

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**DARCY RIBEIRO**

**DARCY ADRIANN REBONATO LUNS**

**ATIVIDADE LARVICIDA ASSOCIADA À INFLUÊNCIA AMBIENTAL E  
ACARICIDA EM CARRAPATOS DO GÊNERO *Rhipicephalus* spp.**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2019**

**DARCY ADRIANN REBONATO LUNS**

**ATIVIDADE LARVICIDA ASSOCIADA À INFLUÊNCIA AMBIENTAL E  
ACARICIDA EM CARRAPATOS DO GÊNERO *Rhipicephalus* spp.**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Doutor em Ciência Animal.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Logullo**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2019**

**DARCY ADRIANN REBONATO LUNS**

**ATIVIDADE LARVICIDA ASSOCIADA À INFLUÊNCIA AMBIENTAL E  
ACARICIDA EM CARRAPATOS DO GÊNERO *Rhipicephalus* spp.**

Aprovado em 10 de setembro de 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. José Bento Pereira Lima – Instituto Oswaldo Cruz

---

Dr. Leonardo Abreu - Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. José Roberto da Silva – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Carlos Logullo – Universidade Federal do Rio de Janeiro

(ORIENTADOR)

Dedico este trabalho a minha avó mãe Joelzita.

Seu amor e apoio incondicional foram muito importantes para minha formação.

Não há palavras para agradecer tudo que fez por mim mãe, te amo.

## **AGRADECIMENTOS**

Tenho muito a agradecer principalmente a minha avó Joelzita Monteiro Rebonato, pela sua ajuda, compreensão, ensinamentos, puxões de orelhas necessários, mas principalmente por todo carinho que dedicou para que eu chegasse até aqui.

Ao professor Carlos Logullo, por ter me recebido em seu laboratório, ter tido MUITA paciência comigo e nunca desistir de minha formação.

À minha família, Nathan, Rosemara, Darcimara, Joaquim, Flavio, Douglas, Fernanda, pelas alegrias, tristezas, ligações e todo apoio por esse caminho.

À aquelas que conheci nesses quatro anos de doutorado e que quero levar para toda vida, Camila, Marcelle, Beijiane e Jhenifer.

À minha amiga, colega de casa e revisora Bárbara que me incentivou muito sempre.

Aos colegas de laboratórios que sempre apoiaram com sugestões importantes para o desenvolvimento deste trabalho, Josias, Christiano, Joyce e Thayná.

Ao NUPEM\_UFRJ por ter me acolhido neste último ano de doutorado.

Ao governo brasileiro e seus órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ e INCT-EM, por fornecer o suporte financeiro durante meu doutorado.

A todos que em algum momento me ajudaram com palavras amigas, incentivo, boas risadas.

E por último, e mais importante, a Deus pela proteção e condução em momentos importantes.

Muito obrigado!!!

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”

John Ruskin

## RESUMO

Carrapatos são artrópodes ectoparasitos hematófagos de grande importância veterinária por causar danos aos animais. O controle de pesticidas culmina com alta toxicidade para o meio ambiente e o rápido aparecimento de linhagens de carrapatos mais resistentes ao produto devido à aplicação inadequada. Deste modo, essa tese tem como objetivo avaliar os efeitos carrapaticidas e larvicidas dos óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi* e seus principais sesquiterpenos em carrapatos das espécies *Rhipicephalus evertsi*, *appendiculatus*, *R. pulchelus* e *R. microplus*. A metodologia do teste de imersão de larvas de acordo com Shaw (1966) foi seguida com algumas modificações. Foram testados nas quatro espécies de larvas de carrapatos o óleo essencial da planta *Schinus mole* e seus componentes, alpha-phellandreno e sabineno; e o óleo essencial da planta *Bulnesia sarmientoi*, e seus dois principais componentes o guaiol e bulnesol. Para isso, foram utilizadas, em triplicata, 10 mg de larvas de 7 a 10 dias após a eclosão. O etanol foi utilizado como controle negativo dos testes, pela necessidade de solubilização e diluição dos óleos essenciais de *Schinus mole* e *Bulnesia sarmientoi* e de seus compostos. Como resultados principais observamos que o tratamento com maior atividade larvicida foi com o óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi*, na concentração de 10g do ingrediente ativo para cada 100 mL de metanol, levando a aproximadamente 100% de mortalidade das larvas. Dentre as espécies estudadas, o carrapato *R. evertsi* foi o mais tolerante aos tratamentos, apresentando as menores taxas de mortalidade. Já o *R. microplus* foi a espécie menos tolerante, com mortalidade próxima a 100% em todos os tratamentos em concentrações acima de 0,1%. Desta forma, possivelmente a baixa tolerância do carrapato *R. microplus* é devida à infestação artificial por várias gerações sem contato com qualquer tipo de seleção por fatores abióticos e tratamentos carrapaticidas convencionais. Todas as três espécies de carrapatos africanos testados apresentaram maior tolerância aos tratamentos em relação ao *R. microplus* encontrado no Brasil. O óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* causou as maiores mortalidades em todas as espécies de carrapatos testados e portanto apresenta potencial para futuros estudos afim de encontrar novas metodologias para o controle dessas espécies de carrapato.

