definição de resistência em termos gerais como “a capacidade de uma cepa de determinado parasito sobreviver e/ou se multiplicar, apesar da administração e absorção de um medicamento administrado em doses iguais ou superiores às normalmente recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância do sujeito”.

Existem diferentes classes de acaricidas sintéticos que são comumente disponíveis e usados, como os piretróides, os organofosforados, os carbamatos, e as amidinas. Estes compostos geralmente são muito eficazes e estáveis mesmo quando usados em baixas concentrações (DE MENEGHI, 2016; HIGA et al., 2019). Em contrapartida, os organofosforados podem se acumular nos tecidos e no leite do gado e, por este motivo, não são recomendados para vacas em período de amamentação ou vacas leiteiras. Já os piretróides demonstraram atividade residual prolongada nos tecidos, por pelo menos de sete a dez dias. As amidinas, por sua vez, também mostraram atividade residual, embora menos prolongada, por cerca de quatro a cinco dias (DE MENEGHI, 2016). Os produtos mais utilizados, inclusive, são também os mais tóxicos, como os organofosforados e os piretróides (CETIN, et al., 2010).

Além dos compostos citados acima, existem outros químicos sintéticos que podem ser utilizados no controle de carrapatos, como as lactonas macrocíclicas e as benzoilfeniluréias, porém esses compostos podem ser financeiramente custosos e deixar resíduos químicos na carne e/ou no leite, afetando direta e indiretamente as populações que produzem e consomem esses produtos (DE MENEGHI, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2016).

Em particular, observa-se grande resistência adquirida pela espécie *R. microplus*, que em populações de campo pode ocorrer dentro de dois anos (Figura 3) (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018). Isto porque a biologia desta espécie a favorece neste sentido: por ser um carrapato monoxeno, consegue realizar todo o seu ciclo de vida no mesmo animal em até 21 dias, o que permite de 3 a 5 gerações de indivíduos por ano. Assim, estão sujeitos a uma forte pressão de seleção natural (DE MENEGHI, 2016; PAZINATO et al., 2014) e urge a necessidade de métodos de controle alternativos, mais seguros e eficientes, de forma a diminuir a dependência dos produtos químicos sintéticos que causam intoxicação nos animais, nos humanos, no meio ambiente, no solo, nos alimentos e na água (LAGE et al., 2013).

### **2.3 Óleos essenciais e extratos vegetais**

Para o controle seguro de artrópodes, a comunidade científica salienta o uso de estratégias que estejam de acordo com o conceito de One Health, ou seja, que contemplem a importância de preservar a saúde humana, animal e o meio ambiente de forma que nenhum seja prejudicado ou esquecido (BENELLI & PAVELA, 2018). Assim, na busca por novos métodos de controle, as plantas medicinais surgem como alternativa viável e muito promissora, devido à variabilidade de espécies encontradas, ao baixo custo, à acessibilidade em determinadas regiões e às características dos óleos essenciais nelas encontrados (BANUMATHI et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2016). Um grande número de plantas e seus derivados tem sido relatado por apresentarem efeito acaricida, demonstrando atividade contra diversos estágios de várias espécies de carrapatos (APEL et al., 2009).

Devido à sua baixa toxicidade para mamíferos de forma geral e para o meio ambiente, em virtude de sua fácil biodegradabilidade causada pela luz do dia, temperatura, pH e ação microbiana, os óleos essenciais são considerados uma ótima alternativa para o controle de carrapatos (TAK, ISMAN, 2018; BORGES et al., 2011).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e odoríferas originárias do metabolismo secundário das plantas. São compostos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados como álcoois, aldeídos,

ésteres, cetonas, fenóis e óxidos (RIVAS et al., 2012). Óleos essenciais, terpenos, fenilpropanoides e terpenóides isolados têm mostrado atividade sobre diversos estágios de diversas espécies de carrapatos, como *Ixodes scapularis* e *R. microplus* (APEL et al., 2009). Esses produtos, além de serem mais seguros que os acaricidas sintéticos (TAK, ISMAN, 2018), possuem inúmeras atividades biológicas, como ação inseticida, acaricida e repelente, gerando dificuldades de oviposição e alimentação em insetos e outros tipos de artrópodes e, assim, dificultando o desenvolvimento de cepas resistentes (ADENUBI et al., 2018; TAK, ISMAN, 2018).

De acordo com Miguel (2010), os óleos essenciais podem ser obtidos de qualquer parte da planta, como raiz, rizomas, caules, folhas, frutos ou sementes. Contudo, a depender da planta utilizada para a extração, a composição do óleo, sua toxicidade e atividade biológica podem variar (RIVAS et al., 2012). Além disso, outros fatores, como o clima e o solo, também podem influenciar nas características dos óleos, que podem ser extraídos das plantas por destilação por arraste a vapor, hidrodestilação ou por outro métodos de extração (MIGUEL, 2010; RIVAS et al., 2012).

Para produção de novos produtos naturais, técnicas biotecnológicas inovadoras estão sendo desenvolvidas e aplicadas para alterar o metabolismo secundário das plantas, com o intuito de melhorar a qualidade e a quantidade de metabólitos de interesse específico (NCUBE et al., 2015).

Alguns produtos de origem vegetal e seus constituintes exercem efeitos nocivos sob o sistema nervoso de ectoparasitos (ABBAS et al., 2018). Um exemplo disso é o terpinen-4-ol, que pode inibir a liberação de acetilcolinesterase, essencial para a atividade dos insetos e sua transmissão sináptica (LOPEZ & PASCUAL-VILLALOBOS, 2010). Componentes de óleos essenciais também são conhecidos por agir sobre a octopamina, um importante neuromodulador circulante, resultando na sua interrupção e consequente perda de transmissão sináptica do sistema nervoso de insetos (ABBAS et al., 2018). Ademais, os óleos essenciais são de natureza hidrofóbica e podem causar estresse hídrico em insetos, bloqueando seus espiráculos e resultando em asfixia fatal (BURGESS, 2009).

Produtos de origem vegetal também podem ser rapidamente absorvidos pelo organismo após administração dérmica. Assim, atravessam a barreira hematoencefálica e interagem com receptores no sistema nervoso. A maioria dos componentes dos óleos essenciais são solúveis em gordura e têm a capacidade de permear as membranas e atuar nos órgãos-alvo (ADORJAN & BUCHBAUER, 2010).

Outra ação dos óleos essenciais é a capacidade de deteriorar a membrana celular e as organelas da célula, como as mitocôndrias e peroxissomos (BAKKALI et al., 2008). Além disso, produtos de origem vegetal podem afetar a taxa de crescimento, reprodução, longevidade e oviposição dos artrópodes (CASTILHOS et al., 2018; GONÇALVES et al., 2019; LUNGUINHO et al., 2021), além de atuar como repelentes, quimioesterilizantes, biocidas e impedir a alimentação dos artrópodes (TABARI et al., 2020; APEL et al., 2009).

Geralmente, os produtos extraídos de plantas têm menos propensão à seleção de linhagens resistentes, uma vez que são compostos por diferentes substâncias e, por este motivo, agem por diferentes mecanismos de ação (ADENUBI et al., 2016; ROSADO-AGUILAR et al., 2010). Entretanto, apesar de suas vantagens, os óleos essenciais podem apresentar inconsistência em sua composição (ABBAS et al., 2018). Diferentes partes de uma mesma planta podem gerar diferenças nas composições de seus óleos essenciais (NA et al., 2011). o que pode prejudicar sua eficácia acaricida (ABBAS et al., 2018). Além disso, a composição química dos compostos presentes nos óleos essenciais pode variar de acordo com diferentes fatores como as estações do ano, condições e tipo do solo e disponibilidade de água (ANDRADE et al., 2011). Outro fator importante que afeta a composição de óleos essenciais é a variedade genética das plantas. Todos esses fatores, incluindo genéticos e epigenéticos, afetam a síntese bioquímica de compostos químicos de uma determinada planta (ABBAS et al., 2018).

Dentre os compostos extraídos de plantas, o  $\alpha$ -pineno e o  $\beta$ -pineno podem ser alternativas viáveis visto suas propriedades biológicas já conhecidas, como ação anti-inflamatória, analgésica, antiulcerogênica, além de suas propriedades antimicrobianas, antiproliferativas e antioxidantes (CÂMARA et al., 2003; COELHO-DE-SOUZA et al., 2005; TURKEZ&AYDIN, 2013). Além disso, alguns trabalhos já relataram efeito acaricida advindo de óleos essenciais com alto teor de  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno (APEL et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2018).

