



**JENIFER CAROLINE SILVA RIBEIRO**

**EFEITOS DOS ISÔMEROS  $\alpha$ -PINENO E  
 $\beta$ -PINENO NA MORFOFISIOLOGIA DOS OÓCITOS  
DE FÊMEAS SEMI-INGURGITADAS DE CARRAPATOS  
*RHIPICEPHALUS MICROPLUS* (ACARI: IXODIDAE)**

**LAVRAS – MG**

**2024**

**JENIFER CAROLINE SILVA RIBEIRO**

**EFEITOS DOS ISÔMEROS  $\alpha$ -PINENO E  $\beta$ -PINENO NA MORFOFISIOLOGIA DOS  
OÓCITOS DE FÊMEAS SEMI-INGURGITADAS DE CARRAPATOS  
*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  
2024**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Ribeiro, Jenifer Caroline Silva.

Efeitos dos isômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno na morfofisiologia dos oócitos de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) / Jenifer Caroline Silva Ribeiro. - 2024.  
59 p. : il.

Orientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Controle de carrapatos. 2. Compostos isolados. 3. Morfologia do ovário. I. Remedio, Rafael Neodini. II. Título.

**JENIFER CAROLINE SILVA RIBEIRO**

**EFFECTS OF  $\alpha$ -PINENE AND  $\beta$ -PINENE ISOMERS ON THE  
MORPHOPHYSIOLOGY OF OOCYTES OF RHIPICEPHALUS MICROPLUS  
SEMI-ENGORGED FEMALE TICKS (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 29 de janeiro de 2024  
Dr. Rafael Neodini Remedio DME/FCS-UFLA  
Dra. Ana Paula Peconick DMV/FMVZ-UFLA  
Dr. Pablo Henrique Nunes UNILA

Profº. Dr. Rafael Neodini Remedio  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2024**

*Dedico à minha família*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por estar sempre presente em minha vida, me fortalecendo a cada dia e por ter me proporcionando mais uma conquista.

À minha família por sempre estar ao meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões.

À minha avó Ernestina, que sempre esteve disposta a cuidar de mim e mesmo não estando presente neste momento, tenho certeza que lá do céu está intercedendo por mim.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (em especial a secretária do PPGCV, Dona Fátima que sempre esteve disposta a fornecer esclarecimentos sobre as normas do programa) e ao Departamento de Medicina, por fornecer o espaço e as condições para que os experimentos pudessem acontecer.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado durante os dois anos e dois meses e a FAPEMIG pela concessão durante a prorrogação do prazo de defesa.

Ao meu orientador Rafael Neodini Remedio, pelos conhecimentos passados, dedicação e paciência durante a minha caminhada desde a Iniciação Científica nos últimos semestres da graduação e até ao presente momento.

À professora Graça por ceder os princípios ativos utilizados neste trabalho.

Aos meus amigos Maria Cristina, Maria Fernanda, Giovanna, Silvio e Rafael por todo apoio, companheirismo e amizade durante este período e em outros momentos da minha vida.

Aos membros da banca, prof. Ana Paula Peconick e prof. Pablo Henrique Nunes, por terem aceitado de bom grado o convite proposto.

Às amigas de mestrado que a UFLA me proporcionou a oportunidade de conhecer e conviver durante esses anos, agradeço por todo companheirismo, apoio, ajuda e amizade, sem elas este trabalho não teria sido finalizado.

À técnica de laboratório nota mil da UFLA, Aline, que esteve presente em todas as etapas, sempre auxiliando com muito carinho e dedicação.

Enfim, só tenho de agradecer a todos que contribuíram não só apenas para a conclusão deste trabalho, mas também para meu crescimento pessoal e profissional!

*“A humildade é o começo das boas ações como o botão é o começo da flor”  
(Santo Antônio).*

## RESUMO

Os pinenos são monoterpenos bicíclicos que contêm dois isômeros constitucionais,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno. Ambos, possuem diversas atividades biológicas, como ação fungicida, inseticida, antimicrobiana, antibacteriana, e entre outras. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de concentrações subletais dos princípios ativos  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, diluídos em Tween 80 a 2%, na morfologia do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*. Para isso, os carrapatos foram imersos em diferentes concentrações de cada produto durante cinco minutos. Após sete dias, os animais foram dissecados para a coleta dos ovários. O material foi processado e incluído em historesina, seccionado, corado e analisado por meio de análise histopatológica e semiquantitativa. As alterações morfológicas observadas nos oócitos de indivíduos tratados com ambos os compostos foram: vacuolização citoplasmática, formato irregular dos oócitos, nucléolo vacuolizado (nucléolo em forma de anel), fusão de grânulos, lâmina basal irregular, acúmulos basofílicos, desorganização citoplasmática, córion irregular, bem como, espesso e fragmentado. A análise semiquantitativa mostrou diferenças significativas entre o grupo controle água destilada e os grupos tratados com as maiores concentrações de  $\alpha$ -pineno e as menores de  $\beta$ -pineno. Logo, os resultados apontam o potencial de  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno como possíveis compostos a seres utilizados nas futuras formulações acaricidas.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos. Controle alternativo. Morfologia. Histologia. Monoterpenos.

## ABSTRACT

Pinenes are bicyclic monoterpenes that contain two constitutional isomers,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene. Both have diverse biological activities, such as fungicidal, insecticidal, antimicrobial and antibacterial action, among others. Thus, the objective of this research was to evaluate the effect of sublethal concentrations of the active ingredients  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, diluted in 2% Tween 80, on the morphology of the ovary of semi-engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks. To do this, the ticks were immersed in different concentrations of each product for five minutes. After seven days, the animals were dissected to collect the ovaries. The material was processed and included in historesin, sectioned, stained and analyzed using histopathological and semiquantitative analysis. The morphological changes observed in the oocytes of individuals treated with both compounds were: cytoplasmic vacuolization, irregular shape of the oocytes, vacuolated nucleolus (ring-shaped nucleolus), fusion of granules, irregular basal lamina, basophilic accumulations, cytoplasmic disorganization, and irregular, thick and fragmented chorion. The semi-quantitative analysis showed significant differences between the distilled water control group and the groups treated with the highest concentrations of  $\alpha$ -pinene and the lowest of  $\beta$ -pinene. Therefore, the results point to the potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene as possible compounds to be used in future acaricide formulations.

Keywords: Cattle tick. Alternative control. Morphology. Histology. Monoterpenes.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura do ovário de <i>Rhipicephalus microplus</i> . . . . .   | 17 |
| <b>Figura 2.</b> Fórmulas estruturais dos enantiômeros $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno.....   | 22 |
| <b>Figura 3.</b> Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas aos grupos controle, coradas com hematoxilina-eosina....  | 38 |
| <b>Figura 4.</b> Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas a diferentes concentrações de $\alpha$ -pineno, coradas com hematoxilina-eosina.....  | 39 |
| <b>Figura 5.</b> Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas a diferentes concentrações de $\beta$ -pineno, coradas com hematoxilina-eosina. ....  | 40 |
| <b>Figura 6.</b> Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas a diferentes concentrações de $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno, coradas com azul de bromofenol. ....                      | 41 |
| <b>Figura 7.</b> Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas a diferentes concentrações de $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno, coradas pela técnica de ácido periódico-Schiff (PAS)..... | 42 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Média $\pm$ desvio padrão do peso corporal das fêmeas semi-ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e a mortalidade (%) sete dias após o Teste de Imersão em Adultos. ....   | 34 |
| <b>Tabela 2.</b> Média $\pm$ desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) observados nos oócitos de fêmeas semi-ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao composto $\alpha$ -pineno em diferentes concentrações..... | 34 |
| <b>Tabela 3.</b> Média $\pm$ desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao composto $\alpha$ -pineno em diferentes concentrações.....                 | 35 |
| <b>Tabela 4.</b> Média $\pm$ desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) observados nos oócitos de fêmeas semi-ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao composto $\beta$ -pineno em diferentes concentrações.....  | 36 |
| <b>Tabela 5.</b> Média $\pm$ desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao composto $\beta$ -pineno em diferentes concentrações.....                  | 36 |

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Média  $\pm$  desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\alpha$ -pineno em diferentes concentrações..... 35

**Gráfico 2.** Média  $\pm$  desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\beta$ -pineno em diferentes concentrações..... 37

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 13 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO .....   | 15 |
| <b>2.1. Carrapatos</b> .....   | 15 |
| <b>2.1.2. <i>Rhipicephalus microplus</i></b> .....   | 15 |
| <b>2.2. Métodos de controle</b> .....  | 18 |
| <b>2.2.1 Acaricidas sintéticos</b> .....   | 18 |
| <b>2.2.2. Controle à base de produtos vegetais</b> .....   | 19 |
| <b>2.2.3. Alfa-pineno e Beta-pineno (<math>\alpha</math>-pineno e <math>\beta</math>-pineno)</b> ..... | 21 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 26 |
| <b>3.1. Objetivos gerais</b> .....   | 26 |
| <b>3.2. Objetivos específicos</b> .....  | 26 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 27 |
| <b>4.1. Local de estudo</b> .....  | 27 |
| <b>4.1.2. Carrapatos</b> .....   | 27 |
| <b>4.1.3. Substâncias químicas</b> .....   | 27 |
| <b>4.1.4. Teste de Imersão em Adultos</b> .....  | 27 |
| <b>4.1.5 Análise semiquantitativa</b> .....  | 28 |
| 5. RESULTADOS .....  | 30 |
| <b>5.1 Avaliação da mortalidade</b> .....  | 30 |
| <b>5.2 Análise histopatológica</b> .....   | 30 |
| <b>5.2.1 Grupo C1 (água destilada) e C2 (Tween 80 a 2%)</b> .....                                      | 30 |
| <b>5.2.2 <math>\alpha</math>-pineno</b> .....  | 31 |
| <b>5.2.3 <math>\beta</math>-pineno</b> .....   | 32 |
| <b>5.3 Análise semiquantitativa</b> .....  | 33 |
| 5. DISCUSSÃO .....   | 43 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... | 47 |
| REFERÊNCIAS .....             | 48 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos *Rhipicephalus microplus*, popularmente conhecidos como carrapatos dos bovinos, possuem ampla distribuição no Brasil e são de grande importância médica-veterinária, por transmitirem patógenos aos bovinos. São os principais vetores de *Anaplasma* sp. e *Babesia* sp., causadores da Tristeza Parasitária Bovina, responsável por inúmeros prejuízos no sistema de produção bovina (Campos et al., 2012; Biegelmeyer et al., 2012).

Além disso, os prejuízos provocados pelos carrapatos *R. microplus* ao seu hospedeiro também podem ser diretos, como a perda de sangue devido a hematofagia, irritabilidade, lesões que ocasionam a desvalorização do couro, retardo no desenvolvimento dos bezerros, e predisposição à miíases e de forma indireta, relacionada aos elevados custos com produtos químicos acaricidas utilizados no controle desse ectoparasito, que podem, inclusive, ser encontrados nos produtos de origem animal (carne e leite) e no meio ambiente (Sonenshine et al., 2002; Biegelmeyer et al., 2012; Sousa et al., 2013).

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com aproximadamente 224,6 milhões de cabeças (IBGE, 2022) e o custo resultante das infestações provocadas por este ectoparasito no país é estimado em aproximadamente US\$ 3 bilhões de dólares por ano, o que representa uma grande perda econômica (Fernandez et al., 2020).

O método de controle de carrapatos mais comumente utilizado é através de produtos químicos, conhecidos como acaricidas sintéticos (Chuks et al., 2020). Contudo, o uso inadequado, abusivo e contínuo destes compostos pode ser tóxico para os hospedeiros e seres humanos, além de estar associado à poluição ambiental e influenciar no surgimento de linhagens resistentes, o que levou a busca por outras alternativas para sua substituição. Entre elas, destaca-se o uso de produtos provenientes de compostos presentes nas plantas, os quais apresentam baixa toxicidade e são considerados ecologicamente corretos (Leal et al., 2003; Clemente et al., 2007; Borges et al., 2012).

Os constituintes bioativos presentes nos óleos essenciais exibem efeitos acaricidas e inseticidas, exercendo diferentes mecanismos de ação (Abbas et al., 2018). Segundo vários autores, estes compostos são capazes de atuar negativamente no sistema nervoso dos ectoparasitos, inibindo a liberação de acetilcolinesterase, enzima essencial na atividade e transmissão sináptica (Jukic et al., 2007; Askin et al., 2017; Showler, 2017; Kim et al., 2013; Zarrad et al., 2020). Além disso, podem causar outros efeitos nos carrapatos como mortalidade, redução da viabilidade dos ovos e alterações morfológicas em diversos órgãos, incluindo o órgão reprodutor feminino (Monteiro et al., 2010; Oliveira et al., 2016; Pereira-Junior et al., 2019; Lima-Souza et al., 2019).

Os pinenos são monoterpenos bicíclicos encontrados nos óleos essenciais de diversas espécies vegetais, como *Eucalyptus* sp. (eucalipto), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Pinus* sp. (pinheiro) e *Lavandula officinalis* (lavanda) (Chagas et al., 2002; Costa et al., 2008; Xiao-Wei et al., 2020; Diass et al., 2021; Ankney et al., 2022). Possuem várias atividades biológicas, a citar: ação fungicida, inseticida, antiviral, antimicrobiana, antibacteriana, entre outras. Além disso, podem ser utilizados na indústria alimentícia e de fragrâncias (Silva et al., 2012; Salehi et al., 2019). Vários estudos têm sido desenvolvidos com princípios ativos isolados e alcançado bons resultados, visto que o uso desses compostos isolados é capaz de superar os fatores limitantes dos óleos essenciais como por exemplo instabilidade, rápida degradação, entre outras (Palermo et al., 2021).

Os acaricidas atuam não só inativando o sistema nervoso, como também são capazes de afetar outros sistemas ligados a sobrevivência dos ectoparasitas. O aparelho reprodutor feminino é de particular interesse no controle de carrapatos, visto que a geração de novos indivíduos depende totalmente do desenvolvimento completo dos oócitos (Camargo-Mathias et al., 2017).

Diante disso, várias pesquisas têm sido realizadas a fim de abordar a toxicidade dos compostos naturais na morfologia dos ovários de carrapatos (Oliveira et al. al., 2009; Roma et al., 2011; Sampieri et al., 2012; Oliveira et al., 2016; Camargo-Mathias et al., 2017; Lima-Souza et al., 2019; König et al., 2019, 2020; Reis et al., 2021, 2023). Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos morfológicos provocados por concentrações subletais dos princípios ativos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno nos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. microplus*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Carrapatos

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos que transmitem uma grande variedade de patógenos como vírus, protozoários, e bactérias, mais do que qualquer outro grupo de artrópodes. São considerados vetores agentes causadores de doenças de grande importância que afetam não apenas o gado e os animais de companhia, mas também os seres humanos. Além disso, podem causar condições graves como paralisia e toxicose, irritação e alergia (Jongejan et al., 2004; Dantas-Torres et al., 2009; Benelli et al., 2016).

Os carrapatos são divididos em três famílias: Argasidae, constituída pelos chamados carrapatos moles (216 espécies); Ixodidae, com membros conhecidos como carrapatos duros (733 espécies); e Nuttalliellidae, composta por apenas uma espécie, *Nuttalliella namaqua* (Benelli et al., 2016; Dantas-Torres et al., 2019). No Brasil existem aproximadamente 70 espécies de carrapatos identificados, sendo 23 argasídeos e 47 ixodídeos. Os principais representantes da família Ixodidae pertencem aos gêneros *Amblyomma* (32 spp.), *Haemaphysalis* (3 spp.), *Rhipicephalus* (2 spp.) e *Dermacentor* (1 spp.) (Dantas-Torres et al., 2019).

#### 2.1.2. *Rhipicephalus microplus*

Popularmente conhecido como carrapato-do-boi ou carrapato dos bovinos, *R. microplus* é a única espécie do subgênero *Boophilus* originária do sudeste da Ásia e que se espalhou pelos trópicos, incluindo Austrália, leste e sul da África e América do Sul e Central (Jongejan et al., 2004). Pertence à família Ixodidae da subclasse Acari, com ciclo de vida dividido em ovo, larva, ninfa e adulto e dimorfismo sexual acentuado. As fêmeas, larvas e ninfas apresentam o escudo dorsal até a região do propodossoma, que compreende o primeiro e o segundo par de pernas. Nos machos, o escudo recobre todo o dorso do animal, facilitando a diferenciação entre os machos e fêmeas (Campos et al., 2012).