## ABSTRACT

Ticks are hematophagous arthropod parasites of great economic importance causing damage to animals, directly and indirectly. Pesticide control culminates with high toxicity to the environment and the rapid appearance of product-resistant strains due to improper application. To evaluate the carrapaticidal and larvicidal effects of the essential oils of *Schinus molle* and *Bulnesia sarmientoi* and their major sesquiterpenes on *Rhipicephalus evertsi*, *R. appendiculatus*, *R. pulchellus* and *R. microplus* ticks. The methodology of the larval immersion test according to Shaw (1966) was followed with some modifications. Two essential oils (*Schinus mole* and *Bulnesia sarmientoi*) and their two major components were tested on four tick larvae species (7 to 10 days old / 10 mg x 3 replicates). Ethanol was used to solubilize the treatments and used as negative control. The treatment with greater larvicidal activity was the *Bulnesia sarmientoi* essential oil with almost 100% mortality of the larvae in the concentration of 10%. The most tolerant species to treatments was *R. evertsi* with the lowest mortality rates. The least tolerant species was the *R. microplus* with mortality close to 100% in all treatments at concentrations above 0.1%. Possibly the low tolerance of *R. microplus* is due to artificial infestation for several generations without contact with any type of selection by abiotic factors and conventional carrapaticidal treatments. All three species of African ticks tested showed higher tolerance to treatments compared to *R. microplus* found in Brazil. The *Bulnesia sarmientoi* essential oil caused the highest mortalities in all ticks tested and could be an alternative control of these arthropodes.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus microplus*. B) Distribuição mundial do carrapato bovino. As regiões marcadas apresentam alta ocorrência desses parasitas.

**Figura 2:** Ciclo de vida do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

**Figura 3:** Comportamento de fototropismo positivo das larvas de carrapato a procura do hospedeiro.

**Figura 4:** A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus evertsi*. B) Distribuição mundial do carrapato bovino. As regiões marcadas apresentam alta ocorrência desses parasitas (modificado de WALKER et al., 2014).

**Figura 5:** Ciclo de vida de um carrapato com dois hospedeiros (*R. evertsi*) (modificado de SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014).

**Figura 6:** A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*. B) Distribuição mundial do carrapato. As regiões marcadas apresentam alta ocorrência desses parasitas (modificado de WALKER et al., 2014).

**Figura 7:** Ciclo de vida de carrapatos com três hospedeiros (*R. appendiculatus* e *R. pulchellus*) (modificado de SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014).

**Figura 8:** A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus pulchellus*. Seta preta aponta para o “alloscutum” do carrapato. B) Distribuição mundial do carrapato. As regiões marcadas apresentam alta ocorrência desses parasitas (modificado de WALKER et al., 2014).

**Figura 9:** Vista dorsal do escudo do macho de *R. pulchellus* e suas variações de padrão de cores (modificado de CUNLIFFE, 1913).