## **2.4 $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno e suas propriedades**

Os monoterpenos são substâncias químicas lipofílicas e possuem estruturas altamente voláteis. Eles são líquidos, incolores, quimicamente reativos, apresentam aroma bem característico e são a classe mais abundante dos terpenos presentes nas plantas e óleos essenciais (CHOWHAN et al., 2013). É um grupo que possui inúmeros compostos que possuem esqueletos básicos variáveis e exibem estereoisômeros. No metabolismo das plantas,

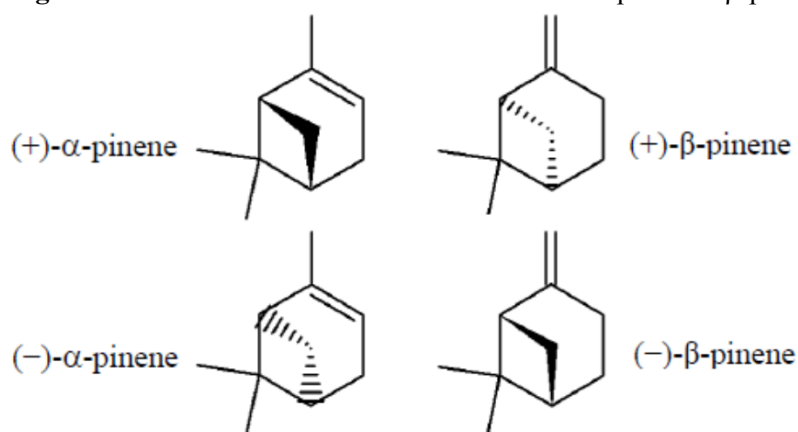


eles são constituintes da membrana e podem funcionar como pigmentos fotossintéticos, substâncias de crescimento e hormônios vegetais. Além disso, eles agem como transportadores de glicose em reações de glicosilação e estão envolvidos na regulação do crescimento celular (THOLL et al., 2006). Além disso, são os principais constituintes dos óleos essenciais aromatizantes e de atividade antimicrobiana (GUIMARÃES et al. 2019). Uma vantagem é que a maioria dos monoterpenos encontrados em produtos de origem vegetal não apresentam toxicidade para os vertebrados nem para o meio ambiente (KOSTYUKOVSKY et al., 2002; GROSS et al., 2017), o que faz deles uma boa alternativa aos inseticidas químicos (OLIVEIRA, 2015). Devido a sua abundância na natureza, são promissoras matérias primas para processos biológicos, como biotransformação, bioconversão e reações enzimáticas, inclusive do ponto de vista econômico (VESPERMANN et al., 2017).

É de comum acordo que os monoterpenos apresentam um papel biológico importante (ENAN, 2001). Muitos deles apresentam capacidade de atrair diversas espécies de polinizadores, repelir de insetos herbívoros, além de atuarem como deteriorantes da alimentação, estimulantes ou inibidores da oviposição, e afetarem o comportamento de pouso de insetos (ENAN, 2001). Um bom exemplo disto é que em seu trabalho, Gross et al. (2017) demonstraram a interação de monoterpenos com o receptor de tiramina do carrapato-do-boi, inibindo a liberação de neurotransmissores, o que indica que estes receptores podem ser alvos viáveis para o controle desses parasitos. Além da sua ação sobre os receptores de tiramina, os monoterpenos são capazes de interagir com a octopamina, um importante neuromodulador circulante, resultando na sua interrupção e consequente perda de transmissão sináptica do sistema nervoso dos insetos (ABBAS et al., 2018).

$\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno são monoterpenos, ambos são isômeros, ou seja, são substâncias químicas que apresentam propriedades físicas e químicas diferentes, mas que possuem a mesma fórmula molecular (SILVA et al., 2012). Ambos os isômeros são separados em enantiômeros, ou seja, são isômeros espaciais opticamente ativos, que são assimétricos e são a imagem especular um do outro (Figura 4) (VESPERMANN et al., 2017). Esses enantiômeros são conhecidos na natureza como S (+) ou R (-) resultando, desta forma, em quatro isômeros opticamente ativos (SILVA et al., 2012). A presença de um ou mais isômeros de  $\alpha$ -pineno já foi relatada em pelo menos 400 óleos essenciais (BERGER, 2007). Enquanto isso, o  $\beta$ -pineno, por ser encontrado em quantidades menores que o  $\alpha$ -pineno, é menos explorado quanto às suas possíveis aplicações e efeitos biológicos (ALVAREZ-CASTELLENOS et al., 2001; BAJPAI et al., 2007; RAJESWARA RAO et al., 2011; VESPERMANN et al., 2017).

**Figura 4.** Fórmulas estruturais dos enantiômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno.



Fonte: Silva et al. (2012).

O  $\alpha$ -pineno (2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno) é um composto líquido, incolor, da classe dos terpenos, sendo especificamente um monoterpeneo bicíclico (hidrocarbonetos de fórmula  $C_{10}H_{16}$  formados por duas unidades de isopreno). É um composto insolúvel em água, mas com solubilidade em óleos e etanol, com ponto de ebulição de  $155^{\circ}C$ . É encontrado como composto majoritário principalmente nas folhas, caules, sementes e frutos de diferentes plantas (VESPERMANN et al., 2017), como *Eucalyptus* sp. (eucalipto), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Pinus* sp. (pinheiro) e *Lavandula officinalis* (lavanda), que já são utilizadas em alguns âmbitos da farmacologia e medicina para diferentes tratamentos (CÂMARA et al., 2003).

O  $\alpha$ -pineno é amplamente conhecido por suas várias propriedades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-proliferativa, antioxidante e anti-leishmania (TURKEZ; AYDIN, 2013; DIAS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015). Apesar disso, as atividades de monoterpeneos isolados ainda têm sido pouco estudadas, principalmente em relação à sua atividade acaricida, embora já apresentem algum potencial neste sentido, principalmente *in vitro* (FERREIRA et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2018).

Aparicio-Zambrano et al. (2019), demonstraram a eficácia do óleo essencial de *Libanothamus neriifolius* (Asteraceae) contra microrganismos e atribuíram esta eficácia à presença de alguns compostos presentes no óleo essencial, como o  $\alpha$ -pineno (13,57%), terceiro composto majoritário presente no óleo essencial, e o  $\beta$ -pineno (3,50%).

Gross et al. (2017), por sua vez, afirmaram que o  $\alpha$ -pineno diminuiu o cálcio intracelular em carrapatos *R. microplus*. Já Macchioni et al. (2006) testaram o potencial acaricida dos óleos essenciais das espécies *Laurus nobilis* e *Laurus novocanariensis* em ácaros da espécie *Psoroptes cuniculi*. A caracterização dos óleos essenciais revelou que

*Laurus nobilis* possuía 91,8% de monoterpenos, sendo o  $\alpha$ -pineno o quinto composto mais abundante (5,2%), enquanto em *Laurus novocanariensis* os monoterpenos representaram 36% dos compostos totais, sendo o  $\alpha$ -pineno o mais abundante (10,4%). O óleo de *L. novocanariensis*, nas concentrações de 10% e 5% após 24h de contato com ácaros, mostrou atividade acaricida de 100%. Já a atividade acaricida do óleo de *L. nobilis*, na concentração de 10%, levou a uma mortalidade de apenas 73%.

O  $\beta$ -pineno (6,6-dimetil-2-metilidenobicyclo[3.1.1]heptano) também é um monoterpeno (hidrocarbonetos de fórmula C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> formados por duas unidades de isopreno [C<sub>5</sub>]) cíclico presente em óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas que podem ter propriedades medicinais (CARDOSO et al., 2000). O  $\beta$ -pineno é insolúvel em etanol e água, porém apresenta solubilidade em óleos. Seu ponto de ebulição pode variar de 163°C a 166°C. O produto pode ser obtido comercialmente por destilação ou por conversão a partir do  $\alpha$ -pineno. Ele é um componente da terebintina, um líquido obtido por destilação de resina de coníferas e usado como solvente, e geralmente aparece em plantas do gênero *Pinus*, assim como pode ser encontrado nos óleos essenciais de eucalipto, malva-santa, alecrim, salsa, endro e alfavaca (CHOWHAN et al., 2013; VESPERMANN et al., 2017). Além disso, é considerado um intermediário essencial na produção de produtos lácteos refrigerados, mentol, iononas, linalol, geraniol, citronelal, citral, citronelol e doces (VESPERMANN et al., 2017; SALEHI et al., 2019). Além de suas propriedades medicinais, o  $\beta$ -pineno pode ser utilizado em detergentes e outros produtos de limpeza, produtos de higiene, perfumes, xampus, sabonetes, entre outros produtos (LETIZIA et al., 2003).

Entre as atividades biológicas já relatadas para o  $\beta$ -pineno, destacam-se a ação miorrelaxante, antimicrobiana (SILVA et al., 2012), antidepressiva (GUZMÁN-GUTIÉRREZ et al., 2012), antiespasmódica, antiinflamatória, ansiolítica, anticonvulsivante (ALMEIDA et al., 2003), hipotensora (MENEZES et al., 2010), fungicida, repelente, inseticida e neurotóxica contra coleópteros (PAJARO-CASTRO et al., 2017) e anti-nematoide (LI et al., 2020).

Pajaro-Castro et al. (2017), investigaram os efeitos de linalol e  $\beta$ -pineno na expressão de genes ligados à neurotransmissão em adultos de coleópteros *Tribolium castaneum*, e a atividade repelente utilizando o método de preferência por área. Os compostos testados exibiram forte atividade repelente. Quando comparado ao linalol, o  $\beta$ -pineno apresentou alta capacidade de provocar modificações na expressão de genes associados à transmissão neural.

Já Apel et al. (2009), verificaram a toxicidade dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Cunila* em larvas de *R. microplus*. Os autores identificaram  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno

como componentes majoritários da espécie *C. incana*, a qual foi responsável por ocasionar taxa de mortalidade de 100% das larvas.

## 2.5 Tween 80

O éter polioxietileno monooleato de sorbitano é um tensoativo anfipático, não iônico, composto por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano e popularmente conhecido como Tween 80 (KERWIN, 2008).

De fórmula molecular  $C_{64}H_{124}O_{26}$ , é um solvente que se adapta a diversos tipos de aplicabilidades. É um produto solúvel em água e geralmente usado para a obtenção de soluções heterogêneas que não se misturam naturalmente, como água e óleo (MAPRIC, 2023).