O carrapato dos bovinos apresenta ciclo de vida do tipo monoxeno, ou seja, necessita de somente um hospedeiro para completar o seu ciclo, que pode ser dividido em duas fases: parasitária e não parasitária. A fase parasitária é compreendida do início da fixação das larvas no hospedeiro até quando os adultos, principalmente as fêmeas ingurgitadas e fecundadas, se desprendem. A fase não parasitária se inicia quando as fêmeas ingurgitadas, também chamadas de teleógenas, se soltam do hospedeiro e caem no solo, onde vão realizar a oviposição. Essa fase termina quando as larvas eclodem dos ovos e procuram um hospedeiro

suscetível para se alimentar (Campos et al., 2012; Senbill et al., 2018). As larvas recém eclodidas necessitam de 3 a 4 dias para que as peças bucais se formem e, então, tornam-se aptas a procurar e se fixar em um hospedeiro. Geralmente são muito perspicazes, subindo ligeiramente nas folhas e hastes do pasto à espera de um hospedeiro suscetível, com o intuito de se fixarem em locais onde a pele do animal é mais fina, como a região genital, entre as pernas, nas axilas e na cauda (Campos et al., 2012).

Após a fixação no hospedeiro, as peças bucais dos carrapatos são envolvidas por um material acelular sintetizado pelas glândulas salivares, conhecido como cimento. As glândulas salivares exercem um grande e significativo papel na alimentação dos carrapatos, porque produzem substâncias importantes como agentes anticoagulantes, vasodilatadores, anti-inflamatórios, antiplaquetários, imunomoduladores e enzimas hidrolíticas e proteolíticas (Campos et al., 2012; Kazimírová et al., 2013).

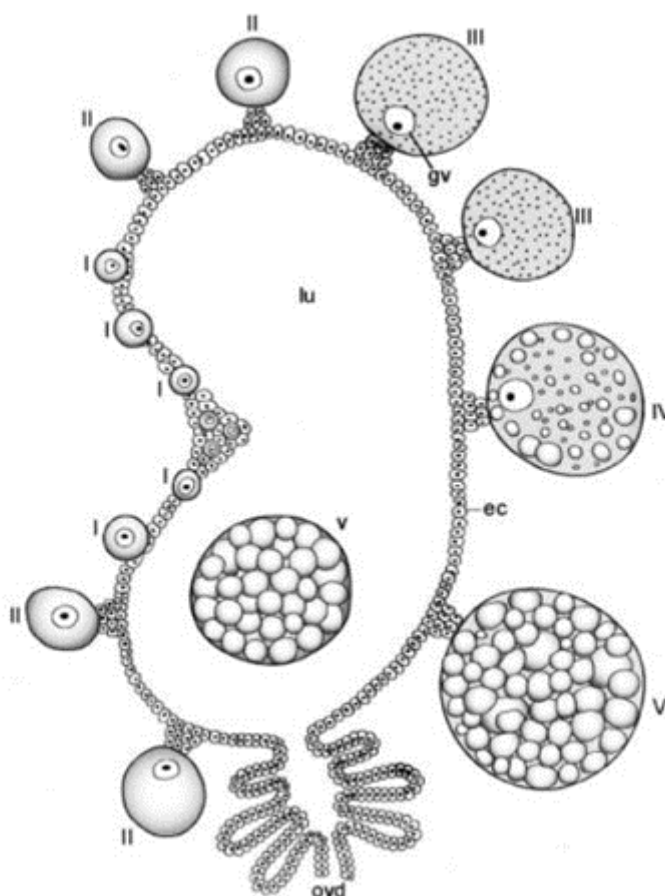
Uma única fêmea é capaz de depositar aproximadamente três mil ovos no ambiente, o que favorece a perpetuação da espécie. Em ambiente laboratorial com condições controladas, a fêmea ingurgitada apresenta um período pré-oviposição médio de quatro dias. O processo de oviposição tem duração média de nove dias, exibindo produção máxima no terceiro dia, com aproximadamente  $589.1 \pm 119.2$  ovos por fêmea. Em boas condições ambientais e com disponibilidade de hospedeiros, um ciclo completo de *R. microplus* pode apresentar uma duração média de  $65 \pm 8.0$  dias (Senbill et al., 2018).

O ovário de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* é um órgão tubular em formato de U, localizado no terço médio do corpo do animal. Sua parede abriga oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, com vários tamanhos e formato arredondado. Os oócitos se fixam à parede ovariana por meio de uma estrutura denominada pedicelo, composta por células que resultam da proliferação das células epiteliais durante seu desenvolvimento (Figura 1), e se desenvolvem de maneira não uniforme, ou seja, apresentam crescimento assíncrono ao longo do ovário (Oliveira et al., 2005; Saito et al., 2005)

Os oócitos em estágio I apresentam forma arredonda e tamanho pequeno, com citoplasma homogêneo contendo um núcleo, também conhecido como vesícula germinativa, com nucléolo evidente. Com avançar do desenvolvimento, observa-se o aparecimento de uma granulação fina, dispersa em todo o citoplasma, o que caracteriza o estágio II. Do estágio III em diante, o citoplasma passa a apresentar grânulos de vitelo maiores e a vesícula germinativa se desloca para a periferia, próximo ao pedicelo. Ao seu redor, na superfície externa da membrana plasmática, inicia-se a deposição do córion a partir do estágio III, proporcionando proteção à célula (Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2005). No estágio IV,

os grânulos de vitelo são maiores e o núcleo é raramente observado, embora ainda esteja presente na célula. Os oócitos em estágio V são considerados mais desenvolvidos, com córion bastante espesso além de grânulos de vitelo também maiores. É neste estágio que os oócitos alcançam o oviduto e são depositados pelas fêmeas durante a postura (Oliveira et al., 2005; Saito et al., 2005).

**Figura 1.** Estrutura do ovário de *Rhipicephalus microplus*. I- oócito I; II- oócito II; III- oócito III; IV- oócito IV; V- oócito V; ec- epitélio; lu- lúmen; ovd- oviduto; gv- vesícula germinativa.



Fonte: Saito et al. (2005).

Os carrapatos *R. microplus* têm preferência em parasitar bovinos, mas podem também infestar outros animais domésticos, como ovinos, caprinos, bubalinos e equinos. (Pereira et al., 2008). No entanto, Pereira et al. (2008) afirmaram que, em outros animais domésticos, poucos carrapatos chegam a atingir o estágio de fêmea ingurgitada em consequência de um conjunto de fenômenos imunitários que resultam na morte, principalmente do estágio larval dos carrapatos.

## **2.2. Métodos de controle**

O controle de carrapatos pode ser realizado por meio de diferentes métodos, como vacinação (Contreras et al., 2017), rotação de pastagens (Abbas et al., 2014), controle biológico por meio de predadores (Wassermann et al., 2016), fitoterápicos (Adenubi et al., 2016), controle integrado (De La Fuente et al., 2007), entre outros. No entanto, o uso de produtos químicos, principalmente sintéticos, ainda corresponde ao método mais utilizado no combate destes ectoparasitos (Chuks et al., 2020).

O surgimento de linhagens resistentes a esses produtos tem levado à busca por alternativas para sua substituição. Entre elas, destaca-se o uso de compostos obtidos a partir de produtos vegetais (Leal et al., 2003; Clemente et al., 2007; Borges et al., 2012), estratégia importante na qual se investiga o uso de compostos bioativos de plantas para elaborar novos produtos acaricidas. As pesquisas direcionadas a esses compostos tem o intuito de identificar novas moléculas com diferentes modos de ação e alvos biológicos, bem como avaliar seus efeitos sinérgicos quando comparados com os produtos comerciais disponíveis atualmente (Luns et al., 2021).

### **2.2.1 Acaricidas sintéticos**

Os produtos acaricidas sintéticos mais utilizados pertencem à classe das arilformamidinas (amitraz), benzoiluréias (diflubenzuron, fluazuron), pirazois (fipronil), avermectinas (ivermectina), organofosforados (clorfenvifós, clorpiurifós, coumafós, biclorvos, fention, triclorfom) e piretroides (cialotrina, ciuflutrina, cipermetrina, deltametrina, plumetrina). As duas últimas classes normalmente são as mais utilizadas, bem como as mais tóxicas (Silva et al., 2012). Eles atuam de forma sistêmica, posteriormente à absorção do composto pelos tecidos do hospedeiro, ou pelo contato direto com os parasitas-alvo logo após aplicação externa (Rodriguez-Vivas et al., 2014a).

O uso inadequado e abusivo desses produtos químicos no controle de carrapatos produz grandes quantidades de resíduos, visto que são utilizados de 3 a 4 litros da solução por animal em cada aplicação (Ghosh et al., 2015). Por este motivo, os acaricidas sintéticos estão associados à poluição ambiental e podem gerar resíduos nos produtos de origem animal, como carne e leite e seus derivados e são capazes de provocar a intoxicação dos animais assim como, dos aplicadores por não usarem equipamentos de proteção adequados durante a aplicação do produto (Leal et al., 2003; Campos et al., 2012; Alves et al., 2012).

Ademais, o uso periódico desses produtos químicos pode influenciar na seleção de indivíduos resistentes. Os métodos inadequados, os curtos intervalos de tempo de aplicação,

desrespeitando o período de carência, a diluição incorreta das doses devido à superestimação do peso do animal, muitas vezes realizado por pequenos produtores por meio de avaliação visual, são os principais fatores que agilizam o aparecimento de resistência aos acaricidas (Abbas et al., 2014; Rodriguez-Vivas et al., 2018).

Há relatos de populações de carrapatos resistentes desde o ano de 1937 para acaricidas arsênicos, e atualmente a resistência concentra-se em todas as classes conhecidas (Luns et al., 2021). Em várias regiões do Brasil, foram identificadas populações de carrapatos *R. microplus* resistentes aos produtos químicos utilizados, como por exemplo os piretróides sintéticos e organofosforados (Mendes et al., 2011), amitraz (Lovis et al., 2013), lactonas macrocíclicas (Klafke et al., 2012), fipronil (Castro-Janer et al., 2010) e fluazuron (Reck et al., 2014).

A resistência aos acaricidas pode ser determinada pela diminuição de descendentes suscetíveis à atividade de um composto químico em uma determinada população de parasitos, ao longo do tempo. Isso resulta na redução da eficácia do produto e, como consequência, no aumento significativo dos custos do tratamento (Ghosh et al., 2015; Klafke et al., 2017), causando um grande impacto na economia (Jongejan; Uilemberg, 2004). Este fator, juntamente com resistência à maioria de acaricidas em uso atualmente, fortalece a ideia de que são necessárias novas alternativas para o controle desses ectoparasitos.

### **2.2.2. Controle à base de produtos vegetais**

As plantas mais estudadas no controle de carrapatos pertencem às famílias Lamiaceae, Fabaceae, Asteraceae, Piperaceae, Verbenaceae e Poaceae (Rosado-Aguilar et al., 2017). Algumas pesquisas identificaram metabólitos secundários de óleos essenciais e extratos vegetais, como terpenos, estilbenos, cumarinas, ácidos, álcoois, compostos sulfurados e aldeídos, exibindo atividade acaricida contra os gêneros *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Argas* e *Ixodes* (Pamo et al., 2005, Sardá-Ribeiro et al., 2008, Cetin et al., 2010).

A maioria das pesquisas relacionadas à ação acaricida dos produtos oriundos de plantas é direcionada aos testes de compostos aromáticos presentes nos óleos essenciais. Os óleos essenciais (OEs) são constituídos por produtos derivados do metabolismo secundário de plantas aromáticas, responsáveis pela proteção contra pragas e patógenos. Possuem como constituintes majoritários os hidrocarbonetos, que ocasionalmente atuam repelindo os carrapatos (Campos et al., 2012; Benelli et al., 2016). Os óleos essenciais são líquidos, voláteis, límpidos e eventualmente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes

orgânicos, e apresentam, normalmente, densidade inferior à da água. Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, folhas, caules, galhos, sementes, botões, flores, frutos, raízes, casca, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Benelli et al., 2016).

A composição química dos OEs não só resulta da espécie vegetal como também, pode ser influenciada pela idade, parte da planta coletada, variedade, localidade, clima, composição do solo, entre outros fatores (Borges et al., 2019). Isso resulta em variações nos efeitos destes produtos quando aplicados em campo.

A classe dos terpenos é estruturalmente considerada a mais distinta de metabólitos secundários, sendo constituída por moléculas de hidrocarbonetos insolúveis em água (Felipe et al., 2019). São formados por unidades de isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>), e classificados em diferentes subgrupos de acordo com o número de unidades presentes: hemi- (uma unidade), mono- (duas unidades), sesqui- (três unidades), di- (quatro unidades), ses- (cinco unidades), tri- (seis unidades), tetra- (oito unidades) e politerpenos (n unidades) (Croteau et al., 2000).

As plantas podem conter uma mistura de substâncias ativas capazes de atuar retardando ou impedindo o desenvolvimento de resistência dos produtos. Além disso, o uso de produtos provenientes de plantas no controle de carrapatos *R. microplus* apresenta várias outras vantagens, como a utilização na produção orgânica de bovinos; a baixa toxicidade para os animais e seres humanos; a baixa contaminação do meio ambiente e dos alimentos; são ecologicamente corretos; biodegradáveis; a seleção de linhagens resistentes tende a ocorrer lentamente, por serem uma mistura de vários agentes ativos com diferentes mecanismos de ação e a grande variabilidade e disponibilidade de espécies em determinadas regiões (Martinez-Velazquez et al., 2011; Alves et al., 2012; Ghosh et al., 2015; Oliveira et al., 2016).

Os efeitos antimicrobianos, inseticidas e acaricidas dos OEs já foram amplamente relatados (Andrenotti et al., 2013; Ellse et al., 2014; Martins et al., 2014). Além disso, inúmeras pesquisas *in vitro* confirmaram a ação de produtos fitoterápicos sobre os carrapatos, como mortalidade larval, redução de peso, postura, fecundidade, viabilidade dos ovos e alterações morfológicas no órgão reprodutor feminino (Roma et al., 2011; Joonseok et al., 2012; Wanzala et al., 2014; Oliveira et al., 2016; Rey-Valeirón et al., 2017; Camargo-Mathias et al., 2017; Rey-Valeirón et al., 2018; Lima-Souza et al., 2019; König et al., 2019, 2020).

Arafa et al. (2020) avaliaram as atividades adulticida, larvicida, ovicida e repelente de timol, óleo de eucalipto e a combinação entre eles, contra *R. annulatus*. O timol exibiu

93,3% de atividade adulticida na concentração de 10%, enquanto a 2,5% atingiu 100% de atividade larvicida e a 5% interrompeu a eclosão dos ovos. Já o óleo de eucalipto também apresentou atividade adulticida significativa (96,7%) e interrompeu a eclosão de ovos na concentração de 10%. O efeito da combinação timol-eucalipto demonstrou maiores atividades como ovicida e repelente.

Fernandez et al. (2020), por sua vez, avaliaram frações isoladas do OE obtido a partir das folhas de *Laurus nobilis* (louro) e observaram ação acaricida sobre as larvas de *R. microplus*, com valores de concentração letal (CL) de 0,20  $\mu\text{l/mL}$  para 50% dos animais ( $\text{CL}_{50}$ ) e de 0,56  $\mu\text{l/mL}$  para 99% dos carrapatos ( $\text{CL}_{99}$ ).

Viturrelle et al. (2017) analisaram a atividade acaricida dos OEs de *Citrus limonum* e *Piper nigrum* contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. O OE de *C. limonum* se mostrou mais eficiente, provocando 100% de mortalidade na concentração de 10% ( $\text{CL}_{50} = 2,2\%$  e  $\text{CL}_{90} = 4,9\%$ ). No entanto, a mistura dos dois óleos (na proporção de 1:1) inibiu em 94% a taxa de oviposição na concentração de 5% e induziu 100% de mortalidade na concentração de 10% ( $\text{CL}_{90} = 5,1\%$ ).