**Figura 10:** Plantas usadas para extrair o óleo essencial e seus compostos bioativos. (A) Folhas e frutos da árvore *Schinus molle*, da família Anacardiaceae, utilizados para a extração do óleo essencial testado nas diferentes espécies do gênero *Rhipicephalus*; (B) Flor e folhas da árvore *Bulnesia sarmientoi*, pertencentes à família Zygophyllaceae. Utilizou-se madeira para extração de óleo essencial e posterior isolamento dos componentes mais abundantes: guaiol e bulnesol.

**Figura 11:** Local de coleta dos carrapatos utilizados nos testes de imersão: Foram coletados amostras de *R. microplus* com(marcador azul) e sem histórico de carrapaticida(marcador vermelho). Os carrapatos da espécie *R. evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus* foram coletados em Náirobi, Quênia (marcador verde).

**Figura 12:** Procedimento para realização da infestação artificial em coelhos: A) Raspagem dos pelos auriculares e fixação do pacote de malha; B) Pacote produzido de malha grossa para contenção das larvas e ninfas de carrapato.

**Figura 13:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. microplus* da linhagem POA determinado pelo teste de imersão larval. A mortalidade das larvas foi avaliada 24 horas após a imersão em seis diferentes soluções. (A) Óleo essencial de *Schinus molle* e dois de seus constituintes: (B) Alpha-phellandreno e (C) Sabineno; (D) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* e seus compostos majoritários: (E) Bulnesol e (F) Guaiol.

**Figura 14:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, na espécie *R. microplus* da linhagem POA. A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol.

**Figura 15:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. microplus* coletados em campo, determinado pelo teste de imersão larval. As larvas de *R. microplus* expostos aos fatores abióticos naturais possuem por gerações influência de acaricidas de contato como cipermitrina, clorpirifós, fenthion e Fipronil. A mortalidade das larvas foi comparada 24 horas após a imersão em seis diferentes soluções. (A) Óleo essencial de *Schinus molle* e dois de seus constituintes: (B) Alpha-phellandreno e (C) sabineno; (D) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* e seus compostos majoritários: (E) Bulnesol e (F) Guaiol.

**Figura 16:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. microplus* de campo (expostos a acaricidas e fatores abióticos). A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol.

**Figura 17:** Mapa de calor referente as duas amostras de *Rhipicephalus microplus* testadas no trabalho. A) Mapa de calor referente ao *R. microplus* POA (sem histórico carrapaticida); B) Mapa de calor referente ao *R. microplus* de campo com histórico de carrapaticida. Tons de verde indicam Baixa mortalidade de larvas enquanto que tons mais vermelhos indicam alta mortalidade de larvas no Teste de imersão larval. Sm: *Schinus molle*; Ap: Alfa-felandreno; Sn: Sabineno; Bs: *Bulnesia sarmientoi*; Bl: Bulnesol; Gl: guaiol

**Figura 18:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. evertsi*. Mortalidade observada após 24 horas do teste de imersão larval. A mortalidade das larvas foi analisada 24 horas após o teste de imersão para as seis diferentes soluções: (A) óleo essencial de *Schinus molle*, (B) alfa-felandreno, (C) sabineno, (D) *Bulnesia sarmientoi* óleo essencial, (E) bulnesol e (F) guaiol..

**Figura 19:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. evertsi*. A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol.

**Figura 20:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. appendiculatus*. Mortalidade observada após 24 horas do teste de imersão larval nas quatro concentrações, para as seis diferentes soluções: (A) óleo essencial de *Schinus molle*, (B) alfa-felandreno, (C) sabineno, (D) *Bulnesia sarmientoi* óleo essencial, (E) bulnesol e (F) guaiol.

**Figura 21:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. appendiculatus*; testadas com óleos essenciais e seus respectivos componentes isolados. A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol.

**Figura 22:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. pulchellus*. Mortalidade observada após 24 horas do teste de imersão larval nas quatro concentrações de cada tratamento: (A) óleo essencial de *Schinus molle*, (B) alfa-felandreno, (C) sabineno, (D) *Bulnesia sarmientoi* óleo essencial e (E) bulnesol

**Figura 23:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. pulchellus*. A) Perfil de mortalidade do óleo essencial de *Schinus molle* juntamente com o perfil de seus componentes alpha-phellandreno e sabineno. B) Perfil de mortalidade do óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* juntamente com o Bulnesol.