Outras aplicabilidades do Tween 80 incluem exploração e transporte de petróleo, fármacos, produtos bioterapêuticos (previnem a adsorção superficial e atuam como estabilizadores contra a agregação de proteínas), cosméticos, pigmentos para tintas, alimentação, emulsificante, dispersante, estabilizador, difusor, lubrificante, amaciante, agente antiestático, agente antiferrugem, redutor de viscosidade, produção de detergentes, entre outras (CHEM SINO, 2023).

Tween 80 é amplamente usado para melhorar a solubilidade de produtos em reações químicas, sendo caracterizado por sua elevada resistência à umidade, dispersibilidade e propriedades não tóxicas e não irritantes; por isso, têm sido amplamente utilizado em testes para o desenvolvimento de novos inseticidas. Além disso, o Tween 80 não apresenta toxicidade em humanos e demais mamíferos (LEUNER & DRESSMAN, 2000; LI et al, 2015).

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos compostos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno na mortalidade e no desempenho reprodutivo de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas.

### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar a susceptibilidade de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* a diferentes concentrações dos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, a fim de verificar a porcentagem de mortalidade.

- Verificar os efeitos de concentrações subletais dos compostos  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno nos parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus*.

#### 4. Material e Métodos

##### 4.1 *Rhipicephalus microplus*

As fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* foram coletadas manualmente em uma fazenda de gado naturalmente infestado da cidade de Viçosa-MG. O rebanho não havia recebido tratamento acaricida nos últimos três meses. Em seguida, os animais foram enviados para a Universidade Federal de Lavras, onde foram utilizados para os experimentos. Os carrapatos foram selecionados de acordo com sua integridade física e capacidade de movimentação e, em seguida, lavados em água corrente e secos em papel absorvente macio (Figura 5) para, posteriormente, serem submetidos ao Teste de Imersão de Adultos (TIA) (DRUMMOND et al., 1973).

**Figura 5.** Fêmeas selecionadas sendo lavadas em água corrente.



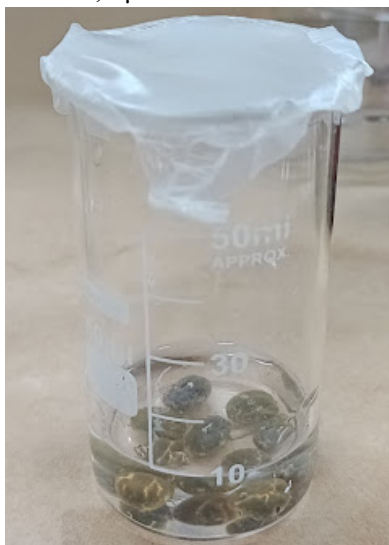
**Fonte:** Do autor, 2023.

##### 4.2 Teste de Imersão de Adultos

O TIA foi realizado conforme adaptação do protocolo desenvolvido por Drummond et al. (1973). Para isso, os carrapatos foram pesados e, em seguida, separados em 11 grupos (n = 100): um grupo controle (C1). Os carrapatos foram submetidos ao solvente (Tween 80 a 2% em água destilada), e dez grupos de tratamento, em que os animais foram expostos a diferentes concentrações dos produtos, sendo cinco grupos para (-)- $\alpha$ -pineno (TA1-TA5) e

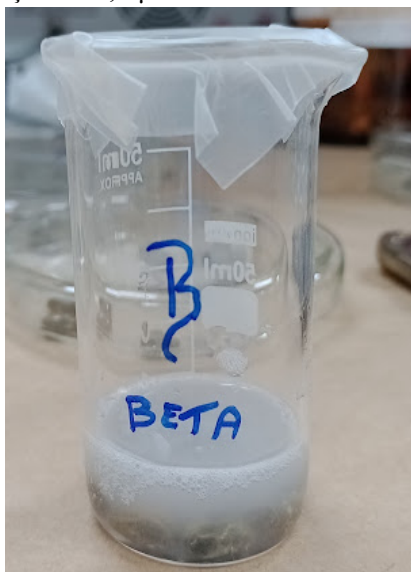
cinco para (-)- $\beta$ -pineno (TB1-TB5), obtidos comercialmente (Merck, Darmstadt, Alemanha). O  $\alpha$ -pineno foi diluído nas concentrações de 2,0 (TA1), 5,0 (TA2), 8,0 (T3A), 11,0 (TA4) e 14,0  $\mu\text{l/mL}$  (TA5) (Figura 6), e o  $\beta$ -pineno foi utilizado nas concentrações de 2,0 (TB1), 5,0 (TB2), 8,0 (TB3), 10,0 (TB4) e 11  $\mu\text{l/mL}$  (TB5) (Figura 7). Apenas um grupo controle foi utilizado para ambos os compostos, visto que todos os procedimentos experimentais foram realizados no mesmo dia e horário, e nas mesmas condições laboratoriais.

**Figura 6.** Fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas imersas em solução  $\alpha$ -pineno diluída na concentração de 14,0  $\mu\text{l/mL}$  em Tween 80 a 2% em água destilada.



**Fonte: Do autor, 2023.**

**Figura 7.** Fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas imersas em solução  $\beta$ -pineno diluída na concentração de 5,0  $\mu\text{l/mL}$  em Tween 80 a 2% em água destilada.



**Fonte: Do autor, 2023.**

Os parasitos foram imersos em béqueres de 10 mL contendo cada uma das soluções durante 5 minutos. Em seguida, os animais foram secos em papel toalha, colados de forma dorso ventral em placas de Petri, mantidos em estufa B.O.D. em condições controladas ( $27,5 \pm 1^\circ\text{C}$  e 95% de umidade) e observados diariamente por sete dias para monitoramento da mortalidade (Figura 8). Os carrapatos considerados mortos foram os que não apresentaram motilidade após estímulo com dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), além de cutícula enrijecida e com coloração enegrecida (Figura 9).

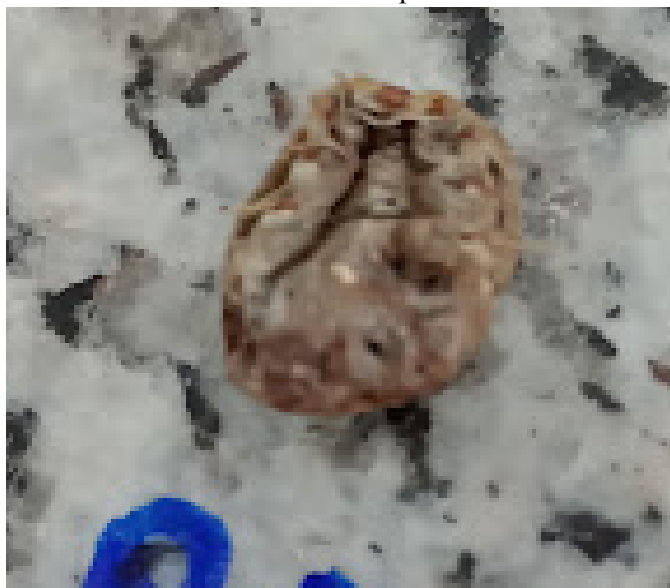
Posteriormente, os carrapatos seguiram em observação diária por mais trinta dias para avaliação do desempenho reprodutivo das fêmeas sobreviventes. O início da postura de cada fêmea foi registrado, para determinação do período de pré-oviposição (PPO (Figura 10). Em seguida, a massa de ovos foi coletada, pesada (PM) (Figura 11), mantida em tubos tipo Falcon em incubadora BOD ( $27,5 \pm 1^\circ\text{C}$  e 95% de umidade) e monitorada diariamente até o início da eclosão, para a determinação do período de incubação (PI). A taxa eclosão (TE) foi estimada visualmente, e a partir dos valores obtidos foram determinados: o índice de produção de ovos ( $\text{IPO} = (\text{PM}/\text{PF}) \cdot 100$ ), a taxa de fecundidade ( $\text{TF} = (\text{IPO} \cdot \text{TE}) / 100$ ) e a taxa de reprodução estimada ( $\text{RE} = (\text{PM}/\text{PF}) \cdot \text{TE} \cdot 20000$ ) (CASTRO-JANER et al., 2009; LAGE et al., 2013).

**Figura 8.** Placas de Petri contendo os carrapatos *Rhipicephalus microplus* após tratamento, em incubadora BOD sob condições controladas.



**Fonte: Do autor, 2023.**

**Figura 9.** Fêmea de *Rhipicephalus microplus* ingurgitada com a cutícula enrijecida, indicativo de morte do carrapato.