Guzmán et al. (2022) testaram os OEs de *Ambrosia peruviana* e *Lepechinia mutica* contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Como resultados, alcançaram uma mortalidade larval de 98-99% na concentração de 0,5% de ambos os óleos. O OE de *A. peruviana* impediu a oviposição e a eclosão dos ovos em até 82% e 80%, respectivamente, e apresentou uma eficácia global de 93,12%.

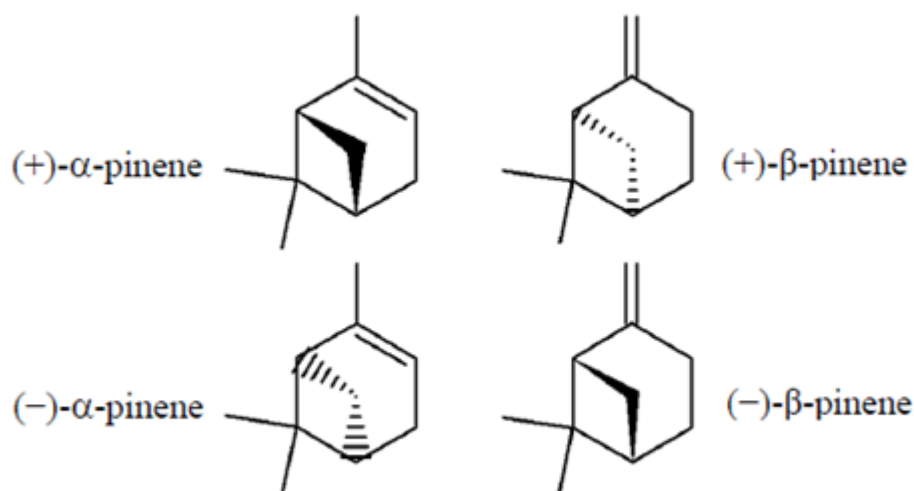
O uso de compostos isolados pode ser uma alternativa viável, capaz de superar os fatores limitantes dos OEs a citar: instabilidade, rápida degradação, alta volatilidade e limitada solubilidade em água (Parlemo et al., 2021). Alguns estudos utilizando compostos isolados têm alcançado bons resultados, sugerindo os princípios ativos puros, como possíveis componentes das futuras formulações estáveis de acaricidas (Monteiro et al., 2010; Matos et al., 2014; Pereira-Junior et al., 2019; Gonçalves et al., 2020; König et al., 2020).

### **2.2.3. Alfa-pineno e Beta-pineno ( $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno)**

Os pinenos são monoterpenos bicíclicos que possuem dois isômeros constitucionais, o  $\alpha$ -pineno e o  $\beta$ -pineno, cada um deles sendo considerados compostos racêmicos separáveis em enantiômeros S (+) ou R (-) (Figura 2). Os isômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno são distintos em suas interações com a luz polarizada e as suas imagens no espelho não se sobrepõem (Silva et al., 2012; Salehi et al., 2019). Quando a molécula é opticamente ativa, como é o caso dos pinenos, os dois isômeros são frequentemente identificados em diferentes plantas: a molécula de (+)

$\alpha$ -pineno pode ser encontrada na espécie de *Pinus paustris* e a molécula de (-)  $\beta$ -pineno na espécie de *P. caribaea* e de *P. pinaster*, por exemplo (Bakkali et al., 2008; Salehi et al., 2019).

**Figura 2.** Fórmulas estruturais dos enantiômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno.



Fonte: Silva et al. (2012).

O  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno podem ser encontrados nos óleos essenciais de diversas espécies vegetais como, por exemplo: *Eucalyptus* sp. (eucalipto), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Pinus* sp. (pinheiro) e *Lavandula officinalis* (lavanda). Em algumas plantas, são considerados constituintes majoritários dos óleos essenciais extraídos (Chagas et al., 2002; Costa et al., 2008; Xiao-Wei et al., 2020; Diass et al., 2021; Ankney et al., 2022).

O  $\alpha$ -pineno é um líquido orgânico incolor, insolúvel em água, mas com solubilidade em óleo e etanol. Apresenta um ponto de ebulição de 155°C. Inclusive, já foi identificado em aproximadamente 40 óleos essenciais diferentes (Vespermann et al., 2017; Salehi et al., 2019). Por sua vez, o  $\beta$ -pineno é um líquido orgânico incolor, com solubilidade em óleo, porém, insolúvel em etanol e água. Seu ponto de ebulição pode variar de 163-166°C. Ele pode ser obtido comercialmente por destilação ou por conversão a partir do  $\alpha$ -pineno. 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). Ambos possuem ação fungicida, inseticida, antiviral, antimicrobiana, antibacteriana, entre outras. Além disso, podem ser utilizados na indústria alimentícia e de fragrâncias (Silva et al., 2012; Salehi et al., 2019).

Pesquisas têm revelado os benefícios de OEs contendo  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno em sua composição, demonstrando a possibilidade de se utilizar estes óleos e seus componentes em diversas áreas. Kim et al. (2015) apuraram a ação inibitória do  $\alpha$ -pineno na resposta inflamatória em macrófagos peritoneais de camundongos, e constataram que o tratamento suprimiu as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a via do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Além disso, os autores relataram uma produção significativamente reduzida de IL-6, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e inibição das enzimas iNOS e COX-2. Sugerindo, o  $\alpha$ -pineno como um possível agente anti-inflamatório natural eficaz.

Xiao et al (2014) testaram a atividade antiinflamatória do OE *Senecio flammeus* em edema de pata, orelha e granuloma de ratos. O OE (10, 30 e 90 mg/kg), que continha  $\alpha$ -pineno entre os seus principais compostos, resultou em redução dose-dependente significativa no edema de pata (17,4%, 52,9% e 66,4%), na atividade de mieloperoxidase (MPO), no edema de orelha (20,27%, 33,0% e 53,9%) e no granuloma.

Em seu estudo *in vivo*, Nam et al. (2014) investigaram o efeito imunomodulador de  $\alpha$ -pineno em ratos com rinite alérgica, e alcançaram redução nos níveis de fatores de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), imunoglobulina-E (IG-E), interleucina-4 (IL-4), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e proteína inflamatória macrófaga-2 (MIP-2), além da inibição da infiltração de eosinófilos e mastócitos presentes na mucosa nasal. Os autores, sugerem que o  $\alpha$ -pineno é um agente antialérgico promissor.

Martins et al. (2003) analisaram a atividade antimicrobiana do OE de *Santiria trimera* e seus principais constituintes,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, nas concentrações de 66 e 20% respectivamente. O OE e os pinenos demonstraram um resultado significativo na eficácia contra cepas bacterianas de *Escheria coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Além disso, outras pesquisas têm sido direcionadas à avaliação da toxicidade dos OEs ricos em pinenos em insetos e carrapatos, na busca por novas alternativas de controle. Sharifian et al. (2012) verificaram a toxicidade do OE de *Artemisia vulgaris* L., que apresenta o  $\alpha$ -pineno como seu constituinte majoritário, contra o besouro vermelho da farinha *Tribolium castaneum*, o caruncho-do-feijão *Callosobruchus maculatus* e o besourinho dos cereais *Rhizopertha dominica*, nos períodos de 24, 48 e 72 h. Os resultados demonstraram eficácia contra *C. maculatus*, após 24hs, com valor de CL<sub>50</sub> de 53  $\mu$ L/L de ar. Em um outro estudo semelhante, Ajayi et al. (2014) analisaram a atividade fumigante contra *C. maculatus* utilizando (+) - $\alpha$ -pineno, e encontraram um valor de CL<sub>50</sub> de 31,4 53  $\mu$ L/L de ar em 24hs.

Cao et al. (2019) investigaram a toxicidade fumigante do OE extraído do fruto, caules + folhas e folhas de *Haplophyllum dauricum* contra adultos de *T. castaneum* e do besouro do cigarro *Lasioderma serricorne*. Identificaram  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno como constituintes principais. O OE dos caules + folhas exibiu toxicidade de contato mais alta em *T. castaneum*, com  $LD_{50} = 20,21 \mu\text{L/adulto}$ , e ação fumigante e de toxicidade de contato em *L. serricorne* com valores da  $CL_{50} = 17,17\text{mg/L}$  de ar e  $LD_{50} = 25,46 \mu\text{L/adulto}$ .

Choi et al. (2006) também avaliaram a toxicidade fumigante do OE de tomilho em adultos de mosquitos dos fungos *Lycoriella mali*, e descobriram que  $\alpha$ -pineno (8,4%) e  $\beta$ -pineno (4,3%), mesmo em quantidades reduzidas, apresentaram forte toxicidade fumigante, sendo o  $\alpha$ -pineno considerado o componente mais tóxico.

Em seu estudo, Langsi et al. (2020) testaram o  $\alpha$ -pineno presente no OE de *Cupressus sempervirens*, para avaliar os efeitos de contato e fumigação contra o gorgulho do milho *Sitophilus zeamaisem*. Como resultados, o  $\alpha$ -pineno, na concentração de 12 ppm, diminuiu a produção de descendentes em até 98% e 92% na aplicação de contato e na toxicidade de fumigante, quando comparado com o controle, respectivamente.

Pajaro-Castro et al. (2017) investigaram os efeitos de linalol e  $\beta$ -pineno na expressão de genes ligados a neurotransmissão em adultos de *T. castaneum*, e a atividade repelente utilizando o método de preferência por área. Ambos os compostos exibiram forte atividade repelente: o linalol apresentou valor de concentração de repelência ( $RC_{50}$ ) de  $0,11 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  e o  $\beta$ -pineno de  $0,03 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Por outro lado, o  $\beta$ -pineno apresentou alta capacidade de provocar modificações na expressão de genes associados à transmissão neural, quando comparado com o linalol.

Apel et al. (2009), por sua vez, verificaram a toxicidade dos OEs da parte aérea de 5 espécies do gênero *Cunila* em larvas de *R. microplus* e identificaram  $\alpha$ -pineno (26,7%) e  $\beta$ -pineno (27,5%) como componentes majoritários da espécie *C. incana*, a qual ocasionou taxa de mortalidade de 100% das larvas.

Além disso, Elmhalli et al. (2019) analisaram repelência e a toxicidade dos OEs extraídos das folhas de *R. officinalis* L. e *Salvadora persica* L., contra ninfas de *Ixodes ricinus*. Em ambos os óleos, foi identificada a presença de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno como constituintes mais abundantes. Como resultados, descobriram que o óleo de *R. officinalis* na concentração de  $1 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  possui um efeito tóxico significativo contra ninfas no período de 24h, com valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  estimados em 0,7 e  $0,95 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ . Já o óleo de *S. persica* se mostrou repelente contra ninfas na concentração de  $1 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  por um período de 5h. Os

autores afirmaram que  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno podem ter sido responsáveis pela ação repelente dos óleos testados e por provocar um efeito mais duradouro do óleo de *S. persica*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos gerais

Avaliar o efeito de concentrações subletais dos princípios ativos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno na morfologia do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Analisar, após a exposição a diferentes concentrações subletais dos isômeros  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, a morfologia do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* por meio de técnica histológica de rotina e coloração para carboidratos e proteínas.

2. Comparar os possíveis efeitos tóxicos encontrados nos ovários dos carrapatos expostos aos princípios ativos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno a partir de um protocolo de análise semiquantitativa, baseado no grau de importância e na extensão das alterações no tecido.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local de estudo

O trabalho foi realizado nas dependências da sala de apoio do Laboratório de Microscopia I do Departamento de Medicina da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras/MG, Brasil.

### 4.1.2. Carrapatos

Foram utilizadas fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) coletadas manualmente em bovinos infestados na cidade de Bom Sucesso/MG, Brasil, sem tratamento recente com acaricidas por no mínimo 1 mês. Aquelas que estavam sem a presença dos machos e que apresentaram aparência e locomoção típicas da espécie foram selecionadas para o estudo. As fêmeas selecionadas foram, posteriormente, lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira e secas em papel absorvente macio.

### 4.1.3. Substâncias químicas

Os monoterpenos bicíclicos (-)  $\alpha$ -pineno e (-)  $\beta$ -pineno, de fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>, foram adquiridos da empresa Simga-Aldrich Co. (St Louis Mo, EUA) com 99% de pureza.

### 4.1.4. Teste de Imersão em Adultos

Foram estabelecidos 8 grupos experimentais: 2 Grupos Controle (C1 e C2), nos quais as fêmeas foram expostas, respectivamente, à água destilada e ao solvente Tween 80 diluído a 2% em água destilada, e 6 Grupos de Tratamento, 3 para cada produto (TA1-TA3 para  $\alpha$ -pineno e TB1-TB3 para  $\beta$ -pineno), nos quais os carrapatos foram submetidos às concentrações subletais de 5,0; 10,0 e 20,0  $\mu$ L/mL dos princípios ativos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, estabelecidas por meio de um teste piloto. O protocolo experimental foi realizado por meio do Teste de Imersão em Adultos, descrito por Drummond et al. (1973). Para isso, os animais (n = 80) foram pesados, divididos em grupos com pesos homogêneos ( $p > 0,05$ ) (10 carrapatos por grupo) e imersos em béqueres contendo as soluções a serem testadas durante 5 minutos. Posteriormente, os animais foram secos em papel absorvente e observados durante um período de sete dias. Após este período, cinco exemplares sobreviventes de cada grupo foram selecionados aleatoriamente para análise histológica. Foram considerados vivos os

carrapatos que demonstraram locomoção após estímulo com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ou com uma pinça. Carrapatos imóveis ou com cutícula enegrecida e enrijecida foram considerados mortos.

As fêmeas selecionadas foram dissecadas sob estereomicroscópio em placas de Petri contendo solução de tampão fosfato salino (NaCl 0,13M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,017M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02M, pH 7,2) para a coleta das amostras de ovário. O material foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% durante aproximadamente 72 horas e, em seguida, transferido para solução aquosa de etanol a 70%. As amostras foram, então, desidratadas em série crescente de álcool etílico (70, 80, 85, 90 e 95%), por 20 minutos em cada etapa e, logo depois, embebidas em historesina Leica por 24 horas e transferidas para histomoldes para a obtenção dos blocos de resina.

Os blocos de historesina foram seccionados em micrótomo Lupetec MRP09 na espessura de 3-4µm e as secções foram submetidas às técnicas de hematoxilina-eosina (H-E) (Junqueira; Junqueira, 1983) (duas lâminas com 6 cortes cada grupo), a qual permitiu a observação da morfologia geral do tecido, ácido periódico-Schiff (PAS) (Junqueira; Junqueira, 1983) (uma lâmina com 6 cortes) para a observação de carboidratos, e azul de bromofenol (Pearse, 1985) (uma lâmina com 6 cortes), para a detecção de proteínas. As lâminas foram montadas em Entellan® e o material foi analisado e fotografado em fotomicroscópio Leica DM500 equipado com câmera ICC50W.

#### **4.1.5 Análise semiquantitativa**

A análise semiquantitativa dos ovários foi realizada em todas as secções histológicas das lâminas determinadas para a técnica de H-E, com base nos trabalhos publicados por König et al. (2019, 2020), em que as prováveis alterações morfológicas observadas em ovários de carrapatos expostos a substâncias tóxicas foram listadas em tabela e receberam um fator de importância (w), variando de 1 a 3, de acordo com sua relevância para o desenvolvimento e sobrevivência do tecido: (1) importância mínima, quando afeta minimamente a fisiologia celular e as características do tecido; (2) importância moderada, gerando perda parcial de função; e (3) importância elevada, quando geralmente irreversível e ocasionando comprometimento funcional completo na célula ou tecido. Após análise histológica dos ovários, as alterações morfológicas encontradas no presente trabalho (acúmulos basofílicos, córion espesso, córion fragmentado, córion irregular, desorganização citoplasmática, formato irregular, fusão de grânulos, lâmina basal irregular, nucléolo em forma de anel e vacuolização citoplasmática) foram classificadas em escores (α), variando

de 0 a 5, com base na extensão da alteração no tecido: 0 (zero) indica a presença de características semelhantes aos grupos controle e 5 corresponde à presença da alteração em mais de 80% do tecido analisado. A multiplicação do fator de importância de uma alteração pelo seu escore no tecido possibilitou a obtenção do índice de cada alteração (INDEXalt):  $INDEXalt = (w \times \alpha)$ . A soma dos INDEXalt de um mesmo indivíduo resultou no seu índice individual (INDEXind), calculado pela fórmula:  $INDEXind = \Sigma (INDEXalt)$ . Os INDEXalt e INDEXind foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, comparados estatisticamente entre si por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Dunn ( $\alpha < 0,05$ ), utilizando o software BioEstat (versão 5.0).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da mortalidade

Os pesos dos carrapatos submetidos ao Teste de Imersão de Adultos (TIA) não diferiram estatisticamente. Não houve mortalidade nos grupos controle água (C1) e TB2 (10 $\mu$ L/mL de  $\beta$ -pineno). Já os demais grupos de tratamento, uma relação dose-dependente foi observada para a mortalidade, conforme listado na Tabela 1.