**Figura 24:** Mapa de calor referente as espécies africanas do gênero *Rhipicephalus* testadas no trabalho. Tons de verde indicam baixa mortalidade de larvas enquanto que tons mais vermelhos indicam alta mortalidade de larvas no Teste de imersão larval. Sm: *Schinus molle*; Ap: Alpha-phellandreno; Sn: Sabineno; Bs: *Bulnesia sarmientoi*; Bl: Bulnesol; Gl: Guaiol

# Sumário

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 16 |
| 2.1 O gênero <i>Rhipicephalus</i> .....  | 16 |
| 2.1.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> .....   | 16 |
| 2.1.2 <i>Rhipicephalus evertsi</i> .....   | 21 |
| 2.1.3 <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> .....  | 23 |
| 2.1.4 <i>Rhipicephalus pulchellus</i> .....  | 26 |
| 2.2 Impacto econômico do parasitismo de carrapatos do gênero<br><i>Rhipicephalus</i> ..... | 28 |
| 2.3 Métodos de controle do carrapato bovino .....  | 29 |
| 2.3.1 Acaricidas comerciais .....  | 29 |
| 2.3.2 Controles alternativos. ....   | 31 |
| 2.3.2.1 Compostos bioativos vegetais.....  | 32 |
| 2.3.2.2 Compostos fenólicos.....   | 33 |
| 2.3.2.3 Terpenos.....  | 35 |
| 2.3.2.4 Alcalóides .....   | 34 |
| 3. OBJETIVOS.....  | 37 |
| 3.1- Objetivo Geral .....  | 37 |
| 3.2- Objetivos Específicos.....  | 37 |
| 4. JUSTIFICATIVA.....  | 38 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 39 |
| 5.1. Obtenção dos óleos essenciais: .....  | 39 |
| 5.2. Diluição dos óleos essenciais e substâncias constituintes: .....                      | 41 |
| 5.3. Obtenção dos carrapatos: .....  | 42 |
| 5.4. Infestação artificial de carrapatos africanos .....                                   | 43 |
| 5.5. Manutenção dos carrapatos:.....   | 44 |
| 5.5. Teste de imersão larval (TIL):.....   | 45 |
| 5.6. Análise estatística:.....   | 45 |
| 6. RESULTADOS.....   | 47 |
| 6.1. Perfil de tolerância dos carrapatos da linhagem de Porto Alegre (POA):                | 47 |
| 6.2. Perfil de tolerância dos carrapatos da população de campo, Rio de<br>Janeiro:.....    | 49 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.3. Perfil de tolerância dos carrapatos do gênero <i>Rhipicephalus</i> coletados no continente africano: Ciclo de vida com mais de um hospedeiro podem estar relacionado com maior tolerância a xenobióticos. ....</b> | <b>53</b> |
| <b>7. DISCUSSÃO .....</b>  | <b>60</b> |
| <b>8. CONCLUSÕES .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>9. Referências .....</b>  | <b>60</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Carrapatos são taxonomicamente divididos em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae. A família de maior importância econômica no mundo é a Ixodidae, que é composta pelo maior número de espécies e é caracterizada pelo escudo esclerotizado e o gnátossoma localizado apicalmente (WALKER et al., 2014). Os carrapatos pertencentes dessa família se alimentam por longos períodos de tempo e são capazes de ingerir cerca de 100 vezes seu peso em sangue (ANDERSON, 2002; ESTRADA-PEÑA, 2003). Pertencente a família Ixodidae, o gênero *Rhipicephalus* é um dos mais difundidos no mundo, endêmico em regiões tropicais e semitropicais, sendo que tem sido estimado que 80% de todos os bovinos estão expostos a esses parasitas (MONDAL; SARMA; SARAVANAN, 2013).