**Fonte:** Do autor, 2023.

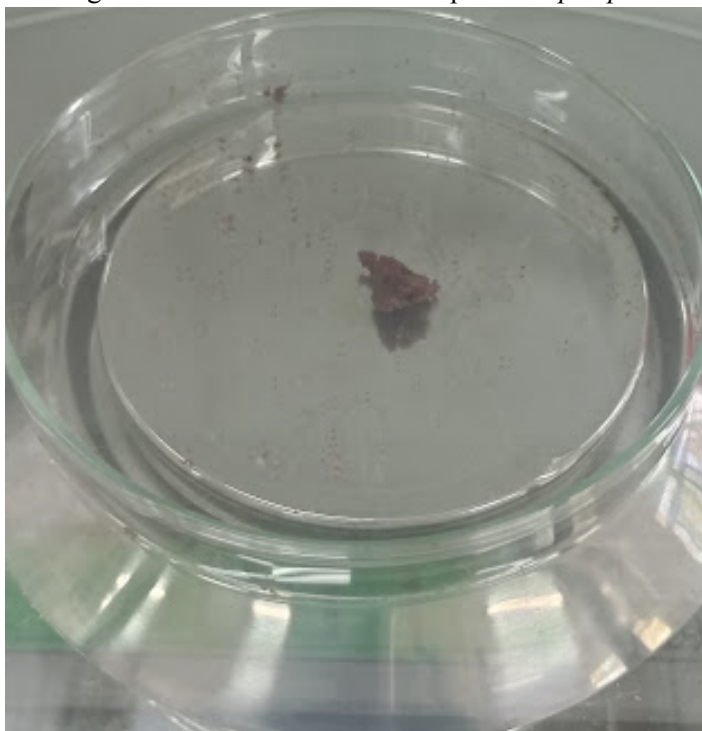
**Figura 10.** Fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, dispostas em Placas de Petri, realizando a postura dos ovos.



**Fonte:** Do autor, 2023.



**Figura 11.** Pesagem da massa de ovos de carrapatos *Rhipicephalus microplus*.



**Fonte:** Do autor, 2023.

Também foram determinadas as porcentagens de redução da oviposição ( $\%Rovip = ((IPO_{controle} - IPO_{tratamento}) / IPO_{controle}) * 100$ ) e da eclosão ( $\%Reclo = ((TE_{controle} - TE_{tratamento}) / TE_{controle}) * 100$ ), bem como a eficácia do produto ou porcentagem de controle ( $\%C = ((RE_{controle} - RE_{tratamento}) / RE_{controle}) * 100$ ) (DRUMMOND et al., 1973; LOPES et al., 2013).

#### 4.3 Análises estatísticas

Os valores obtidos foram analisados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) one-way seguida de teste *post-hoc* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), e os dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste *post-hoc* de Dunn ( $\alpha=0.05$ ) (GraphPad Prism v.9.00).

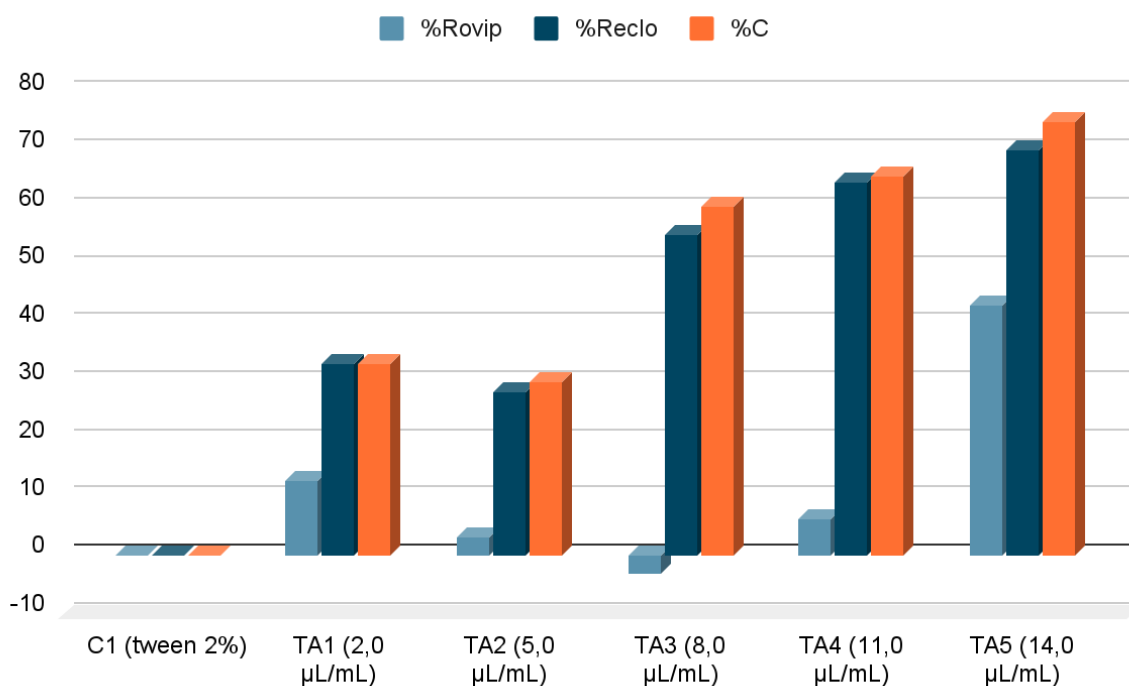
### 5. Resultados

Ao final dos primeiros sete dias de observação das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com  $\alpha$ -pineno foram contabilizadas, ao todo, apenas duas



Em relação ao desempenho reprodutivo das fêmeas expostas aos tratamentos com  $\alpha$ -pineno, foi possível verificar um efeito dose-dependente (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Porcentagens de redução da oviposição e eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) nos grupos tratados com concentrações subletais de  $\alpha$ -pineno em relação ao grupo controle (Tween 80 a 2% em água destilada).



**Fonte: Do autor, 2023.**

Conforme observado na Tabela 3, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos com relação à média do peso das fêmeas (PF) antes da oviposição. Quando considerado o peso da massa de ovos das fêmeas (PM), o grupo TA5 apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle e aos grupos TA2 e TA3, com massa de ovos significativamente menor.

**Tabela 3.** Peso médio das fêmeas antes da oviposição (PF), peso da massa de ovos (PM), índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE), taxa de fecundidade (TF), período pré-oviposição (PPO), período de incubação (PI), taxa de reprodução estimada (RE), porcentagem de redução da oviposição e da eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) em fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas tratadas com concentrações subletais de  $\alpha$ -pineno.

Parâmetros	Tratamentos ( $\alpha$ -pineno)					
	C1 (Tween 2%)	TA1 (2,0 $\mu$ L/mL)	TA2 (5,0 $\mu$ L/mL)	TA3 (8,0 $\mu$ L/mL)	TA4 (11,0 $\mu$ L/mL)	TA5 (14,0 $\mu$ L/mL)
PF (mg)	0,306 $\pm$ 0,02a	0,298 $\pm$ 0,01a	0,310 $\pm$ 0,02a	0,315 $\pm$ 0,03a	0,304 $\pm$ 0,02a	0,280 $\pm$ 0,01a
PM (mg)	0,118 $\pm$ 0,02a	0,103 $\pm$ 0,03ab	0,114 $\pm$ 0,03a	0,122 $\pm$ 0,02a	0,111 $\pm$ 0,01ab	0,067 $\pm$ 0,03b
IPO (%)	38,48 $\pm$ 7,10a,b,c	34,53 $\pm$ 13,63a,b,c	37,18 $\pm$ 12,55b	37,82 $\pm$ 5,20a,b,c	36,31 $\pm$ 4,47a,b,c	23,94 $\pm$ 11,48c
TE (%)	53,13 $\pm$ 18,31a	35,56 $\pm$ 24,93ab	38,13 $\pm$ 24,19ab	23,75 $\pm$ 8,76ab	18,89 $\pm$ 11,12b	16,00 $\pm$ 19,26b
TF (%)	20,61 $\pm$ 8,08a	13,80 $\pm$ 11,39ab	16,25 $\pm$ 11,21ab	9,24 $\pm$ 3,79ab	7,14 $\pm$ 4,50ab	5,20 $\pm$ 6,86b
PPO (dias)	4,50 $\pm$ 0,53a	4,56 $\pm$ 0,53a	5,13 $\pm$ 0,64ab	5,63 $\pm$ 0,52ab	6,33 $\pm$ 1,32b	7,30 $\pm$ 1,49b
PI (dias)	14,13 $\pm$ 1,73a	19,56 $\pm$ 0,73ab	19,63 $\pm$ 0,74ab	20,13 $\pm$ 0,83b	21,22 $\pm$ 0,67b	19,00 $\pm$ 1,58b
RE (%) (x10 <sup>3</sup> )	412,23 $\pm$ 16,9a	276,08 $\pm$ 22,2ab	288,84 $\pm$ 23,3ab	164,21 $\pm$ 93,0ab	142,88 $\pm$ 89,1ab	104,04 $\pm$ 13,8b
%Rovip*	0	12,62	2,97	-3,29	6,21	42,91
%Reclo*	0	33,07	28,24	55,29	64,44	69,88
%C*	0	33,03	29,93	60,17	65,34	74,76

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si (ANOVA one Way *post-hoc* Tukey ou Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn,  $p > 0,05$ )

\*Dados não comparados estatisticamente.