### 5.2 Análise histopatológica

#### 5.2.1 Grupo C1 (água destilada) e C2 (Tween 80 a 2%)

Os ovários dos carrapatos expostos à água destilada e ao solvente, apresentaram morfologia consistente com a descrição do sistema reprodutor de *R. microplus* (Saito et al., 2005) (Figura 3). Os oócitos I apresentaram formato alternando entre oval e elíptico, citoplasma homogeneamente basofílico e sem granulações, bem como vesícula germinativa (núcleo) localizada centralmente com um nucléolo evidente.

Os oócitos II eram maiores e exibiram características morfológicas semelhantes ao estágio anterior. No entanto, foi possível notar finas granulações no citoplasma. A vesícula germinativa dos oócitos III foi observada com localização excêntrica, na base da célula, com nucléolo pouco evidente. Ambos os oócitos II e III apresentaram padrão de coloração semelhante. Pequenas granulações grosseiras não uniformes foram observadas no citoplasma dos oócitos III, além de, uma fina camada acidófila externamente à membrana basal, evidenciando o início da deposição do córion.

Os oócitos IV exibiram córion mais evidente em relação aos oócitos III, e a vesícula germinativa e o nucléolo raramente foram observados, em virtude do tamanho dos grânulos de vitelo. Estes apresentaram formato arredondado ou irregular e distribuição não homogênea, com grânulos menores localizados na região central. Os oócitos V foram as maiores células da linhagem germinativa observadas e apresentaram córion totalmente depositado. Seus grânulos de vitelo eram maiores, homogêneos e fortemente corados pela eosina.

Em dois indivíduos de cada grupo, algumas células exibiram nucléolo vacuolizado em uma mínima extensão na lâmina. Em dois indivíduos do grupo CI foram visualizadas, em pequena extensão, células com córion irregular, vacuolização citoplasmática, fusão de grânulos e, ainda, em um desses indivíduos foram encontradas pequenas regiões basofílicas no interior do citoplasma, em proporções pouco significativas. Além disso, em três indivíduos do grupo CII demonstraram a ocorrência mínima de desorganização

citoplasmática, vacuolização citoplasmática e acúmulos basofílicos. Inclusive, dois desses indivíduos também apresentaram córion irregular e fusão de grânulos em extensões muito reduzidas.

Na coloração de azul de bromofenol, que evidencia o conteúdo de proteínas, as células do pedicelo e do ducto do ovário, bem como os oócitos I e II foram levemente coradas. Em contrapartida, oócitos III, IV e V exibiram coloração mais intensa e semelhante em todas as células. Quanto ao conteúdo de carboidratos, na coloração com PAS, as células dos oócitos I, bem como as do pedicelo e do ducto do ovário foram dificilmente visualizadas, apontando a existência de uma concentração mínima de carboidratos. Os oócitos II, exibiram granulações levemente coradas em rosa. Já os oócitos III, IV e V apresentaram coloração mais intensa, também de forma semelhante entre eles (Figura 6 A e B e 7 A e B).

## **5.2.2 $\alpha$ -pineno**

### **5.2.2.1 Grupo TA1 (5 $\mu$ L/mL de $\alpha$ -pineno)**

Neste grupo todas as alterações observadas ocorreram em menor proporção (Figura 4). Os oócitos I exibiram desorganização e vacuolização citoplasmática, nucléolo vacuolizado e acúmulos basofílicos (Figura 4 A). Estas alterações também foram observadas nos oócitos II. Oócitos III exibiram o córion irregular, nucléolo vacuolizado e acúmulos basofílicos (Figura 4 B). Nos estágios IV foi possível observar a presença de córion irregular, fusão de grânulos de vitelo e acúmulos basofílicos. Os oócitos V exibiram grânulos fundidos e córion irregular. Não foram observadas alterações no conteúdo de carboidratos e proteínas em nenhum dos indivíduos (Figura 6 C e 7 C).

### **5.2.2.2 Grupo TA2 (10 $\mu$ L/mL de $\alpha$ -pineno)**

Neste grupo (Figura 4), os oócitos I apresentaram acúmulos basofílicos dispersos por grande parte do citoplasma, vacuolização citoplasmática, nucléolo vacuolizado e desorganização citoplasmática (Figura 4 C). Nos oócitos II foram visualizado acúmulos basofílicos na maioria dos indivíduos, nucléolo vacuolizado, vacuolização citoplasmática e lâmina basal irregular (Figura 4 C). Nos oócitos III foi identificada a presença de acúmulos basofílicos, nucléolo vacuolizado, córion irregular, vacuolização citoplasmática e formato irregular (Figura 4 D). Nos estágios IV e V foram encontrados grânulos fundidos e córion irregular em 50% do material analisado. Em relação ao conteúdo de carboidratos e proteínas, não foram visualizadas alterações nos indivíduos deste grupo (Figura 6 D e 7 D).

### **5.2.2.3 Grupo TA3 (20 $\mu$ L/mL de $\alpha$ -pineno)**

Nos oócitos I dos indivíduos tratados com a maior concentração de  $\alpha$ -pineno, observou-se a presença de acúmulos basofílicos em maior proporção em comparação ao grupo TA2 (Figura 4 E), além de nucléolo vacuolizado, vacuolização e desorganização citoplasmática. Nos estágios II e III, os oócitos também apresentaram acúmulos basofílicos, vacuolização citoplasmática e nucléolo vacuolizado (Figura 4 E e F). Nos oócitos IV, foram encontrados grânulos fundidos, formato irregular, granulações basofílicas, e córion irregular na maioria dos indivíduos (Figura 4 F). Os oócitos V exibiram fusão de grânulos, córion irregular em 80% dos indivíduos e córion fragmentado. Quanto ao conteúdo de carboidratos e proteínas, não foram encontradas diferenças em nenhum dos indivíduos (Figura 6 E e 7 E).

## **5.2.3 $\beta$ -pineno**

### **5.2.3.1 Grupo TB1 (5 $\mu$ L/mL de $\beta$ -pineno)**

No grupo tratado com a menor concentração de  $\beta$ -pineno (Figura 5), os oócitos I exibiram acúmulos basofílicos em maior quantidade que os visualizados no grupo TA3, além de nucléolo vacuolizado, desorganização e vacuolização citoplasmática (Figura 5 A e B). No estágio II, foi encontrado nucléolo vacuolizado, lâmina basal irregular, formato irregular, acúmulos basofílicos e vacuolização citoplasmática (Figura 5 A e B). Nos oócitos III foram observadas granulações basofílicas, vacuolização citoplasmática, córion irregular e nucléolo vacuolizado. No estágio IV, os indivíduos apresentaram córion irregular, acúmulos basofílicos e fusão de grânulos de vitelo. Os oócitos V, por sua vez, exibiram as mesmas alterações encontradas no grupo TA3. Não foram visualizadas alterações nos indivíduos quanto ao conteúdo de carboidratos e proteínas (Figura 6 F e 7 F).

### **5.2.3.2 Grupo TB2 (10 $\mu$ L/mL de $\beta$ -pineno)**

Neste grupo foram observadas alterações em menor relevância, em relação ao TB1 (Figura 5). Os oócitos I apresentaram acúmulos basofílicos, vacuolização e desorganização citoplasmática, além de nucléolo vacuolizado (Figura 5 D). No estágio II, também foram observadas as granulações basofílicas, além de vacuolização citoplasmática, lâmina basal irregular e formato irregular (Figura 5 C e D). Nos oócitos III foi identificada a presença de córion irregular, acúmulos basofílicos e nucléolo vacuolizado. No estágio IV e V foi verificada a ocorrência de córion irregular e fusão de grânulos. Não foi possível observar diferenças no conteúdo de carboidratos e proteínas nos indivíduos deste grupo (Figura 6 G).

### 5.2.3.3 Grupo TB3 (20 $\mu$ L/mL de $\beta$ -pineno)

Neste grupo, os carrapatos tratados com a maior concentração de  $\beta$ -pineno exibiram alterações em menor proporção (Figura 5), quando comparados aos grupos TB1 e TB2. Nos oócitos I foram visualizadas granulações basofílicas, vacuolização citoplasmática, nucléolo vacuolizado e desorganização citoplasmática (Figura 5 E e F). Oócitos II exibiram acúmulos basofílicos, nucléolo vacuolizado, lâmina basal irregular e vacuolização citoplasmática (Figura 5 E e F). Oócitos III, apresentaram as mesmas alterações identificadas no tratamento anterior. Nos estágios IV e V foram encontrados grânulos de vitelo fundidos e córion irregular. Além disso, foi possível observar acúmulos basofílicos nos oócitos IV. E, ainda, os oócitos V exibiram formato irregular e córion fragmentado. Quanto ao conteúdo de carboidratos e proteínas não foram visualizadas alterações neste grupo (Figura 6 H e 7 G e H).

## 5.3 Análise semiquantitativa

Os índices de cada alteração morfológica ( $Index_{alt}$ ) observados nos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. microplus* expostas ao  $\alpha$ -pineno estão listados na Tabela 1. A vacuolização citoplasmática bem como, o córion irregular encontrados no grupo TA2 ( $4.40 \pm 0.89$  e  $2.00 \pm 0.00$ , respectivamente) e os acúmulos basofílicos no grupo TA3 ( $3.60 \pm 1.34$ ), foram significativamente maiores que no grupo C1 ( $p < 0,05$ ).

Os índices individuais ( $Index_{ind}$ ), calculados pela soma dos  $Index_{alt}$  de cada animal, estão listados na Tabela 2. Os grupos C1 e C2 não diferiram estatisticamente entre si. O  $Index_{ind}$  dos grupos TA2 e TA3 ( $20.80 \pm 5.89$  e  $20.20 \pm 5.45$ , respectivamente) foram estatisticamente maiores que o grupo C1 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença no  $Index_{ind}$  entre os tratamentos TA1, TA2 e TA3, assim como entre estes e o grupo C2.

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão do peso corporal das fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e a mortalidade (%) sete dias após o Teste de Imersão em Adultos.

| Grupos | Carrapatos |                   |                 |
|--------|------------|-------------------|-----------------|
|        | Total (n)  | Peso (mg)*        | Mortalidade (%) |
| C1     | 10         | 0,162 $\pm$ 0,037 | 0               |
| C2     | 10         | 0,161 $\pm$ 0,044 | 20              |
| TA1    | 10         | 0,162 $\pm$ 0,040 | 10              |
| TA2    | 10         | 0,160 $\pm$ 0,037 | 10              |
| TA3    | 10         | 0,157 $\pm$ 0,035 | 30              |
| TB1    | 10         | 0,162 $\pm$ 0,030 | 10              |
| TB2    | 10         | 0,155 $\pm$ 0,039 | 0               |
| TB3    | 10         | 0,163 $\pm$ 0,037 | 60              |

\*Médias de peso corporal não diferiram estatisticamente entre si (ANOVA one way;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) observados nos oócitos de fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\alpha$ -pineno em diferentes concentrações.

| Alteração morfológica         | Fator de importância (w)* | INDEXalt (w x a)  |                    |                    |                    |                    |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                               |                           | C1                | C2                 | TA1                | TA2                | TA3                |
| Acúmulos basofílicos          | 1                         | 0.25 $\pm$ 0.50 a | 0.80 $\pm$ 0.84 ab | 1.20 $\pm$ 1.10 ab | 2.80 $\pm$ 0.84 ab | 3.60 $\pm$ 1.34 b  |
| Córion espesso                | 1                         | 0.00 $\pm$ 0.00   | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.20 $\pm$ 0.45    |
| Córion fragmentado            | 3                         | 0.00 $\pm$ 0.00   | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.00 $\pm$ 0.00    | 1.20 $\pm$ 1.64    | 0.60 $\pm$ 1.34    |
| Córion irregular              | 1                         | 0.25 $\pm$ 0.50 a | 0.40 $\pm$ 0.55 ab | 1.20 $\pm$ 0.45 ab | 2.00 $\pm$ 0.00 b  | 1.20 $\pm$ 0.84 ab |
| Desorganização citoplasmática | 2                         | 0.00 $\pm$ 0.00   | 1.60 $\pm$ 0.89    | 3.20 $\pm$ 1.10    | 1.20 $\pm$ 1.79    | 3.20 $\pm$ 1.79    |
| Formato irregular dos oócitos | 2                         | 0.00 $\pm$ 0.00   | 0.40 $\pm$ 0.89    | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.80 $\pm$ 1.10    | 0.40 $\pm$ 0.89    |
| Fusão de grânulos             | 2                         | 0.50 $\pm$ 1.00   | 0.80 $\pm$ 1.10    | 1.60 $\pm$ 1.67    | 2.40 $\pm$ 0.89    | 2.80 $\pm$ 1.79    |
| Lâmina basal irregular        | 2                         | 0.00 $\pm$ 0.00   | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.00 $\pm$ 0.00    | 1.20 $\pm$ 1.79    | 0.40 $\pm$ 0.89    |
| Nudéolo vacuolizado           | 3                         | 1.50 $\pm$ 1.73   | 1.80 $\pm$ 1.64    | 3.00 $\pm$ 0.00    | 4.80 $\pm$ 1.64    | 3.60 $\pm$ 1.84    |
| Vacuolização citoplasmática   | 2                         | 0.50 $\pm$ 1.00 a | 1.20 $\pm$ 1.10 ab | 2.00 $\pm$ 1.41 ab | 4.40 $\pm$ 0.89 b  | 4.40 $\pm$ 1.67 ab |

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

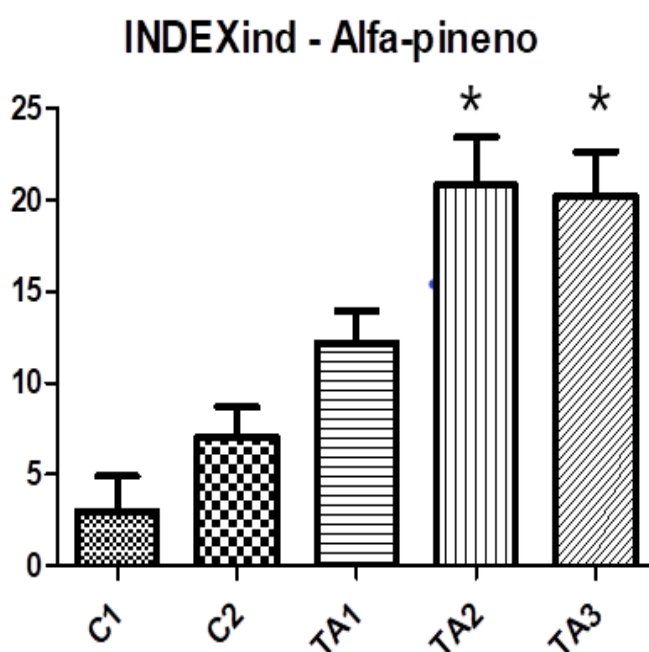
\*Segundo König et al. (2019, 2020).