A infestação de carrapatos geram vários efeitos deletérios em seu hospedeiro principalmente devido a perda de sangue, que gera redução do ganho de peso, produção de leite além de causar feridas na pele pelo aparelho bucal do parasita (SOUZA et al., 2012; SOUZA CONCEIÇÃO et al., 2017; FULAR et al., 2018). Em adição a esses efeitos causados pelo hábito hematófago, os carrapatos ainda podem transmitir organismos patogênicos de grande importância econômica. Somente os carrapatos *R. microplus*, *R. evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus* são capazes de transmitir: *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (protozoários causadores da babesiose), *Anaplasma marginale* (causador da anaplasmoze), *Theileria parva* (causador da Febre da Costa Leste), *Theileria taurotragi* (causador da teileriose), além de toxinas que causam a paralisia em ovelhas e bezerros (HEDIMBI et al., 2011; BARBOSA; PASSOS; AZEVEDO, 2013; WALKER et al., 2014; NENE et al., 2016; SOUZA CONCEIÇÃO et al., 2017; AMZATI et al., 2018).

O controle dos carrapatos tem sido realizado com carrapaticidas comerciais de contato. A utilização desses agentes químicos pode ter uma eficácia de até 100% no combate aos carrapatos se utilizado com um manejo adequado (CAMPOS JUNIOR; OLIVEIRA, 2005). O maior problema com o uso dos carrapaticidas comerciais é a má utilização desses pelos produtores rurais e seus impactos no meio ambiente. Este manejo incorreto pode ocasionar uma seleção

de carrapatos resistentes ao agente químico, que gerará descendentes também resistentes, diminuindo consideravelmente a eficácia do carrapaticida, além de gerar resíduos desses agentes no leite e na carne (MENDES et al., 2007).

Muitos autores relatam a resistência desses carrapatos a diferentes carrapaticidas devido ao uso abusivo e descontrolado dos produtores. Entre estes destacam-se os compostos arsenicais, substâncias cloradas, organofosforados, carbamatos e piretróides, que são os principais carrapaticidas encontrados no mercado (MERLINI; YAMAMURA, 1998). Deste modo, a ação carrapaticida está direcionada a novas fontes de controle, o que inclui métodos alternativos como a utilização de compostos bioativos vegetais, o controle biológico, desenvolvimento de vacinas, uso de animais geneticamente modificados além de rotação de pastagem com alternância de animais (LEAL, FREITAS; VAZ Jr., 2003).

Plantas naturalmente sintetizam metabólitos como método de proteção contra patógenos, predadores e pestes (PAVELA, 2015). Os mecanismos de ação dos compostos bioativos geralmente incluem ação repelente, inibição da alimentação dos predadores, inibição do desenvolvimento embrionário, interação com hormônios de crescimento ou até mesmo inibição da formação de quitina (BENELLI et al., 2016). O uso de compostos bioativos como alternativa no controle de artrópodes tem como principais vantagens comparados com os produtos sintéticos utilizados comercialmente: Biodegradação rápida de seus resíduos, baixa toxicidade a organismos não alvos, além de geralmente esses compostos agirem sinergicamente apresentando diferentes mecanismos de ação, dificultando assim o aparecimento de carrapatos resistentes (RATTAN, 2010; PAVELA, 2015; BENELLI; PAVELA, 2018).

Desta forma, estes extratos constituem uma alternativa ao programa ecológico de pragas e doenças uma vez que podem ser biodegradáveis, não deixar resíduos no ambiente e serem obtidos a partir de recursos naturais de fácil acesso pelos produtores rurais (ROEL, 2001). Levando em consideração a relação entre as espécies *R. microplus*, *R. evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus*, seu comportamento e fisiologia frente as condições climáticas, o estudo tem como objetivo avaliar a influência desses parâmetros no potencial larvicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Rhipicephalus*

Dentre os 14 gêneros de carrapatos encontrados na família Ixodidae, o gênero *Rhipicephalus* é o que apresenta 74 espécies identificadas. Destas, aproximadamente 63 espécies são encontradas exclusivamente na região afrotropical (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2005). Essas espécies apresentam como características em comum os palpos e o hipostômio mais curtos, a presença de olhos, festões, e nos machos a presença de uma placa adenal (WALKER et al., 2014). Presente, principalmente, no continente africano, o gênero *Rhipicephalus* apresenta sua variação de faixa de distribuição intimamente relacionada com as condições climáticas do ambiente, o que dificulta seu controle e aumenta seu poder vetorial de transmitir patógenos (OLWOCH et al., 2007).