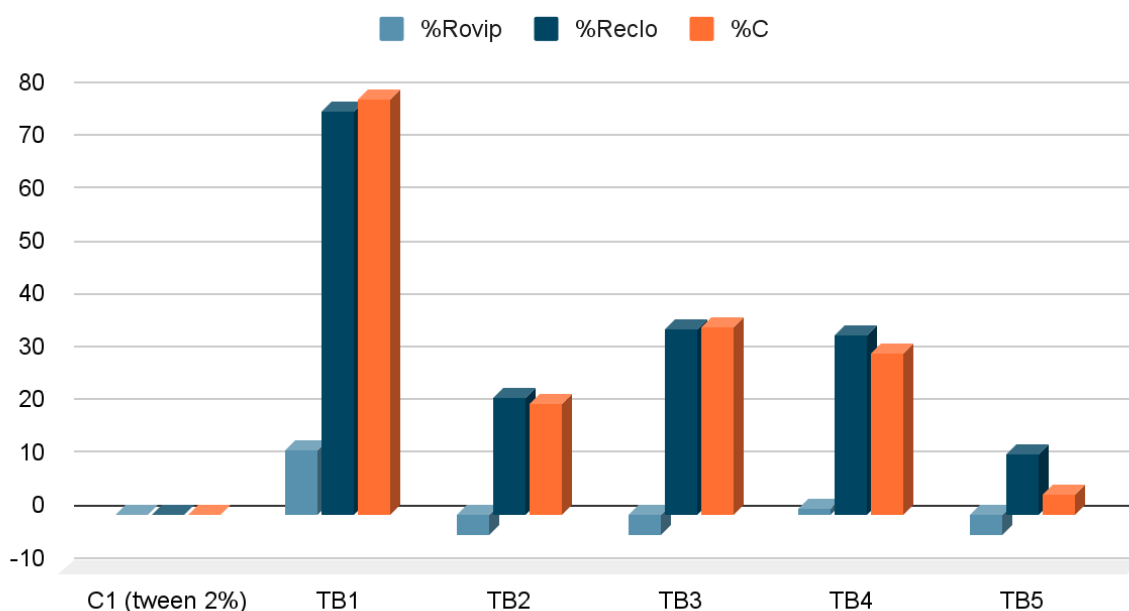
O índice de produção de ovos (IPO) diferiu estatisticamente entre os grupos TA2 e TA5, este último com valores estatisticamente menores; no entanto, não houve diferença entre os tratamentos e o grupo controle. Em relação a taxa de eclosão (TE), os grupos TA4 e TA5 demonstraram valores estatisticamente menores quando comparados ao grupo controle.

Nestes grupos, também houve aumento significativo no período de pré-oviposição (PPO), em comparação ao grupo controle e ao grupo TA1.

Nos grupos TA3, TA4 e TA5 foram observados períodos de incubação (PI) significativamente maiores em relação ao grupo controle. O grupo TA5 também demonstrou valores estatisticamente menores na taxa de fecundidade (TF) e na taxa de reprodução estimada (RE), em comparação ao grupo controle. Além disso, houve redução de 42,91% e de 69,88% na oviposição (%Rovip) e na eclosão (%Reclo) em fêmeas expostas à concentração mais elevada de  $\alpha$ -pineno (TA5), respectivamente. Os valores de porcentagem de controle ou eficácia do produto (%C), por sua vez, foram dose-dependentes, chegando a 74,76% no grupo TA5.

O tratamento com concentrações subletais de  $\beta$ -pineno, por sua vez, diferentemente do  $\alpha$ -pineno, não resultou em efeito dose-dependente no desempenho reprodutivo das fêmeas de *R. microplus*. Ao invés disso, foi possível observar que a menor concentração testada ocasionou efeito mais evidente nos parâmetros reprodutivos das fêmeas (Gráfico 2).

**Gráfico 2.** Porcentagens de redução da oviposição e eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) nos grupos tratados com concentrações subletais de  $\beta$ -pineno em relação ao grupo controle (Tween 80 a 2% em água destilada).



**Fonte: Do autor, 2023.**

Conforme observado na Tabela 4, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos com relação ao PF antes da oviposição. Também não houve alteração do PM e do IPO, em comparação ao grupo controle.

**Tabela 4.** Peso médio das fêmeas antes da oviposição (PF), peso da massa de ovos (PM), índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE), taxa de fecundidade (TF), período pré-oviposição (PPO), período de incubação (PI), taxa de reprodução estimada (RE), porcentagem de redução da oviposição e da eclosão (%Rovip e %Reclo) e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) em fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas tratadas com concentrações subletais de  $\beta$ -pineno.

Parâmetros	Tratamentos ( $\beta$ -pineno)					
	C1 (Tween 2%)	TB1 (2,0 $\mu$ L/mL)	TB2 (5,0 $\mu$ L/mL)	TB3 (8,0 $\mu$ L/mL)	TB4 (10,0 $\mu$ L/mL)	TB5 (11,0 $\mu$ L/mL)
PF (mg)	0,306 $\pm$ 0,02a	0,304 $\pm$ 0,02a	0,311 $\pm$ 0,02a	0,296 $\pm$ 0,01a	0,285 $\pm$ 0,01a	0,295 $\pm$ 0,01a
PM (mg)	0,118 $\pm$ 0,02a	0,103 $\pm$ 0,02a	0,122 $\pm$ 0,02a	0,122 $\pm$ 0,02a	0,116 $\pm$ 0,03a	0,122 $\pm$ 0,02a
IPO (%)	38,48 $\pm$ 7,10a	34,07 $\pm$ 8,28a	38,02 $\pm$ 8,11a	41,54 $\pm$ 10,18a	40,73 $\pm$ 12,44a	41,32 $\pm$ 6,31a
TE (%)	53,13 $\pm$ 18,31a	12,50 $\pm$ 5,89b	41,25 $\pm$ 9,91a	34,38 $\pm$ 15,45ab	35,00 $\pm$ 14,14ab	47,00 $\pm$ 15,67a
TF (%)	20,61 $\pm$ 8,08a	4,43 $\pm$ 2,62b	16,15 $\pm$ 5,85a	14,91 $\pm$ 7,16a	14,30 $\pm$ 8,92a	19,84 $\pm$ 8,36a
PPO (dias)	4,50 $\pm$ 0,53a	5,60 $\pm$ 0,97a	5,75 $\pm$ 1,04a	7,25 $\pm$ 1,67ab	7,44 $\pm$ 0,88ab	8,60 $\pm$ 0,84b
PI (dias)	14,13 $\pm$ 1,73a	19,50 $\pm$ 0,71a,b,c	19,25 $\pm$ 0,46a,b	20,13 $\pm$ 0,83b,c	21,56 $\pm$ 1,33c	21,10 $\pm$ 0,74c
RE (%) (x10 <sup>3</sup> )	412,23 $\pm$ 16,9a	88,59 $\pm$ 52,9b	325,90 $\pm$ 11,6a	265,13 $\pm$ 16,4ab	396,85 $\pm$ 17,0ab	285,98 $\pm$ 16,2a
%Rovip*	0	12,36	-3,82	-3,61	1,21	-3,67
%Reclo*	0	76,47	22,35	35,29	34,12	11,53
%C*	0	78,51	20,94	35,68	30,63	3,73

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si (ANOVA one Way *post-hoc* de Tukey ou Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn,  $p > 0,05$ )

\*Dados não estatisticamente analisados

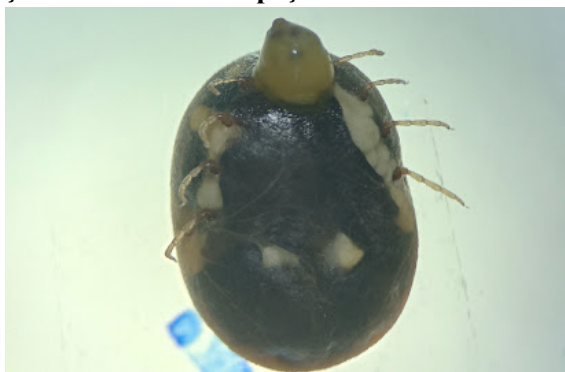
Já em relação à TE, é possível notar que o grupo TB1, quando comparado aos grupos TB2, TB5 e ao grupo controle, apresentou valores significativamente menores. Além disso, o PPO do grupo TB5 e o PI dos grupos TB3, TB4 e TB5 se mostraram estatisticamente maiores quando comparados ao grupo controle. O grupo TB5 também se mostrou estatisticamente diferente dos grupos TB1 e TB2 em relação ao PPO e do grupo TB2 em relação ao PI.

Ademais, os tratamentos TB2 e TB4 também se mostraram significativamente diferentes entre si com relação à incubação dos ovos.

A menor TF foi observada no grupo TB1, que diferiu significativamente de todos os outros grupos. A RE também foi menor neste grupo, mas apenas em relação ao grupo controle e aos grupos TB2 e TB5. As maiores porcentagens de redução de oviposição e eclosão também ocorreram no grupo TB1, respectivamente 12,36% e 76,47%. Isso se refletiu na %C, que chegou a 78,51% neste grupo, tratado com apenas 2,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de  $\beta$ -pineno.

Ainda, dois indivíduos do grupo TB2 apresentaram alterações na estrutura de sua peça bucal, fato não observado em nenhum outro indivíduo de nenhum dos outros tratamentos testados (Figura 12).

**Figura 12. Alterações observadas em peça bucal de fêmea tratada com  $\beta$ -pineno.**



**Fonte: Do autor, 2023.**

Por fim, a postura de algumas fêmeas em ambos os tratamentos, como o TA3, TA4, TB1 e TB2 apresentaram ovos com aspecto seco e não aderidos uns aos outros. Estes ovos não apresentaram eclosão (Figura 13).