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\alpha$ -pineno em diferentes concentrações.

| Indivíduo                                   | INDEXind $\Sigma$ (w x a)          |                                     |                                      |                                     |                                     |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|   | C1                                 | C2                                  | TA1                                  | TA2                                 | TA3                                 |
| I   | 8                                  | 10                                  | 12                                   | 26                                  | 15                                  |
| II  | 4                                  | 3                                   | 10                                   | 25                                  | 22                                  |
| III   | 0                                  | 8                                   | 10                                   | 24                                  | 15                                  |
| IV  | 0                                  | 3                                   | 10                                   | 16                                  | 28                                  |
| V   | 0                                  | 11                                  | 19                                   | 13                                  | 21                                  |
| <b>Média <math>\pm</math> desvio padrão</b> | <b>3.00 <math>\pm</math> 3.83a</b> | <b>7.00 <math>\pm</math> 3.81ab</b> | <b>12.20 <math>\pm</math> 3.90ab</b> | <b>20.80 <math>\pm</math> 5.89b</b> | <b>20.20 <math>\pm</math> 5.45b</b> |

Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

**Gráfico 1.** Média  $\pm$  desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\alpha$ -pineno em diferentes concentrações.



\*Diferente do grupo C1 ( $p < 0,05$ ).

Os  $Index_{alt}$  calculados para os ovários de carrapatos expostos ao  $\beta$ -pineno são mostrados na Tabela 3. Apenas os valores obtidos para as vacuolizações citoplasmáticas no grupo TB3 ( $4.00 \pm 0.00$ ) foram estatisticamente maiores que grupo no Controle I ( $p < 0,05$ ). Os  $Index_{ind}$  referentes ao tratamento com  $\beta$ -pineno estão listados na Tabela 4. Não foi observada diferença estatística entre os grupos C1 e C2. Os  $Index_{ind}$  do grupo TB1 ( $21.20 \pm$

5.54) foi estatisticamente maior que o grupo C1 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença no  $INDEX_{ind}$  entre os grupos TB1, TB2 e TB3, bem como entre estes e o grupo C2.

**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão dos índices de cada alteração ( $INDEX_{alt}$ ) observados nos oócitos de fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\beta$ -pineno em diferentes concentrações.

| Alteração morfológica         | Fator de importância (w)* | INDEX <sub>alt</sub> (w x a) |                   |                    |                    |                   |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
|                               |                           | C1                           | C2                | TB1                | TB2                | TB3               |
| Acúmulos basofílicos          | 1                         | 0.25 $\pm$ 0.50              | 0.80 $\pm$ 0.84   | 3.20 $\pm$ 1.30    | 3.40 $\pm$ 1.67    | 3.25 $\pm$ 1.50   |
| Córon espesso                 | 1                         | 0.00 $\pm$ 0.00              | 0.00 $\pm$ 0.00   | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.00 $\pm$ 0.00    | 0.00 $\pm$ 0.00   |
| Córon fragmentado             | 3                         | 0.00 $\pm$ 0.00              | 0.00 $\pm$ 0.00   | 0.60 $\pm$ 1.34    | 0.00 $\pm$ 0.00    | 1.50 $\pm$ 3.00   |
| Córon irregular               | 1                         | 0.25 $\pm$ 0.50              | 0.40 $\pm$ 0.55   | 1.60 $\pm$ 0.55    | 1.60 $\pm$ 0.55    | 1.50 $\pm$ 0.58   |
| Desorganização citoplasmática | 2                         | 0.00 $\pm$ 0.00              | 1.60 $\pm$ 0.89   | 1.60 $\pm$ 1.67    | 2.00 $\pm$ 0.00    | 2.50 $\pm$ 2.52   |
| Formato irregular dos oócitos | 2                         | 0.00 $\pm$ 0.00              | 0.40 $\pm$ 0.89   | 0.80 $\pm$ 1.10    | 0.80 $\pm$ 1.10    | 0.50 $\pm$ 1.00   |
| Fusão de grânulos             | 2                         | 0.50 $\pm$ 1.00              | 0.80 $\pm$ 1.10   | 3.20 $\pm$ 1.10    | 2.40 $\pm$ 0.89    | 2.50 $\pm$ 1.91   |
| Lâmina basal irregular        | 2                         | 0.00 $\pm$ 0.00              | 0.00 $\pm$ 0.00   | 1.60 $\pm$ 1.67    | 1.60 $\pm$ 1.67    | 1.50 $\pm$ 1.00   |
| Núcleo vacuolizado            | 3                         | 1.50 $\pm$ 1.73              | 1.80 $\pm$ 1.64   | 5.40 $\pm$ 1.34    | 4.80 $\pm$ 1.64    | 3.75 $\pm$ 1.50   |
| Vacuolização citoplasmática   | 2                         | 0.50 $\pm$ 1.00 a            | 1.20 $\pm$ 1.10 a | 3.20 $\pm$ 1.10 ab | 3.20 $\pm$ 1.10 ab | 4.00 $\pm$ 0.00 b |

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

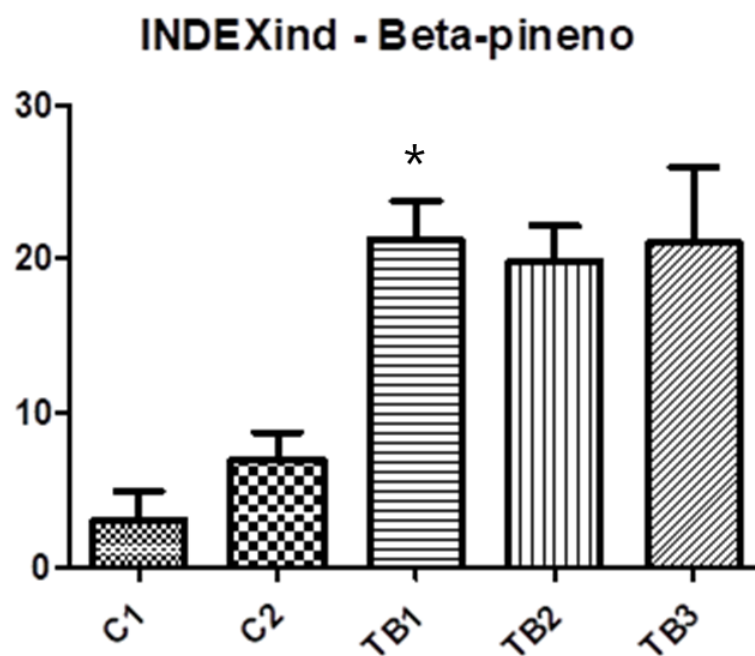
\*Segundo König et al. (2019, 2020).

**Tabela 5.** Média  $\pm$  desvio padrão dos Índices individuais ( $INDEX_{ind}$ ) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\beta$ -pineno em diferentes concentrações.

| Indivíduo                                   | INDEX <sub>ind</sub> $\Sigma$ (w x a) |                                     |                                     |                                      |                                      |
|---|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|   | C1                                    | C2                                  | TB1                                 | TB2                                  | TB3                                  |
| I   | 8                                     | 10                                  | 28                                  | 25                                   | 21                                   |
| II  | 4                                     | 3                                   | 24                                  | 20                                   | 35                                   |
| III   | 0                                     | 8                                   | 13                                  | 21                                   | 14                                   |
| IV  | 0                                     | 3                                   | 20                                  | 11                                   | 14                                   |
| V   | 0                                     | 11                                  | 21                                  | 22                                   | 0                                    |
| <b>Média <math>\pm</math> desvio padrão</b> | <b>3.00 <math>\pm</math> 3.83a</b>    | <b>7.00 <math>\pm</math> 3.81ab</b> | <b>21.20 <math>\pm</math> 5.54b</b> | <b>19.80 <math>\pm</math> 5.26ab</b> | <b>21.00 <math>\pm</math> 9.90ab</b> |

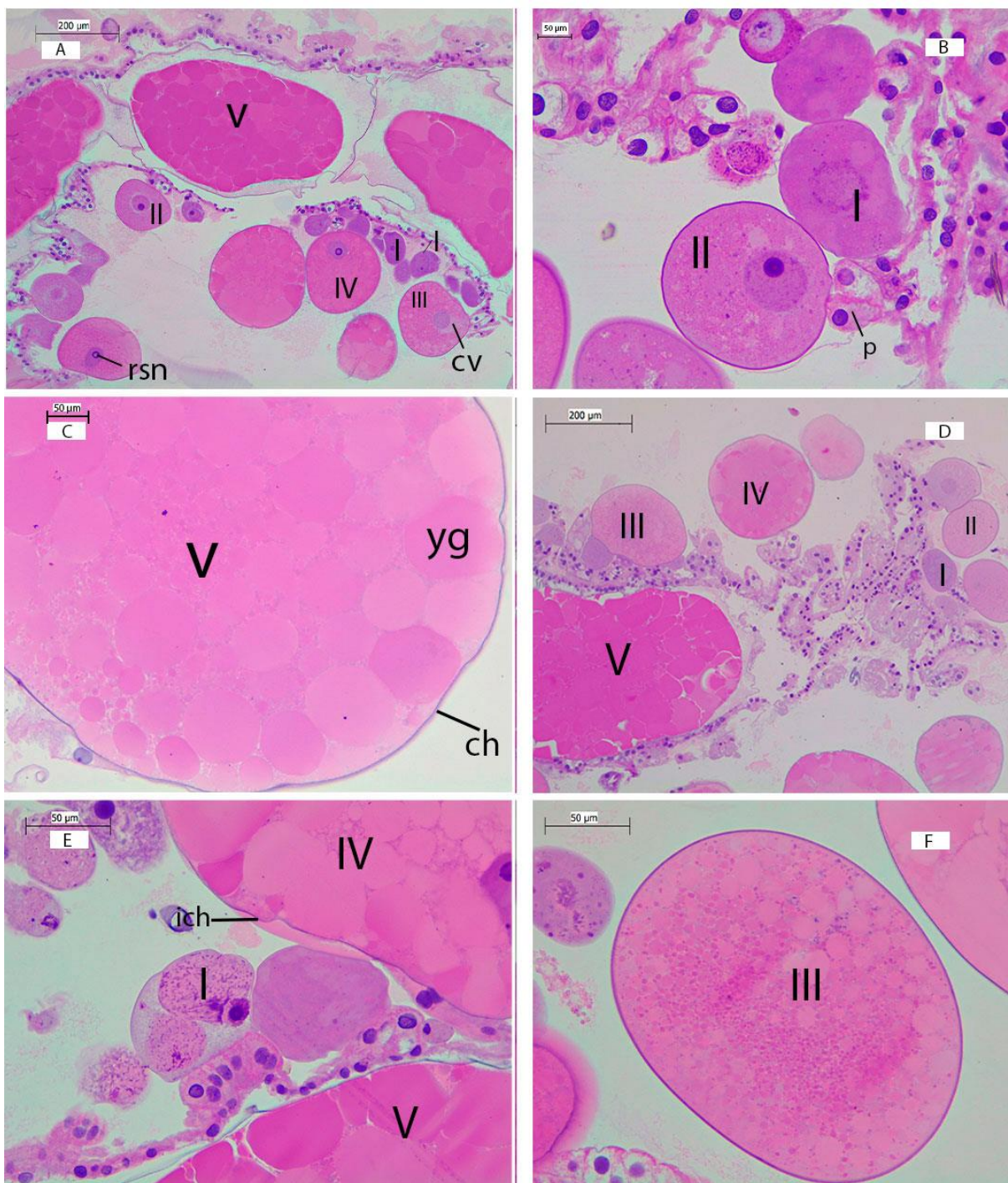
Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

**Gráfico 2.** Média  $\pm$  desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao composto  $\beta$ -pineno em diferentes concentrações.

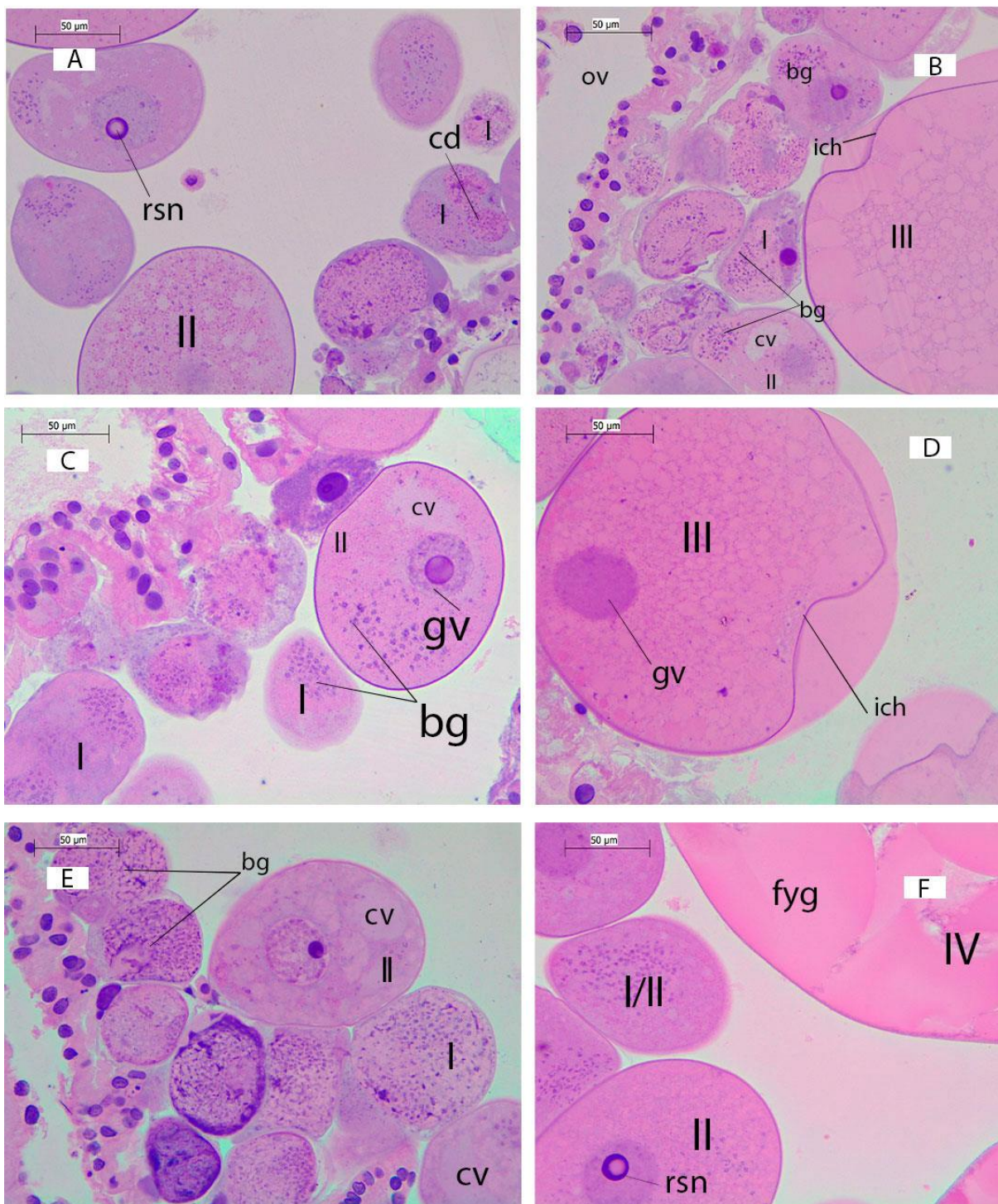


\*Diferente do grupo C1 ( $p < 0,05$ ).