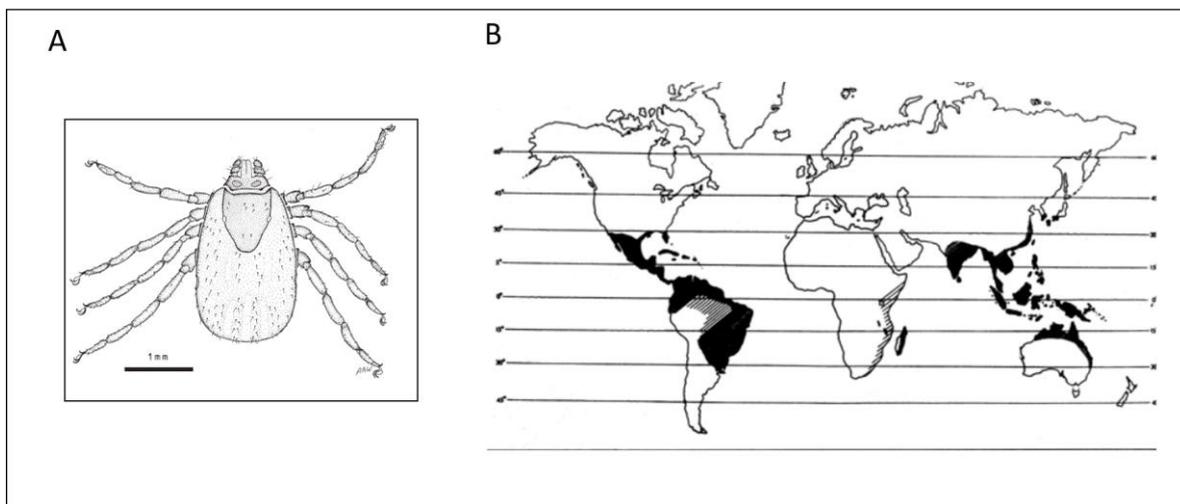
#### 2.1.1 *Rhipicephalus microplus*

Em diversas partes do mundo o carrapato *Rhipicephalus microplus* é conhecido apenas pelo nome “O carrapato bovino”. Este artrópode taxonomicamente pertence à família Ixodidae, Flechtmann (1990), por meio de chaves taxonômicas derivadas de caracteres morfológicos, o classificou como pertencente ao gênero *Boophilus*. No entanto, após análises moleculares e filogenéticas este foi reclassificado pertencendo agora ao gênero *Rhipicephalus*.

Nessa nova classificação *Boophilus* se tornou um subgênero do gênero *Rhipicephalus*, assim sendo o carrapato do boi passou a ser classificado como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL; BARKER 2003). Morfologicamente o carrapato bovino apresenta um conjunto de peças bucais quitinizadas que possibilita aderir ao seu hospedeiro, chamado de gnatossoma. Essa estrutura possui forma hexagonal com palpos curtos, achatados e rugosos formando uma estrutura única. Seu escudo dorsal não apresenta nenhum tipo de ornamentação, é monocromático (comumente marrom) e seus estigmas são arredondados ou ovais (FIGURA 1A). Os machos dessa espécie apresentam dois

pares de placas adanais desenvolvidas e geralmente com prolongamento caudal (MONTEIRO, 2011). Para distinção do sexo utiliza-se a visualização do escudo dorsal. Esse escudo, no macho, cobre toda a extensão do dorso, enquanto que na fêmea, cobre parcialmente permitindo a expansão do corpo desta após a hematofagia (URQUHART, 1990).

Esta espécie ocorre principalmente em regiões de pastagens arborizadas, geralmente utilizadas como pastagem de gado. A distribuição do carrapato bovino originou-se na Ásia e se expandiu principalmente em decorrência das expedições exploratórias. O grande fluxo de materiais e mercadorias levou a expansão do território desse carrapato para as regiões tropicais e semitropicais (FIGURA 1B) como América Central e do sul, África, Austrália e também México (CORDOVÉS, 1994).



**Figura 1:** A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus microplus*. B) Distribuição mundial do carrapato bovino. As regiões marcadas em preto no mapa apresentam alta ocorrência desses parasitas.