**Figura 13. Ovos com aspecto seco e não aderidos uns aos outros sem taxa de eclosão.**



**Fonte: Do autor, 2023.**

## 6. Discussão

Mesmo em concentrações subletais, produtos extraídos de plantas têm demonstrado capacidade de alterar processos biológicos fundamentais relacionados à sobrevivência e reprodução dos carrapatos, de forma a afetar a próxima geração de indivíduos, resultando assim em uma forma alternativa de controle em longo prazo (KONIG et al., 2019; LIMA-SOUZA et al., 2019; CAMARGO-MATHIAS et al., 2017). No presente trabalho, os valores de eficácia obtidos para o  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, de 74,76% e 78,51% nas concentrações de 14,0 e 2,0  $\mu\text{L/mL}$ , respectivamente, comprovam este potencial. Pereira et al. (2023) testaram os óleos essenciais de *Egletes viscosa* e *Lippia schaueriana*, ricos em monoterpenos, incluindo  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e observaram eficácia de 92% após exposição à concentração de 50 mg/mL de *E. viscosa* e de 84% após tratamento com a mesma concentração de *L. schaueriana*. Assim, apesar da pequena diferença na eficácia destes óleos em comparação aos pinenos utilizados no presente trabalho, as concentrações utilizadas por Pereira et al. (2023) foram significativamente maiores.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo também foi possível notar que, apesar da baixa mortalidade observada nos tratamentos com ambos os produtos, a utilização de doses subletais provocou efeitos pronunciados no desempenho reprodutivo de carrapatos *Rhipicephalus microplus*. Entretanto, é importante ressaltar que a mortalidade foi avaliada por um período de sete dias neste estudo, assim como sugere o trabalho de Oliveira et al. (2008). Se o tempo de observação fosse estendido, como no experimento de Vinturelle et al. (2017), que relataram 80% de mortalidade de *R. microplus* expostos ao óleo essencial de *Piper nigrum*, rico em  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, 16 dias após o início do experimento, o número de carrapatos mortos seria possivelmente maior. Contudo, o resultado poderia ser comprometido pela dificuldade em se interpretar mortes ocorridas naturalmente e mortes causadas pelos produtos utilizados nos tratamentos.

A exposição ao  $\alpha$ -pineno ocasionou efeitos dose-dependentes, conforme comprovado pelos valores de eficácia do produto. Desta forma, quanto maior a concentração utilizada, maior a eficácia obtida, fato corroborado por grande parte dos estudos com produtos naturais (LAGE et al., 2013; FERNANDES et al., 2018; GONÇALVES et al., 2019; PEREIRA-JUNIOR et al., 2019; MATOS et al., 2020; LUNGUINHO et al., 2021). Enquanto isso, no presente estudo, a eficácia do  $\beta$ -pineno foi mais expressiva em concentrações menores do composto, o que demonstra diferentes modos de ação mesmo em compostos com estrutura química semelhante.



Nos grupos tratados com  $\alpha$ -pineno, foi possível observar a presença de animais ressecados e com a cutícula enegrecida conforme se elevaram as concentrações utilizadas do produto. Já no tratamento com  $\beta$ -pineno, essas características foram visualizadas principalmente no grupo exposto à menor concentração. Além disso, dois indivíduos do grupo TB2 apresentaram gotículas de secreção em sua peça bucal. Ademais, algumas fêmeas em ambos os tratamentos realizaram a postura ovos com aspecto seco e não aderidos uns aos outros, e não houve eclosão de larvas a partir destes ovos. Pereira et al. (2023) também identificaram ovos com aspecto desidratado e não agregados em carrapatos *R. sanguineus* tratados em 50 mg/mL do óleo essencial de *E. viscosa*, tendo atribuído estes efeitos aos compostos presentes no produto. Os efeitos aqui observados comprovam que houve absorção de ambos os pinenos pelos carrapatos tratados e podem indicar, inclusive, a ocorrência de alterações em seus órgãos internos, como o ovário e o órgão de Gené, importantes na reprodução das fêmeas (MATOS et al., 2020). O órgão de Gené é exclusivo das fêmeas e é composto por três tipos de glândulas, todas com função de produzir secreções compostas por cera e secreções lipídicas que impermeabilizam os ovos e atuam como barreira contra dessecação, predadores e patógenos, além de manter os ovos agregados (BOOTH, 1984; KAKUDA et al., 1992). Matos et al. (2020) também relataram o aparecimento de ovos não aderidos na postura de fêmeas de *R. sanguineus* expostas ao timol, sugerindo que esse composto interfere na liberação, síntese e oxidação da cera produzida pelo órgão Gené.

Nos indivíduos dos grupos tratados com as maiores concentrações de  $\alpha$ -pineno, TA4 e TA5, foram observados períodos de pré-oviposição (PPO) significativamente maiores em relação ao grupo controle e ao grupo TA1, de menor concentração. Nestes grupos, foram necessários, em média, 6,3 e 7,3 dias, respectivamente, para o início da postura dos ovos, enquanto o grupo controle apresentou média estatisticamente menor, de apenas 4,5 dias. Após o tratamento de carrapatos *R. microplus* com concentrações subletais de carvacrol, Pereira Júnior et al. (2019) sugeriram que o aumento no PPO pode estar relacionado aos prejuízos na oviposição. Isso corrobora os resultados do presente estudo, uma vez que também foram observados valores reduzidos do peso médio da massa de ovos e da taxa de fecundidade, principalmente no grupo TA5. Além disso, a taxa de redução de oviposição do grupo TA5 (42,91%) foi aproximadamente três vezes maior que a redução de oviposição apresentada pelo grupo TA1 (12,62%) e semelhante à redução da oviposição de 38,8% relatada por de Pereira et al. (2023) em *R. sanguineus* tratados com 25 mg/mL do óleo essencial de *E. viscosa*.

Em relação ao período de incubação (PI), os grupos TA3, TA4 e TA5 apresentaram valores estatisticamente diferentes do grupo controle. Isso sugere que as concentrações usadas

nos tratamentos com  $\alpha$ -pineno afetaram diretamente o tempo necessário para o surgimento de novos indivíduos, prejudicando a formação das larvas. Pereira-Junior et al. (2019) também encontraram aumento no PI de fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas tratadas com carvacrol a 80% e 100% da concentração letal média (20,11 mg/mL) e sugeriram que este atraso se deu graças ao comprometimento causado pelo produto na formação dos ovos, resultando em alteração no peso da massa de ovos e no número de larvas.

Não houve diferença estatística no índice de produção de ovos em relação ao grupo controle nos carrapatos expostos ao  $\alpha$ -pineno, mesmo que tenha sido detectada redução da oviposição. Assim, sugere-se que o peso da massa de ovos exerceu pouca influência no aumento da eficácia. Entretanto, a taxa de eclosão, que foi menor nos tratamentos e resultou em uma reprodução estimada também menor, pode ser considerada o fator responsável pela elevada eficácia identificada no tratamento com  $\alpha$ -pineno, sugerindo que o desenvolvimento dos gametas foi afetado por este isômero. De forma semelhante, Castro et al. (2016) e Parveen et al. (2014) relataram taxas de eclosão reduzidas em *R. microplus* expostos a óleos essenciais de *Pilocarpus microphyllus* e *Artemisia absinthium*, respectivamente, ricos em monoterpenos como o carvacrol. Por sua vez, Torres-Santos et al. (2021) avaliaram a eficácia de diferentes compostos químicos comerciais e observaram que o produto a base de amitraz resultou em taxa de eclosão de 35,1%, duas vezes maior que a taxa de eclosão encontrada em TA5 deste trabalho.

No tratamento com  $\beta$ -pineno, a menor concentração resultou em maior eficácia e maiores prejuízos na reprodução, quando comparada às maiores concentrações aqui utilizadas. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao peso da massa de ovos e ao índice de produção de ovos, evidenciando que as fêmeas também não produziram quantidade menor de ovos na postura, da mesma forma que no tratamento com  $\alpha$ -pineno. Apesar disso, foi possível observar redução nas taxas de eclosão, fecundidade e na reprodução estimada entre o grupo TB1 e o controle. É interessante notar que, mesmo assim, não foram identificadas diferenças estatísticas no PPO e PI entre estes grupos. Ao contrário, as diferenças nestes parâmetros, em relação aos controles, foram observadas apenas nos grupos tratados com as concentrações maiores. Assim, não é possível afirmar, neste caso, que o aumento no tempo para a oviposição e para o início da eclosão tenha relação com alterações na taxa de eclosão e de fecundidade dos animais. De qualquer forma, os parâmetros reprodutivos do grupo TB1 indicam que também houve prejuízo no desenvolvimento dos oócitos das fêmeas, assim como observado no tratamento com  $\alpha$ -pineno. Alterações morfológicas também já foram relatadas para outros monoterpenos, como os isômeros

carvacrol e timol, em fêmeas de carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus* (KONIG et al., 2019; LIMA-SOUZA et al., 2019; KONIG et al., 2020; SILVA et al., 2023).

No presente trabalho, a taxa de eclosão no grupo TB1 (2,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) foi de apenas 12,5%, significativamente menor em comparação aos tratamentos TB2 e TB5 e ao grupo controle e semelhante ao grupo tratado com a maior concentração de  $\alpha$ -pineno (14  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Em um estudo semelhante, Monteiro et al. (2010), relataram taxa de eclosão de 11,33% de larvas de *R. microplus* expostas ao timol a 2%, sugerindo resultados similares entre os monoterpenos timol e  $\beta$ -pineno. Em testes com acaricidas comerciais a base de cipermetrina, Torres-Santos et al. (2021), encontraram taxa de eclosão de 12,67% em carrapatos *R. microplus*, resultado semelhante a trabalhos que utilizaram produtos naturais, como Monteiro et al. (2010) e o presente estudo.