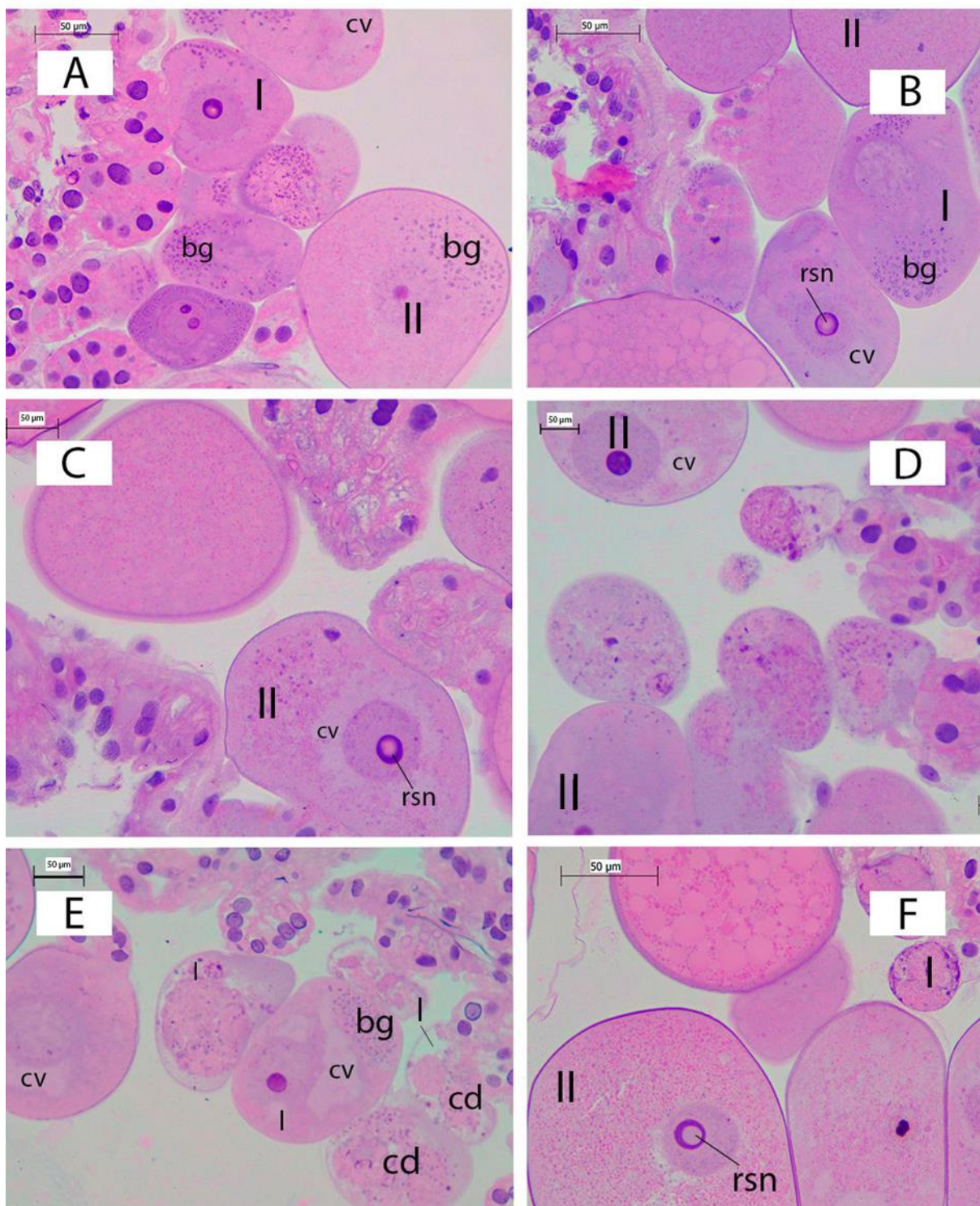
**Figura 3.** Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas aos grupos controle, coradas com hematoxilina-eosina. (A – C) Grupo Controle 1 (água destilada), (D – F) Grupo Controle 2 (Tween 80 a 2%). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos oócitos, (p) pedicelo, (cv) vacuolização citoplasmática, (rsn) nucléolo em forma de anel, (yg) grânulo de vitelo, (ich) córion irregular.



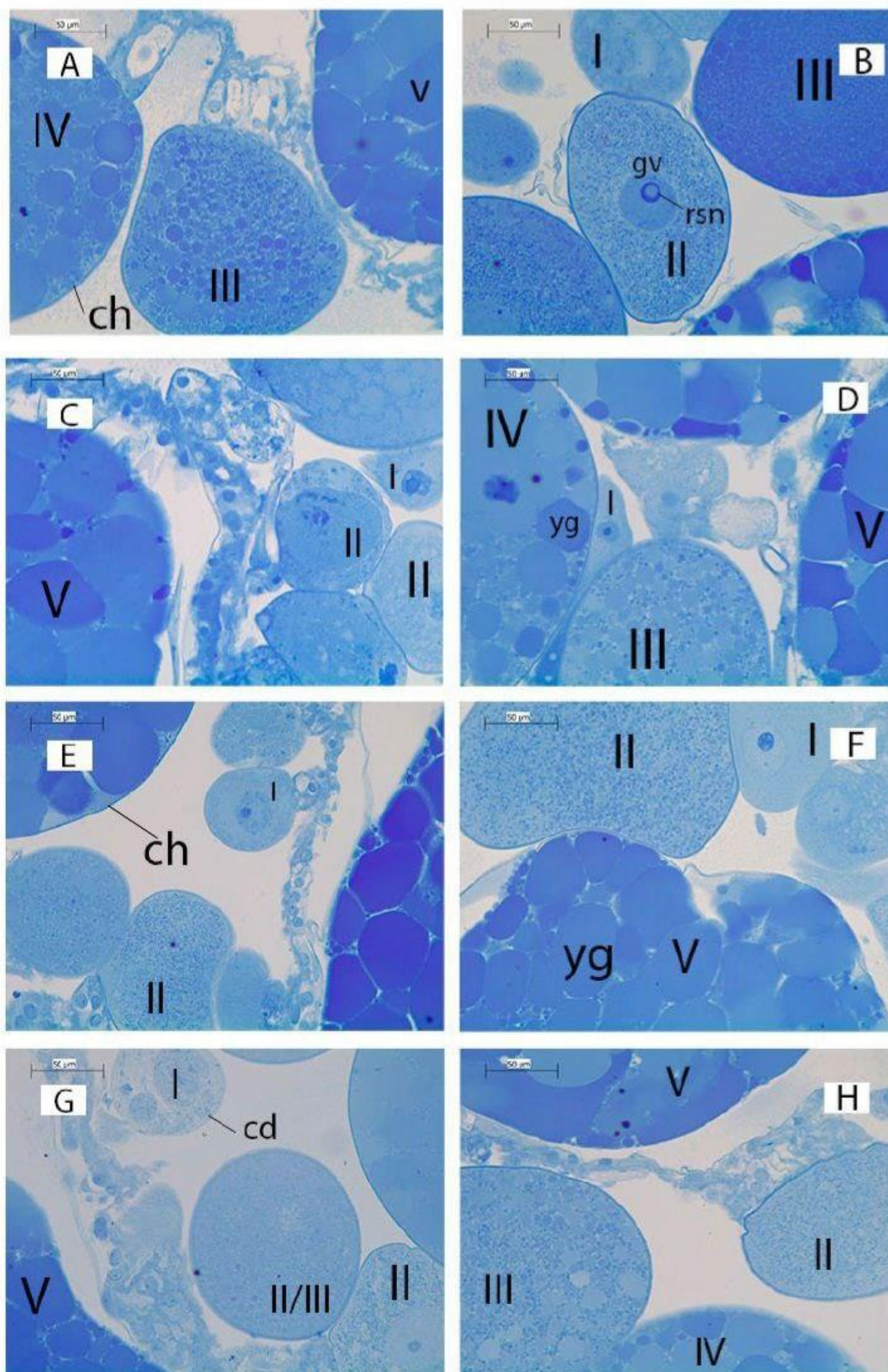
**Figura 4.** Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas a diferentes concentrações de  $\alpha$ -pineno, coradas com hematoxilina-eosina. (A - B) Grupo TA1 (5  $\mu$ L/mL), (C - D) Grupo TA2 (10  $\mu$ L/mL) e (E - F) Grupo TA3 (20  $\mu$ L/mL). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos oócitos, (ov) ducto do ovário, (cv) vacuolização citoplasmática, (ich) córion irregular, (cd) desorganização citoplasmática, (bg) acúmulos basofílicos, (gv) vesícula germinativa.



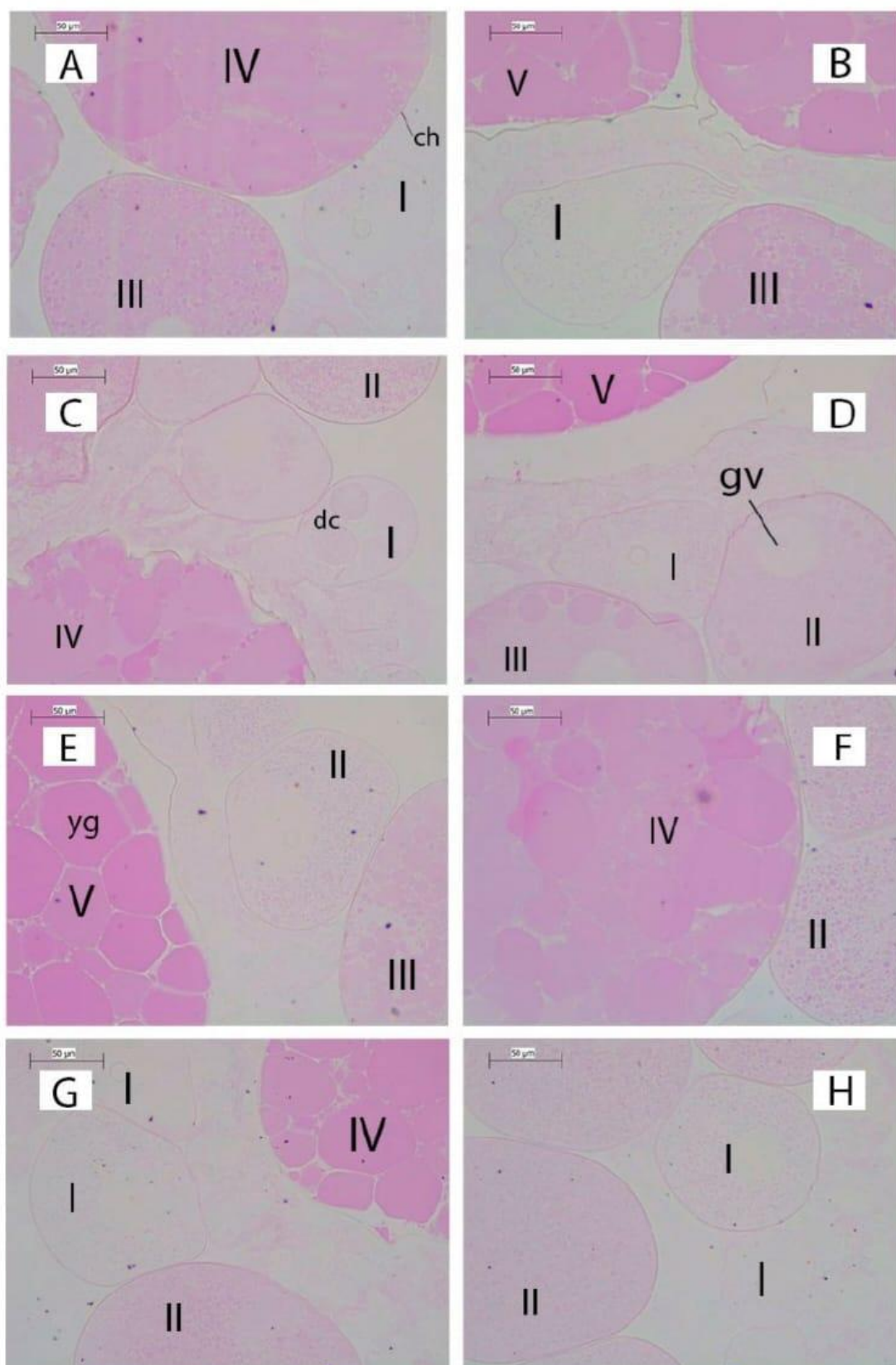
**Figura 5.** Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas a diferentes concentrações de  $\beta$ -pineno, coradas com hematoxilina-eosina. (A - B) Grupo TB1 (5  $\mu$ L/mL), (C - D) Grupo TB2 (10  $\mu$ L/mL) e (E - F) Grupo TB3 (20  $\mu$ L/mL). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos oócitos, (cv) vacuolização citoplasmática, (rsn) nucléolo em forma de anel, (yg) grânulo de vitelo, (cd) desorganização citoplasmática, (bg) acúmulos basofílicos.



**Figura 6.** Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas a diferentes concentrações de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, coradas com azul de bromofenol. (A) Grupo C1 (água destilada), (B) Grupo C2 (Tween 80 a 2%), (C) Grupo TA1 (5  $\mu$ L/mL), (D) Grupo TA2 (10  $\mu$ L/mL), (E) Grupo TA3 (20  $\mu$ L/mL), (F) Grupo TB1 (5  $\mu$ L/mL), (G) Grupo TB2 (10  $\mu$ L/mL) e (H) Grupo TB3 (20  $\mu$ L/mL). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos oócitos, (yg) grânulo de vitelo, (cd) desorganização citoplasmática, (ch) córion e (gv) vesícula germinativa.



**Figura 7.** Sessões histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostas a diferentes concentrações de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, coradas pela técnica de ácido periódico-Schiff (PAS). (A) Grupo C1 (água destilada), (B) Grupo C2 (Tween 80 a 2%), (C) Grupo TA1 (5  $\mu$ L/mL), (D) Grupo TA2 (10  $\mu$ L/mL), (E) Grupo TA3 (20  $\mu$ L/mL), (F) Grupo TB1 (5  $\mu$ L/mL) e (G-H) Grupo TB3 (20  $\mu$ L/mL). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento, (ch) córion, (dc) desorganização citoplasmática, e (gv) vesícula germinativa.



## 5. DISCUSSÃO

A presente pesquisa traz dados relevantes sobre a ação dos compostos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno em fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. microplus*. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo relatando os impactos destes princípios ativos na morfologia do órgão reprodutor feminino do carrapato dos bovinos.

Os indivíduos dos grupos controle apresentaram morfologia consistente com a descrição do sistema reprodutor de *R. microplus* (Saito et al., 2005), embora tenham sido visualizadas mínimas alterações morfológicas em determinados indivíduos, o que pode ser considerado algo normal, conforme mencionado por outros autores anteriormente (Konig et al., 2019; Reis et al., 2023).

Os resultados obtidos pela análise semiquantitativa mostraram que os grupos TA2 e TA3, tratados com as maiores concentrações de  $\alpha$ -pineno, apresentaram índices individuais (INDEXind) estatisticamente diferentes em comparação ao grupo C1. Além disso, os resultados aumentaram progressivamente em relação a dosagem, indicando um possível efeito dose-dependente. Por outro lado, os resultados obtidos após tratamento com  $\beta$ -pineno foram expressivamente maiores na menor concentração, indicando que esses isômeros possuem diferentes modos de ação, apesar de apresentarem a mesma estrutura química.

Em todos os grupos, as principais alterações morfológicas identificadas foram: vacuolização citoplasmática, formato irregular dos oócitos, nucléolo vacuolizado (núcléolo em forma de anel), fusão de grânulos, lâmina basal irregular, acúmulos basofílicos, desorganização citoplasmática, córion irregular, bem como, espesso e fragmentado.

A vacuolização citoplasmática foi uma das alterações morfológicas mais frequentemente encontrada nos indivíduos tratados com ambos os pinenos, embora diferenças estatísticas significativas tenham ocorrido apenas entre os grupos TA2 e TA3 em relação ao C1. Esta alteração foi observada em maior proporção principalmente nos oócitos I e II dos indivíduos tratados com  $\alpha$ -pineno. Resultados semelhantes foram relatados por Reis et al. (2021) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostas ao óleo essencial de *Satureja montana* L. Os oócitos nos estágios iniciais de desenvolvimento são mais suscetíveis à absorção de certas substâncias tóxicas devido à ausência do córion (Remedio et al., 2014b), o que pode explicar os resultados aqui obtidos. Certamente, essa alteração interfere na capacidade reprodutiva das fêmeas (Arantes et al., 2024) e, conseqüentemente, poderá afetar a geração de novos descendentes.

Segundo alguns estudos, a formação de vacúolos no interior do citoplasma pode indicar um mecanismo de defesa da célula, que recicla ou degrada estruturas danificadas

para manter a integridade celular e garantir a sua viabilidade (Roma et al., 2011; Matos et al., 2014; Camargo-Mathias et al., 2017; Konig et al., 2019; Penha et al., 2021; Reis et al., 2023). A ocorrência de vacuolização citoplasmática também pode indicar que o produto afetou a permeabilidade dos oócitos alterando, assim, o fluxo de substâncias e eletrólitos entre a célula e o meio externo (Lima-Souza et al., 2019). De acordo com Secchis et al. (2022) as células submetidas ao estresse químico podem aumentar a permeabilidade da membrana, modificando a sua capacidade de estabelecer o equilíbrio osmótico. Isso pode resultar em alterações no formato dos oócitos.

Irregularidades na deposição do córion nos estágios avançados (III, IV e V) foram comumente observadas em ambos os tratamentos, apesar de terem sido encontradas em maior proporção nos grupos tratados com  $\alpha$ -pineno. Matos et al. (2014) também observaram irregularidades no córion após à exposição de fêmeas de *R. sanguineus* ao timol. Denardi et al. (2011) após tratarem fêmeas de *R. sanguineus* com extrato aquoso de *Azadirachta indica* (neem), relataram a presença de córion irregular com dobras e deformações. O córion é responsável pela proteção e preservação do oócito contra choques mecânicos, modificações de umidade e temperatura, dessecação, predação, além de promover as trocas gasosas. Sua deposição se inicia no estágio III de desenvolvimento e termina no estágio V (Sampieri et al., 2012; Sonenshine, Roe, 2014). A ocorrência de modificações na membrana coriônica pode interferir na realização de funções vitais do oócito, uma vez que sua integridade física foi prejudicada. Uma camada mais espessa afetaria a entrada de oxigênio no interior do oócito, o que prejudicaria a sobrevivência do mesmo (Konig et al., 2019).

No presente estudo, pequenas regiões arredondadas coradas pela hematoxilina foram observadas em grandes quantidades em todos os grupos de tratamento com ambos os compostos, principalmente nos oócitos I e II. Nesses estágios, os oócitos possuem grandes quantidades de ribossomos livres e polirribossomos distribuídos pelo citoplasma (Sonenshine; Roe, 2014). Segundo Saito et al. (2005) a produção de proteínas estruturais (endógena) se inicia no oócito I e somente no estágio seguinte é possível observar o início do processo vitelogênico (Saito et al., 2005). Assim, é possível sugerir que o aumento na quantidade de acúmulos basofílicos observados nos oócitos jovens indiquem o aumento na quantidade destas organelas como resposta à ação tóxica dos produtos utilizados. Isso pode ter relação com as alterações observadas no córion e nos grânulos de vitelo das células afetadas pelos produtos.

Embora os demais parâmetros descritos não tenham apresentado diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e os grupos controle, é importante relatar que

houve uma tendência de aumento da frequência e extensão dessas alterações conforme o aumento da concentração de  $\alpha$ -pineno. Em contrapartida, as concentrações menores de  $\beta$ -pineno foram responsáveis por efeitos tóxicos mais pronunciados, quando comparadas aos grupos tratados com maior quantidade de produto. Assim, o somatório das alterações foi de fato responsável pelos efeitos encontrados no presente estudo. Ademais, vários outros autores também observaram alterações semelhantes em carrapatos tratados com diferentes acaricidas, a citar: nucléolo vacuolizado, fusão de grânulos, formato irregular dos oócitos, córion espesso, fragmentado e irregular (Camargo-Mathias et al., 2017; König et al., 2019; Kanapadinchareveetil et al., 2019; Queiroz et al., 2020; Penha et al., 2021; Reis et al., 2023), desorganização citoplasmática (Camargo-Mathias et al., 2017; Lima-Souza et al., 2019; Oliveira et al., 2021), e lâmina basal irregular (Oliveira et al., 2009; Kanapadinchareveetil et al., 2019; Secchis et al., 2022).

No entanto, vale ressaltar que os pinenos não só podem atuar no sistema nervoso de ectoparasitos (Zarrad et al., 2017), como também no sistema reprodutivo das fêmeas (Arantes et al., 2024) e na morfologia dos ovários, como visto no presente trabalho.

Segundo Choi et al. (2006) os monoterpênicos bicíclicos, como o  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno exibem uma ação tóxica elevada contra os insetos. Essa toxicidade pode estar associada ao sistema nervoso octopaminérgico dos animais (ENAN et al., 2001, 2005). De acordo com Pajaro-Castro et al. (2017) os monoterpênicos, por serem lipofílicos, são capazes de adentrar facilmente nas células e, assim, influenciar nas funções fisiológicas básicas dos animais. Além disso, podem se ligar aos receptores GABA localizados na membrana neuronal pós-sináptica dos insetos.

Zarrad et al. (2017) relataram que o  $\alpha$ -pineno em diferentes concentrações apresentou melhor atividade de inibição da acetilcolinesterase (AChE), em relação a cinco monoterpênicos isolados (linalol,  $\beta$ -mirceno, terpineol, geraniol e nerol), contra o gorgulho do arroz, *Sitophilus oryzae*. Esses achados corroboram os resultados de Kim et al. (2013), que constataram que o  $\alpha$ -pineno também exibiu a maior taxa de inibição da AChE, seguido do  $\beta$ -pineno, contra *S. oryzae*.

O sistema reprodutor dos carrapatos é regido por interações complexas, que compreendem o sistema nervoso central e os órgãos reprodutivos (Oliveira et al., 2009). Kanapadinchareveetil et al. (2019) investigaram a ação do amitraz nos ovários de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. annulatus* e encontraram algumas das alterações aqui mencionadas. Além disso, relataram que o amitraz é capaz de promover efeitos deletérios diretos no ovário mediados pelos receptores  $\beta$  da octopamina. Uma elevação no nível de

octopamina pode ocasionar na interrupção do processo de vitelogênese, modificando o equilíbrio entre o hormônio juvenil e a 20 hidroxiecdisterona (Gruntenko et al., 2010; Kanapadinchareveetil et al., 2019). Segundo Enan et al. (2001, 2005) os monoterpenos também são capazes de atuar sobre os receptores de octopamina em insetos.

Os indivíduos do grupo TB1 (5µl/mL) apresentaram índices individuais estatisticamente maiores quando comparados ao C1 ( $\text{Index}_{\text{ind}} = 21,20 \pm 5,54$ ). Ademais, os indivíduos do grupo TA3 (20µl/mL) também apresentaram índices individuais estatisticamente maiores quando comparados ao C1 ( $\text{Index}_{\text{ind}} = 20,20 \pm 5,45$ ). Reis et al. (2021) também observaram diferença significativa nos índices individuais de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostas a (5µl/mL) do óleo essencial de *Satureja montana* L ( $\text{Index}_{\text{ind}} = 23,00 \pm 4,95$ ). König et al. (2020), por sua vez, encontraram valores semelhantes na média dos índices individuais de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* expostas a (20µl/mL) de acetilcarvacrol ( $\text{Index}_{\text{ind}} = 23,40 \pm 4,10$ ). Embora, o presente estudo tenha encontrado alterações morfológicas que não foram relatadas pelos autores, as médias observadas nos INDEXind foram semelhantes. Assim, é possível sugerir que os isômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno são capazes de afetar a morfologia dos ovários de carrapatos *R. microplus* quando comparado a um óleo essencial e um produto semissintético.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui apresentados apontam que os isômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, apesar de possuírem modo de ação distinto, foram responsáveis por pronunciadas alterações no sistema reprodutor de fêmeas de *R. microplus* semi-ingurgitadas. A concentração de 10 $\mu$ l/mL de  $\alpha$ -pineno é suficiente para provocar efeitos reprodutivos, resultando em uma menor quantidade de produto utilizado. Assim, estes princípios ativos podem ser considerados compostos de grande potencialidade, sendo capazes interferir no processo de reprodução e, conseqüentemente, reduzir o número de indivíduos viáveis na geração seguinte. Todavia, novas pesquisas são necessárias para investigar os efeitos tóxicos desses compostos em ectoparasitos, bem como seus mecanismos de ação e suas estabilidades químicas nas aplicações em campo.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, R.Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. **Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play.** *Veterinary Parasitology*, v. 203, p. 6–20, 2014.
- ABDELGALEIL, S. A. M.; BADAWY, M. E. I.; MAHMOUD, N. F.; MAREI, A. E. S. **Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch).** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 156, p. 105-115, 2019.
- ADENUBI, O. T.; FASINA, F. O.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N.; NAIDOO, V. **Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review.** *South African Journal of Botany*, v. 105, p. 178–193, 2016.
- AJAYI, O. E.; APPEL, A. G.; FADAMIRO, H. Y. **Fumigation Toxicity of Essential Oil Monoterpenes to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).** *Journal of Insects*, 2014.
- ALVES, W. V.; LORENZETTI, E. R.; GONÇALVES, F. C. **Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *Rhipicephalus (boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável.** *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, v.2, n.2., p.14-25, 2012.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; CUNHA, R. C.; BARROS, J. **Protective action of *Tagetes minute* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini; 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial.** *Veterinary Parasitology*, v. 197, p. 341–345, 2013.
- ANKNEY, E.; SWOR, K.; SATYAL, P.; SETZER, W. N. **Essential Oil Compositions of *Pinus* Species (*P. contorta* Subsp. *contorta*, *P. ponderosa* var. *ponderosa*, and *P. flexilis*); Enantiomeric Distribution of Terpenoids in *Pinus* Species.** *Molecules*, v. 27, p. 5658, 2022.
- APEL, A.M.; RIBEIRO, V. S. L.; BORDIGNON, S. A. L.; HENRIQUES, A.T.; POSER, G. **Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** *Parasitology Research*, v. 105, p. 863–868, 2009.
- ARAFI, W. M.; ABOELHADID, S. M.; MOAWAD, A.; SHOKEIR, K. M; AHMED, O. **Toxicity, repellency and anti-cholinesterase activities of thymol-eucalyptus combinations against phenotypically resistant *Rhipicephalus annulatus* ticks.** *Experimental and Applied Acarology*, v. 81, p. 265–277, 2020.
- ARANTES, A. C. S.; RIBEIRO, J. C. S.; SOARES, D. S.; REIS, A. C.; CARDOSO, M. G.; REMEDIO, R. N. **Alpha- and beta-pinene isomers act differently to control *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** *Parasitology Research*, v. 123, n. 164, 2024.
- ASKIN, H.; YILDIZ, M.; AYAR, A. **Effects of Thymol and Carvacrol on Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*.** *Acta Physica Polonica A*, v. 132, n. 3, p. 720–722, 2017.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils – A review**. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p.446-475, 2008.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; CARDOS, F. F.; DIONELLO, N. J. L. **Aspectos da resistência de bovinos a carrapatos *Rhipicephalus (boophilus) microplus***. Archivos de Zootecnia, v. 6, p. 1-11, 2012.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. **Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases**, Parasitology Research, v. 115, p. 2545–2560, 2016.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. **Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 20, p. 89–96, 2012.

BORGES, R. S.; ORTIZ, B. L. S.; PEREIRA, A. C. M.; KEITA, H.; CARVALHO, J. C. T. **Affiliations expand *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, antiinflammatory activity, and mechanisms of action involved**. Journal of Ethnopharmacology, v. 229, p. 29–45, 2019.

CAMARGO-MATHIAS, M. I., PEREIRA, N. R. C., DA SILVA REIS, C., DE ALMEIDA, C. R., DOS SANTOS MENDES, D. R., DE ARAÚJO, G. B., POSTALI, L., FIGUEROA, T., FERREIRA, A. R. F., SANTOS, J. P., DE OLIVEIRA, P. R. **Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks**. Experimental and Applied Acarology, v. 72, p. 161–169, 2017.

CAMPOS, R. N. S.; BACCI, L.; ARAÚJO, A. P. A.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, G. R. A.; RONER, M.N.B. **Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. Archivos de Zootecnia, v. 61 (R), p. 67-78, 2012.

CAO, J.; PANG, X.; GUO, S.; WANG, Y.; GENG, Z.; SANG, Y.; GUO, P.; DUN, S. **Pinene-rich essential oils from *Haplophyllum dauricum* (L.) G. Don display anti-insect activity on two stored-product insects**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 140, p. 1–8, 2019.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J. R.; MENDES, M. C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M.; SCHUMAKER, T. T. **Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays**. Veterinary Parasitology, v. 173, p. 300–306, 2010.

CETIN, H.; CILEK, J. E.; OZ, E.; AYDIN, L.; DEVECI, O.; YANIKOGLU, A. **Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and  $\gamma$ - terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: ixodidae)**. Veterinary Parasitology, v. 170, p. 287–290, 2010.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W.M; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. **Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis**

**de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHUKS, F. N., ZHIJUN, Y., JINGZE, L. **Botanical acaricides induced morphophysiological changes of reproductive and salivary glands in tick: A mini-review.** Research in Veterinary Science, v. 132, p. 285–291, 2020.

CHOI, W. S.; PARK, B. S.; LEE, Y. H.; JANG, D. Y.; YOON, H. Y.; LEE, S. E. **Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults.** Crop Prot, v. 25, p. 398–401, 2006.

CLEMENTE, M. A.; GOMES, F. T.; SCOTTON, A. C. B.S.; GOLDNER, M.S.; REIS, E.S.; ALMEIDA, M. N. **Avaliação do Potencial de Plantas Medicinais no Controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae).** Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, p. 516-518, jul. 2007.

CONTRERAS, M.; ALBERDI, P.; FERNÁNDEZ DE MERA, I. G.; et al. **Vaccinomics Approach to the Identification of Candidate Protective Antigens for the Control of Tick Vector Infestations and *Anaplasma phagocytophilum* Infection.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, p. 1–15, 2017.

COSTA, F. B.; VASCONCELOS, P. S. S.; SILVA, A. M. M.; BRANDÃO, V. M.; SILVA, I. A.; TEIXEIRA, W. C.; GUREEA, R. M. S. N.; SANTOS, A.G. **Eficácia de fitoterápicos em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião oeste do Maranhão, Brasil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 17, supl. 1, p. 83-86, 2008.

CROTEAU.; KUTCHAN T, M.; LEWIS N. G. **Natural products (secondary metabolites).** Biochemistry & Molecular Biology of Plants, v. 24, p. 1250-1318, 2000.

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

DANTAS-TORRES, F.; FERNADES, M. T.; MUNOZ-LEAL, S.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys.** Ticks and Tick-Borne Disease, 2019.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; LASTRE, J. M. P.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. **A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle.** Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases, v. 8, n. 1, p. 23–28, 2007.

DIASS, K.; BRAHMI, F.; MOKHTARE, O.; ABDELLAOUI, S.; HAMMOUTI, B. **Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula officinalis* L.** Materials Today: Proceedings, v. 45, p. 7768–7773, 2021.

ELLSE, L.; WALL, R. **The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: A review.** Medical Veterinary Entomology, v. 28, p. 233–243, 2014.

ELMHALLI, F.; GARBOUI, S. S.; BORG-KARLSON, A. K.; MOZŪRAITIS, R.; BALDAUF, S. L.; GRANDI, G. **The repellency and toxicity effects of essential oils from the Libyan plants *salvadora persica* and *Rosmarinus officinalis* against nymphs of *Ixodes ricinus*.** *Experimental and Applied Acarology*, v. 77, p. 585–599, 2019.

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

ENAN, E. **Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from american cockroach and fruit fly in response to plant essential oils.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 59, n. 3, p. 161–171, 2005.

FERNÁNDEZ, C. M. M.; ROSA, M. F.; FERNÁNDEZ, A. C. A. M.; BORTOLUCCI, W. C.; FERREIRA, F. B. P.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; SIMÕES, M. R.; LOBO, V. S.; GAZIM, Z. C. **Essential oil and fractions isolated of Laurel to control adults and larvae of cattle ticks.** *Natural Product Research*. v. 34, n. 5, 731–735, 2020.

GHOSH, S.; TIWARI, S. S.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, K. A.; BANDYOPADHYAY, A.; JULLIET, S.; KUMAR, R.; RAWAT, A. K. S. **Identification of potential plant extracts for anti-tick activity against acaricide resistant cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).** *Experimental and Applied Acarology*, v. 66, n. 1, p. 159–171, 2015.