Choi et al. (2006), relataram que monoterpenos bicíclicos, como o  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, são mais tóxicos para invertebrados que os monoterpenos acíclicos. A toxicidade dos monoterpenos pode estar relacionada ao sistema nervoso octopaminérgico dos animais, à capacidade de inibir as monooxigenases dependentes do citocromo P450 e até mesmo a interação que exercem com receptores de acetilcolinesterase (AChE) (ENAN et al., 2001; LEE et al., 2001). Além disso, vários monoterpenos têm sido relatados ligando-se a receptores GABA localizados na membrana neuronal pós-sináptica de insetos (PAJARO-CASTRO et al., 2017). Estes compostos são capazes de penetrar rapidamente nas células, já que são lipofílicos, e interferem nas funções fisiológicas dos animais, interagindo com o funcionamento dos receptores GABA ou alterando a atividade de canais iônicos controlados por voltagem e/ou controlados por ligantes no sistema nervoso central, o que prejudica a atividade de enzimas neuronais como a AChE (PAJARO-CASTRO et al., 2017).

Considerando-se os efeitos reprodutivos observados em *R. microplus* no presente trabalho, pode-se assumir que  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno tenham sido responsáveis pela ocorrência de efeitos tóxicos no ovário desses parasitos. A toxicidade de outros monoterpenos nos ovócitos de fêmeas ingurgitadas e semi-ingurgitadas também foi relatada por diversos outros autores (REMEDIO et al., 2014; RAMÍREZ et al., 2016; KONIG et al., 2019, 2020; SILVA et al., 2023). Neste sentido, novos estudos podem ser conduzidos, de forma a avaliar a ação citotóxica destes produtos no ovário ou até mesmo em outros órgãos internos de fêmeas de *R. microplus*.

## 7. Considerações finais

O carrapato-do-boi é responsável por grandes prejuízos econômicos na agropecuária brasileira. Além disso, há registros de resistência de *R. microplus* a praticamente todos os acaricidas químicos disponíveis no mercado. Visto isso, é reconhecida a necessidade de buscar novas alternativas para o controle desses parasitos que estejam alinhadas com o conceito de One Health, preservando a saúde humana, a saúde animal e a integridade do meio ambiente. A utilização de extratos de plantas no controle de carrapatos, principalmente *R. microplus*, parece ser uma alternativa viável, visto o enorme número de plantas com atividade contra esse carrapato já encontradas. O interesse em compostos naturais derivados de plantas para desenvolver medicamentos para a indústria veterinária usando metodologias mais recentes pode render novos repelentes e acaricidas. Repelentes de carrapatos ou acaricidas com mecanismos de ação direcionados a vias metabólicas previamente inexploradas podem ser desenvolvidos para superar os problemas relacionados à resistência. Os produtos aqui testados,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, já apresentaram potencial para controle de diversos invertebrados. Apesar disto, até onde se sabe, este é o primeiro trabalho sobre os efeitos acaricidas de  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno em carrapatos-do-boi. No presente trabalho,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, apresentaram potencial para se tornarem possíveis alternativas de controle para o carrapato-do-boi. Trabalhos com avaliações histológicas dos ovários das fêmeas expostas aos produtos são importantes para dar continuidade aos resultados obtidos neste trabalho, a fim de fornecer outras informações sobre o comprometimento desses órgãos e da reprodução dos indivíduos. Contudo, embora o  $\alpha$  e o  $\beta$ -pineno sejam produtos promissores, as características físico-químicas desses compostos representam desafios que requerem esforços para testes de aplicação efetiva em campo como a biotransformação, sua instabilidade química, volatilidade e possível toxicidade para algumas células microbianas. Apesar dessas adversidades,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno demonstraram interferir na reprodução de *R. microplus* e este estudo poderá contribuir para futuras pesquisas e formulações acaricidas.

## 8. Agradecimentos

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Universidade Federal de Lavras por fornecer os recursos necessários para a realização deste trabalho.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.
- ABBAS, R. Z. et al. Acaricidal and insecticidal effects of essential oils against ectoparasites of veterinary importance. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 17, p. 441-452, 2018.
- ADENUBI, O. T. et al. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 178–193, 2016.
- ADENUBI, O. T. et al. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops & Products**, 2018.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour Fragr J**, v. 25, p. 407 - 426, 2010.
- ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Bol. Latinoam. Caribe Plantas Méd Aromat.** v. 2, p. 3-6, 2003.
- ALVAREZ-CASTELLENOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of *Garland chrysanthemum* (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, v. 57, p. 99–102, 2001.
- ALVES, W. V; LORENZETTI, E. R; GONÇALVES, F. C. Use of plants acaricides in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control: a contribution to production and sustainable development. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 2., p. 14-25, 2012.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. **Rich. Biochem Syst Ecol**, v. 39, p. 669 - 675, 2011.
- APARÍCIO-ZAMBRANO, R. et al. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). **Revista peruana de biología**, v. 26, p. 95-100, 2019.
- APEL, M. A. et al. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitol Res**, v. 105, p. 863-868, 2009.
- BAJPAI, V. K. et al. Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. **Food Chem**, v. 105, p. 1061–1066, 2007.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 446–75, 2008.

- BANUMATHI, B. et al. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*- A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 102-110, 2017.
- BENELLI, G. R.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, n. December 2017, p. 47–54, 2018.
- BERGER, R. G. Biotechnology of flavours—the next generation. **Biotechnol Lett**, v. 31, p. 1651–1659, 2007.
- BOOTH, I. F.; BEADLE, D. J.; RICHARD, J. H. Ultrastructure of the accessory glands of Gené's organ in the cattle tick, *Boophilus*. **Tissue Cel.**, v. 16, p. 589-599, 1984.
- BORGES, L. M. F.; DIAS DE SOUZA, L. A.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 89-96, abr.-jun. 2011.
- BURGESS, I. F. The mode of action of dimeticone 4% lotion against head lice, *Pediculuscapitis*. **BMC Pharmacol**, v. 9, p. 1 - 8, 2009.
- CALVANO, M. P. C. A. et al. Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. **Experimental and Applied Acarology**, v. 79, p. 459-471, 2019.
- CÂMARA, C. C. Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the Guinea-Pig ileum. **Planta Med**, v. 69, p. 1080-1085, 2003.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. et al. Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 72, n. 2, p. 161–169, 2017.
- CARDOSO, M. G. et al. Óleos Essenciais. **Boletim Técnico – Extensão**. 8(58): 1-42, 2000.
- CASTILHOS, R. V.; GRUTZMACHER, A. D.; COATS, J. R. Acute toxicity and sublethal effects of terpenoids and essential oils on the predator *Chrysoperla externa* (Neuroptera: chrysopidae). **Neotrop. Entomol.** v. 47, p. 311–317, 2018.
- CASTREJON, F. M. et al. Repellence of *Boophilus microplus* larvae in *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* plants. **Parasitol Latinoam**, v. 58, p. 118-121, 2003.
- CASTRO, K. N. C. et al. In vitro effects of *Pilocarpus microphyllus* extracts and pilocarpine hydrochloride on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Parasitol.**, v.25, n. 02, 2016.
- CASTRO-JANER, E. et al. In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 120–128, 2009.

CHEM SINO. Monooleato de polioxietileno sorbitan T80 Polissorbato 80 Líquido Cas 9005-65-6. 2023. Disponível em: <[https://www.cnadditives.com/emulsifier/polyoxyethylene-sorbitan-monooleate-t80.html?{campaign}=Dny&&adgroupid=152158680411&keyword=tween%2080%20emulsifier&device=c&gclid=Cj0KCQjwmtGjBhDhARIsAEqfDEfdcSpB94aU4III3boOln4wYMxxQ4gmK1sACHW8y5mJEdDbwY14tE8aAk1QEALw\\_wcB](https://www.cnadditives.com/emulsifier/polyoxyethylene-sorbitan-monooleate-t80.html?{campaign}=Dny&&adgroupid=152158680411&keyword=tween%2080%20emulsifier&device=c&gclid=Cj0KCQjwmtGjBhDhARIsAEqfDEfdcSpB94aU4III3boOln4wYMxxQ4gmK1sACHW8y5mJEdDbwY14tE8aAk1QEALw_wcB)> Acesso em: 29 de maio de 2023.

CHOI et al. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. **Crop Protection**, v. 25, p. 398–401, 2006.

CHOWHAN, N. et al.  $\beta$ -Pinene inhibited germination and early growth involves membrane peroxidation. **Protoplasma**, v. 250, p. 691-700, 2013.

COELHO-DE-SOUZA, L. N. Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its Main Constituent 1,8-cineole on Guinea-Pig tracheal smooth muscle. **Planta Med**, v. 71, p. 1173-1175, 2005.

COLWELL, D. D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 14–21, 2011.

CRUZ, E. M. O. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198–202, 2013.

DANTAS-TORRES, F; BATTESTI, D. M. B; ONOFRIO, V. C. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology Society**, v.14, p.30-46, 2009.

DE MENEGHI, D.; STACHURSKI, F.; ADAKAL, H. Experiences in Tick Control by Acaricide in the Traditional Cattle Sector in Zambia and Burkina Faso: Possible Environmental and Public Health Implications. **Frontiers in Public Health**, v. 4, p. 239, 2016.

DE OLIVEIRA, M. V. S. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 82, p. 265-279, 2020.

DE OLIVEIRA, P. R. et. al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella Oleraceae* (Jambu) in *Rhipicephalus Microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, 2016.

DE SOUZA, N. R. D. et al. Sugarcane ethanol and beef cattle integration in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, n. p. 448–457, 2019.