GONÇALVES, R. R. P.; PECONICK, A. P.; KONIG, I. F. M.; LUNGUINHO, A. S.; RIBEIRO, J. S.; GOMES, S. L.; SILVA, L.; THOMASI, S. S.; REMEDIO, R. N. **Acetylation of carvacrol raises its efficacy against engorged cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).** *Natural Product Research*, v. 35, p. 5475-5479, 2020.

GRUNTENKO, N. E.; WEN, D.; KARPOVA, E. K.; ADONYEVA, N. V.; LIU, Y.; HE, Q.; FADDEEVA, N. V.; FORMIN, A. S.; LI, S.; RAUSCHENBACH, Y. I. **Altered juvenile hormone metabolism, reproduction and stress response in *Drosophila* adults with genetic ablation of the corpus allatum cells.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, p. 891-897, 2010.

GUZMÁN, L.; MALLA, J. L.; RAMÍREZ, J.; GILARDONE, G.; CALVA, J.; HIDALGO, D.; VALAREZO, E.; REY-VALEIRÓN, C. **Acaricidal Efficacy of Plants from Ecuador, *Ambrosia peruviana* (Asteraceae) and *Lepechinia mutica* (Lamiaceae) against Larvae and Engorged Adult Females of the Common Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*.** *Veterinary Science*, v. 9, p. 23, 2022.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. **The Global Importance of Ticks.** *Parasitology*, v. 129, p.S3-S14, 2004.

JOONSEOK, O. H.; BOWLING, J. J.; CARROL, J. F.; DEMERCI, B.; BASER, K. H. C.; LEININGER, D. T.; BERNIER, U. R.; HAMANN, T. M. **Natural product studies of U.S. endangered plants: Volatile components of *Lindera melissifolia* (Lauraceae) repel mosquitoes and ticks.** *Phytochemistry*, v. 80, p. 28–36, 2012.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M.; MILOS, M. **In Vitro Acetylcholinesterase Inhibitory Properties of Thymol, Carvacrol and their Derivatives.** Thymoquinone and Thymohydroquinone. v. 261, p. 259–261, 2007.

KANAPADINCHAREVEETIL, S.; CHANDRASEKHAR, L.; PIOUS, A.; KARTHA, H.S.; RAVIDRAM, R.; JULIET, S.; NAIR, S.N.; AJITHKUMAR, K.G.; GHOSH, S. Molecular, histological and ultrastructural characterization of cytotoxic effects of amitraz on the ovaries of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Experimental Parasitology**, v. 204, p. 107732, 2019.

KAZIMÍROVÁ, M.; STIBRÁNIOVÁ, I. **Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v.3, n. 43, 2013.

KIM, D.; LEE, H. J.; JEON, Y. D.; KE, J.; KIM, H. J.; SHIN, H.; KANG, J.; LEE, B. S.; KIM, S. J.; PARK, S.; CHOI, B.; PARK, S. J.; CHOI, B.; UM, J.; HON, S. H. **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.

KIM, S. W., KANG, J. AND PARK, I. K. **Fumigant Toxicity of Apiaceae Essential Oils and Their Constituents against *Sitophilus oryzae* and Their Acetylcholinesterase Inhibitory Activity.** *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 16, p. 443-448, 2013.

KLAFKE, G. M.; CASTRO-JANER, E.; MENDES, M. C.; NAMINDOME, A.; SCHUMAKER, T. T. **Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** *Veterinary Parasitology*, v. 184, p. 212–220, 2012.

KLAFKE, G.; WERBST, A.; ANGNOL, B. D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; CANAL, L. H. L.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V. B.; SANTOS, J.; RECK, J. **Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil.** *Ticks Tick. Borne. Diseases*, v. 8, p. 73–80, 2017.

KUMAR, A. K. G.; FULAR, A.; CHIGURE, G.; SHARMA, A. K.; NAVAR, G.; SOUZA, F. F.; BECHARA, B. H.; GHOSH, S. **Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*.** *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 10, p. 1085–1095, 2019.

KONIG, I. F. M.; OLIVEIRA, M. V. S.; GONÇALVES, R. R. P.; PECONICK, A. P.; THOMASI, S. S.; ANHOLETO, L. A.; LIMA-DE-SOUZA, J. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; REMEDIO, R. N. **Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks (Acari: Ixodidae).** *Micron*, v. 129, p. 102780, 2020.

LANGSI, J. D.; NUKENINE, E. N.; OUMAROU, K. M.; MOKTAR, H.; FOKUNANG, C. M.; MBATA, N. **Evaluation of the Insecticidal Activities of  $\alpha$ -Pinene and 3-Carene on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae).** *Insects*, v. 11, p. 540, 2020.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ, I. S. J. **Perspectives for control of bovine tick.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, n. 1, p. 01-11, 2003.

LOVIS, L.; MENDES, M. C.; PERRET, J. L.; MARTINS, J. R.; BOUVIER, J.; BETSCHART, B., SAGER, H. **Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations.** *Veterinary Parasitology*, v. 191, p. 323–331, 2013.

LUNS, D. A. R.; MARTINS, R.; POMBAL, S.; RODILLA, J. M. L.; GITHAKA, N. W.; VAZ, I.S.J. **Effect of essential oils against acaricide-susceptible and acaricide-resistant *Rhipicephalus* ticks.** *Experimental and Applied Acarology*, v. 83, p. 597–608, 2021.

MARTINS, A. P.; SALDAGO, L. R.; GONÇALVES, M. J.; CUNHA, A. P; VILA, R.; CANIGUERAL, S. **Essentiol oil composition and Antimicrobial activity of *Santiria trimera*.** *Bark. Panta med*, v.69, p.77-79, 2003.

MARTINS, M.D.R.; ARANTES, S.; CANDEIAS, F.; TINOCO, M.T.; CRUZ-MORAIS, J. **Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 151, p. 485–492, 2014.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; ROSÁRIO-CRUZ, R.; CASTILLO-HERRERA, G.; FLORES-FERNANDEZ, JM.; ÁLVAREZ, AH.; LUGO-CERVANTES, E. **Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).** *Journal of Medical Entomology*, v. 48, p. 822–827, 2011.

MATOS, R. S.; DAEMON, E.; CAMARGOS-MATHIAS, M. I.; FRQUIM, K. C. S; SAMPIERI, B. R; REMEDIO, R. N.; ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L. **Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations.** *Parasitology Research*, v. 113, p. 4555–4565, 2014.

MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; NOGUEIRA, A. H. C.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D. P.; GABRIEL, F. H. L.; UENO, T. E. H.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M. **Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil.** *Veterinary Parasitology*, v. 178, p. 383–388, 2011.

MILLER, N. J.; RAINONE, E. E.; DYER, M. C.; GONZÁLEZ, M. L.; MATHER, T. N. **Tick Bite Protection With Permethrin-Treated Summer-Weight Clothing.** *Journal of Medical Entomology*, v. 48, n. 2, p. 327–333, 2011.

MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; SILVA, A. M. R.; MATURANO, R.; AMARAL, C. **Acaricidal and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1808) (ACARI: IXODIDAE).** *Parasitology Research*, v.105, p. 1093–1097, 2010.

MUKHERJEE, P. K.; KUMARB, V.; MALB, M.; HOUGHTON, P. J. **Acetylcholinesterase inhibitors from plants**. *Phytomedicine*, v. 14, n. 4, p. 289–300, 2007.

NAM, S.; CHUNG, C.; SEO, J.; RAH, S.; KIM, H.; JEONG, H. **The therapeutic efficacy of  $\alpha$ -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis**. *International Immunopharmacology*, v. 23, p. 273–282, 2014.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; NUNES, É. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)**. *Experimental Parasitology*, v. 110, p. 146–156, 2005.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., MORALES, M. A. M., CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells**. *Food Chemical Toxicology*, v. 47, p. 1255–1264, 2009.

OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks**. *Microscopy research and technique*, v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016.

PAJARO-CASTRO, N.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. **Neurotoxic Effects of Linalool and  $\alpha$ -Pinene on *Tribolium castaneum* Herbst**. *Molecules*, v. 22, p. 2052, 2017.

PALERMO, D.; GIUNTI, G.; LAUDANI, F.; PALMERI, V.; CAMPOLO, O. **Essential Oil-Based Nano-Biopesticides: Formulation and Bioactivity against the Confused Flour Beetle *Tribolium confusum***. *Sustainability*, v. 13, p. 9746, 2021.

PAMO, E. T.; TENDONKENG, F.; KANA, J. R.; PAYNE, V. K.; BOUKILA, B.; LEMOUFOUET, J. **A study of the acaricidal properties of an essential oil extracted from the leaves of *Ageratus houstonianum***. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 319–323, 2005.

PENHA, T., COSTA, A. C. C., LIMA, A. S., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BLANK, A. F., ABREU-SILVA, A. L., COSTA-JÚNIOR, L. M. **Effects of acaricidal essential oils from *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their main components on vitellogenesis in *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)**. *Veterinary Parasitology*, v. 299, p. 109584, 2021.

PEREIRA-JUNIOR, A. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; DAEMON, E. PECONICK, A. P. LIMA-SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R.; BRAGA, A. S.; LARA, L. J.; REMEDIO, R. N. **Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction**. *Natural Product Research*. p. 1–4, 2019.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Biologia, Controle e Resistência***. Editora Medicina Veterinária. São Paulo. Brasil. 169 pp, 2008.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. **First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides.** *Veterinary Parasitology*, v. 201, p. 128–136, 2014.

REIS, A. C.; KONIG, I. F. M.; MENDONÇA, G. H. A.; LUNGUINHO, A. S.; CARDOSO, M. G.; REMEDIO, R. N. **Toxic effect of *Callistemon viminalis* essential oil on the ovary of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae).** *Experimental and Applied Acarology*, v. 90, p. 99–117, 2023.

REY-VALEIRÓN, C.; GUZMÁN, L.; SAA, L.R.; LÓPEZ-VARGAS, J.; VALAREZO, E. **Acaricidal activity of essential oils of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch and *Schinus molle* L. on unengorged larvae of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).** *Journal Essential Oil Research*, v. 29, p. 344–350, 2017.

REY-VALEIRÓN, C.; PÉREZ, K.; GUZMÁN, L.; LÓPEZ-VARGAS, J.; VALAREZO, E. **Acaricidal effect of *Schinus molle* (Anacardiaceae) essential oil on unengorged larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).** *Experimental and Applied Acarology*, v. 76, p. 399–411, 2018.

REMEDIO, R. N., NUNES, P. H., ANHOLETO, L. A., OLIVEIRA, P. R., CAMARGO-MATHIAS, M. I. **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, p. 431–444, 2014b.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; PÉREZ-COGOLLO, L. C.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; OJEDA-CHI, M. M.; MARTINEZ, I. T.; MILLER, R. J.; LI, A.Y.; LÉON, A. P.; GUERRERO, F.; KLAFF, G. ***Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico.** *Brazil Journal Veterinary Parasitology*, v. 23, n. 2, p. 113–122, 2014a.

RODRIGUEZ-VIVAS, 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.** *Parasitology Research*, v. 117, p. 3–29, 2018.

ROMA, G. C., FURQUIM, K. C. S., BECHARA, G. H., MATHIAS, M. I. C. **Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells.** *Experimental and Applied Acarology*, v. 53, p. 287–299, 2011.

ROSADO-AGUILAR, J. A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M. E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ALZINA-LÓPEZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E. J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. **Plant products and secondary metabolites with acaricide activity Against ticks.** *Veterinary Parasitology*, v. 238, p. 66–76, 2017.

SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, É. T.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Morphological, histological, and ultrastructural studies**

**of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae).** *Veterinary Parasitology*, v. 129, p. 299–311, 2005.

SALEHI, B.; UPADHYAY, S.; ORHAN, I. E.; JUGRAN, A. K.; JAYAWEERA, S. L. D.; DIAS, D. A.; SHAROPOV, F.; TAHERI, Y.; MARTINS, N.; BAGHALPOUR, N.; CHO, W.C.; SHARIFI-RAD, J. **Therapeutic Potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Pinene: A Miracle Gift of Nature.** *Biomolecules*, v. 9, p. 738, 2019.

SAMPIERI, B. R., ARNOSTI, A., NUNES, P. H., FURQUIM, K. C. S., CHIERICE, G. O., CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*).** *Microscopy research and technique*, v. 75, p. 683–690, 2012.

SARDÁ, R. V. L.; AVANCINI, C.; GONCALVES, K.; TOIGO, E.; VON POSER, G. **Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*.** *Veterinary Parasitology*. 151, 351–354, 2008.

SECCHIS, M. V., VALE, L., RODRIGUES, D. C., PERINOTTO, W. M. S., MATOS, R. S., LOPES, T. R., BRITO, P. V. A., LOPES, W. D. Z., ARRUDA, W., MONTEIRO, C. M. O. **Effect of the formulation with fipronil and fluzuron on the reproductive biology and ovaries histopathology of *Rhipicephalus microplus* engorged females.** *Parasitology Research*, v. 121:839–849, 2022.

SENBILL, H.; HAZARIKA, L. K.; BARUAH, A.; HAZARIKA, L.K.; BARUAH, A.; BORAH, D.K.; BHATTACHARYYA, B.; RAHMAN, S. **Life cycle of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1888) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions.** *Systematic and Applied Acarology*, v. 23, n. 6, p. 1169–1179, 2018.

SHARIFIAN, I.; HASHEMI, S. M.; DARVISHZADEH, A. **“Fumigant toxicity of essential oil of Mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) against three major stored product beetles”.** *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 46, no. 4, pp. 445–450, 2013.

SHOWLER, A. T. **Botanically based repellent and insecticidal effects against horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae).** *Journal of Integrate Pest Management*, v. 8, p. 1 – 11, 2017.

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, n. 6, p. 6305–6316, 2012.

SILVA, T. P. P. DA; MOREIRA, J. C.; PERES, F. **Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 17, n. 2, p. 311–325, 2012.

SONENSHINE, D. E.; LANE, R. S.; NICHOLSON, W. L. **Ticks (Ixodida), In: Mullen, G. and L. Durden (Eds.).** *Medical Veterinary Entomology*. Academic Press. San Diego. USA, p. 517-558, 2002.

SONENSHINE, D. E.; ROE, M. R. **Biology of Ticks**. Oxford University Press, New York, 2014.

SOUSA, L. A. D.; ROCHA, T. L.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BORGES, L. M. F. **Ovary histology and quantification of hemolymph proteins of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* treated with *Melia azedarach***. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 339-345, 2013.

VESPERMANN, K. A.; PAULINO, B. N.; BARCELOS, M. C.; PESSOA, M. G.; PASTORE, G. M.; MOLINA, G. **Biotransformation of alpha- and beta-pinene into flavor compounds**. Applied Microbiology Biotechnology, v. 101, p. 1805–1817, 2017.

VITURELLE, R.; MATOS, C.; MELONI, J.; NUNES, M. J.; VAZ, I. S. J.; ROCHA, L.; LIONE, V.; CASTRO, H. C.; CHAGAS, E. F. **In Vitro 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.

XIAO, K. J.; WANG, W.; DAI, J.; ZHU, L. **Anti-inflammatory activity and Chemical composition of the essential oils from *Senecio flammeus***. Excli Journal, v. 13, p. 782–791, 2014.

XIAO-WEI, L.; ZHANG, J.; HAFEEZ, M.; HUANG, J.; ZHANG, J.; WANG, L.; LU, Y. **Rosmarinus officinalis L. (Lamiales: Lamiaceae), a Promising Repellent Plant for Thrips Management**. Journal of Economic Entomology, v. 114, n. 1, p. 131–141, 2021.

WANZALA, W.; HASSANALI, A.; MUKABANA, W.R.; TAKKEN, W. **Repellent Activities of Essential Oils of Some Plants Used Traditionally to Control the Brown Ear Tick, *Rhipicephalus appendiculatus***. Parasitology Research, p. 1–10, 2014.

WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J. L. M.; MACKENSTEDT, U. **Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores**. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 7, n. 5, p. 768–771, 2016.

ZARRAD, K.; LAARIF, A.; HAMOUDA, B.; CHAIEB, I.; JEMAA, M. **Anticholinesterase Potential of Monoterpenoids on the Whitefly *Bemisia tabaci* and Their Kinetic Studies**. Journal of Agricultural Science and Technology, v. 19, p. 643-652, 2017.