DIAS, C. N. et al. Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brasil. **Chem Biodivers**, v. 10, p. 1133–1141, 2013.

DRUMMOND, R. O. et al., *Boophilus annulatus*/ and *B. microplus*/ Laboratory Tests of Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

**Empresa brasileira de pesquisa brasileira (EMBRAPA)**, 2021. Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/12477887/como-diminuir-os-prejuizos-com-o-carrapato-do-boi#:~:text=oficina%20na%20Tecnofam.,O%20carrapato%2Ddo%2Dboi%2C%20Rhipicephalus%20\(Boophilus\)%20microplus,de%20animais%2C%20informa%20o%20pesquisador](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/12477887/como-diminuir-os-prejuizos-com-o-carrapato-do-boi#:~:text=oficina%20na%20Tecnofam.,O%20carrapato%2Ddo%2Dboi%2C%20Rhipicephalus%20(Boophilus)%20microplus,de%20animais%2C%20informa%20o%20pesquisador). Acesso em: 21 de junho de 2023.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 325–337. 2001.

FERNANDEZ, C. M. M. et al. Essential oil and fractions isolated of Laurel to control adults and larvae of cattle ticks. *Natural Product Research*, 2018.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; ALONSO-DÍAZ, M. A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, v. 183, p. 338–342, 2012.

FERREIRA, F. M. et al. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2017.

FIGUEIREDO, A. et al. First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 2018.

GAZIM, C. Z. et al. Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari; Ixodidae). *Experimental Parasitology*, v. 129, p. 175–178, 2017.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; DE LA FUENTE, J. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control—a review. *Exp Appl Acarol*, v. 40, p. 49–66, 2006.

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

GROMBONI, C. F. et al. Evaluation of the photo-fenton reaction in the decomposition of tick residues. *Química nova*, v. 30, p. 264-267, 2007.

GROSS, A.D. et al. Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target. *Chemico-Biological Interactions*, 2017.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L. et al. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of  $\beta$ -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143(2), p. 673-679, 2012.

HIGA, L. O. S. et al. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. *Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal*, v. 25, n. 2, p. 163-171, abr.-jun. 2016.



**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3–14, 2005.

KAKUDA, H.; MORI, T. S.; SHIRAIISHI, S. Functional morphology of Gerson's organ in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Exp. Appl. Acarol.**, v. 16, p. 263-275, 1992.

KERWIN, BRUCE A. Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2924-2935, 2008.

KIM, D. et al. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity through the Suppression of MAPKs and NF- $\kappa$ B Pathway in Mouse. **Peritoneal Macrophages The American Journal of Chinese Medicine**, v.43, n.4, p.731-742, 2015.

KONG, J. O. et al. Nematicidal and Propagation Activities of Thyme Red and White Oil Compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). **J. Nematol**, v. 39, p. 237-242, 2007.

KONIG, I. F. M. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 766-774, 2019.

KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, 2020.

KOSTYUKOVSKY, M., et al. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. **Pest management science**. 58. 1101-6. 10.1002/ps.548, 2002.

LAGE, T. C. A. et al. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, v. 112, p. 863–869, 2013.

LEE, B. H. et al. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). **Crop Protection**, v. 20, p. 317–320, 2001.

LETIZIA, C. S.; COCCHIARA, J.; LALKO, J. Api AM. Fragrance material review on linalool. **Food & Chem Toxicol**, v. 4, p. 943–964, 2003.

LEUNER, C., DRESMANN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 50, p. 47–60, 2000.

LI, D. et al. Synergistic effect of non-ionic surfactants Tween 80 and PEG6000 on cytotoxicity of insecticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 677-682, 2015.

LI, Y. et al. Comparative Transcriptome Analysis of the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Reveals the Molecular Mechanism Underlying Its Defense Response to Host-Derived  $\alpha$ -pinene. **Int. J. Mol. Sci.** 2019.

LI, Y. et al. Adaptation of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* to  $\beta$ -pinene stress. **BMC Genomics**, v. 21, 2020.

LIMA-SOUZA, J. R. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66-72, 2019.

LOPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Ind Crops Prod**, v. 31 p. 284 - 288, 2010.

LUNGUINHO, A. S. et al. Acaricidal and repellent activity of the essential oils of *Backhousia citriodora*, *Callistemon viminalis* and *Cinnamodendron dinisii* against *Rhipicephalus* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 300, p. 109-594, 2021.

MACCHIONI, F. et al. Composition and Acaricidal Activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* Essential Oils Against *Psoroptes cuniculi*. **J. Essent. Oil Res.**, v. 10, p. 111-114, 2006.

MANS B. J. et al. *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. **PLoS ONE** 6(8): e23675, 2011.

MAPRIC GREENTECH GROUP. Tween 80. 2023. Disponível em: <<http://sistema.boticamagistral.com.br/app/webroot/img/files/Tween%2080.pdf>> Acesso em: 29 de maio de 2023.

MATOS, R. S. et al. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, 2014.

MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne diseases**, v. 11, n. 1, 2020.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. **J. Phar. Pharmacol.** v. 62(2), p. 215–221, 2010.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules** [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2014 Sep 25];15(12):9252–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160452>.

MONTEIRO, C. M. O. et al. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 106, p. 615-619, 2010.

NA, Y. E. et al. Fumigant toxicity of cassia and cinnamon oils and cinnamaldehyde and structurally related compounds to *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). **Vet Parasitol**, v. 178, p. 324 - 329, 2011.

NAM, S. et al. The therapeutic efficacy of  $\alpha$ -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. **International Immunopharmacology**, v.23, p.273-282, 2014.

NCUBE, B.; VAN STADEN, J. Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit. **Molecules** [Internet], 2015.

OLIVEIRA, L. E. M. Temas em fisiologia vegetal/Terpenos. **Setor de fisiologia vegetal do departamento de biologia na Universidade Federal de Lavras**, 2015.

OLIVEIRA, P.R., BECHARA, G. H., CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2459-2465, 2008.

PAJARO-CASTRO, N.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. Neurotoxic Effects of Linalool and  $\beta$ -Pinene on *Tribolium castaneum* Herbst. **Molecules**, 2017.

PALERMO, D. et al. Essential Oil-Based Nano-Biopesticides: Formulation and Bioactivity against the Confused Flour Beetle *Tribolium confusum*. **Sustainable Defense Strategies for Pest Management**, v. 13, 2021.

PARVEEN, S. et al. In Vitro Evaluation of Ethanolic Extracts of *Ageratum conyzoides* and *Artemisia absinthium* against Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*. **The Scientific World Journal**, 2014.

PASCOETI, P. et al. Parasites in dairy cattle farms in southern Brazil. **Revista MVZ Cordoba**, v. 21, p. 5304-5315, 2016.

PAZINATO, R. et al. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Exp Appl Acarol**, v. 63, p. 77–83, 2014.

PEREIRA, M. C. et al. Efficacy of essential oils of *Egletes viscosa* and *Lippia schaueriana* on the reproductive biology of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 244, 2023.

PEREIRA-JUNIOR, A. M. et al. Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction. **Natural Product Research**, 2019.

PÉREZ DE LÉON, A.A.; MITCHELL, R. D.; WATSON, D. W. Ectoparasites of cattle. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 36, p. 173-185, 2020.

RAJESWARA RAO, B. R.; RAJPUT, D. K.; MALLAVARAPU, G. R. Chemical diversity in curry leaf (*Murraya koenigii*) essential oils. **Food Chem**, v. 126, p. 989–994, 2011.

RAMÍREZ, C. et al. Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, n. 2, p. 72–77, 2016.

REMEDIÓ, R. N. et al. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431–444, 2014.

RIVAS, A. C. S. et al. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. **Molecules**, v. 17 (6), p. 6305-6316, 2012.

RODRIGUES, K. A. F. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. **J Ethnopharmacol**, v. 160, p. 32–40, 2015.

RODRIGUEZ-VIVAZ, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitol Res**, v. 117, p. 3–29, 2018.

ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3–4, p. 299–303, 2010.

SALEHI, B. et al. Therapeutic Potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Pinene: A Miracle Gift of Nature. **Biomolecules**, v. 9, n. 738, 2019. doi:10.3390/biom9110738.

SILVA, A. C. R.; LOPES, P. M.; AZEVEDO, M. M. B.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305-6316, 2012.

SILVA, I. S. et al. Thymol and eugenol against *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females: Biological, histopathological and bioinformatic analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 319, 2023.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. Overview: Ticks, People and Animals. **M. Biology of ticks**. 2 ed. United States of America: Oxford University Press, p. 3-17, 2014.

TABARI, M. A. et al. Acaricidal properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil against *Dermanyssus gallinae* and *Hyalomma dromedarii*. **Ind. Crops Prod**. 147, 112238, 2020.

TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived terpenes and the effect of binary mixtures against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 786–792, 2018.

THOLL, D. et al. Practical approaches to plant volatile analysis. **Techniques for molecular analysis**, v. 45, p. 540-560, 2006.

TORRES-SANTOS, P. T. et al. avaliação in vitro da resistência do carrapato *Rhipicephalus microplus* a diferentes carrapaticidas. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v. 28, 2021.

TURJEZ, H.; AYDIN, E. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of  $\alpha$ -pinene. **Toxicol Ind Health**, p. 1-9, 2013.

VESPERMANN, K. A. C. et al. Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 110, p. 1805-1817, 2017.

VINTURELLE et al., 2017: Evaluation of Essential Oils Derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the Tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Biochemistry Research International**, 2017.