Áreas tropicais, como o Brasil, apresentam condições climáticas ótimas para o desenvolvimento desse carrapato em quase sua total extensão. Nestas condições, nas quais as temperaturas geralmente excedem 17 °C os carrapatos podem chegar a completar até 5 gerações em um único ano. Todavia, mudanças climáticas naturais como a seca podem limitar sua sobrevivência, acarretando desde uma diminuição de processos metabólicos para manter sua sobrevivência



ingurgitadas que estão no período pré-postura e postura (FERRETTO, 2013). Durante seu ciclo de vida os carrapatos passam pelos estágios de larva, hexápode, ninfa octópode e adultos. Ao saírem dos ovos as larvas apresentam fototropismo positivo, assim sobem pelas gramíneas esperando a passagem do hospedeiro no qual se aderem (Figura 3). Um grande número de larvas está geralmente presente na vegetação no final da primavera enquanto as gerações seguintes ocorrem no verão, outono e início do inverno (WALKER et al., 2014).

O local de fixação das larvas nos hospedeiros geralmente é em regiões de pele mais fina, alta humidade e temperaturas mais elevadas, como o aparelho auditivo, ventre e próximo as genitálias do animal. (DOUBE; KEMP, 1979; FERRETTO, 2013). Após se fixar no animal a larva começa a se alimentar com sangue ou restos de tecidos mortos próximo ao local de ancoragem (FURLONG; SALES, 2007).



**Figura 3:** Comportamento de fototropismo positivo das larvas de carrapato a procura do hospedeiro.

A primeira ecdise deste ocorre após a larva ingurgitar sangue de seu hospedeiro por alguns dias, tornando-se uma ninfa. Após a cutícula estar

enrijecida, as ninfas ingurgitam-se de sangue novamente e mudam novamente de cutícula, tornando-se um adulto. A cópula é realizada sobre o hospedeiro, na qual o macho transfere os espermatozoides para a abertura genital da fêmea por meio de seu aparelho bucal, podendo durar vários dias (MONTEIRO, 2011). As fêmeas após a cópula ingurgitam-se pela de sangue pela última vez aumentando seu tamanho cerca de 200 vezes, sendo chamada agora de teleógina (FERRETTO, 2013). A teleógina após completar a alimentação apresenta geotropismo positivo, desprendendo-se de seu hospedeiro e procurando abrigo no solo. Após o período de pré-ovoposição que dura de três a vinte dias, as fêmeas iniciam a ovipostura que é contínua e pode durar até dois meses dependendo da temperatura e umidade, sendo capazes de ovipositar cerca de 3000 ovos castanhos, esféricos e pequenos. Já os machos permanecem um período maior de tempo no hospedeiro, copulando com várias fêmeas (FURLONG; SALES, 2007; FURLONG 2005; MONTEIRO, 2011).

A postura termina com a morte da fêmea do carrapato. O período de incubação dos ovos pode variar de 17 a 60 dias devido a vulnerabilidade dos ovos em relação às condições de temperatura, já que em temperaturas mais baixas os estágios de desenvolvimentos costumam ser mais tardios (MONTEIRO, 2011). Os ovos depositados apresentam uma alta taxa de eclodibilidade (cerca de 85% em condições favoráveis) (AGNOLIN, 2012; CORDOVÉS, 1997), no entanto é a fase mais suscetível a dessecação, já que é o único estágio em que o carrapato é imóvel (WILKINSON, 1970).

Além das avarias causadas pela alimentação sanguínea, como anemia, perda de peso, perda na produção de leite, infecções, e feridas causadas pela fixação, o carrapato *R. microplus* é transmissor de diversos patógenos que causam doenças graves nos animais. Entre esses patógenos estão o protozoário *Babesia bovis* e *Babesia bigemia*, causadores da babesiose bovina (ADJOU MOUMOUNI et al., 2018). Essa infecção é adquirida pelos adultos e passada de forma transovariana para a próxima geração de larvas (WALKER et al., 2014). Este carrapato também é capaz de transmitir a bactéria *Anaplasma marginale* e *Borrelia theileri* que causam anaplasmoze e espiroquetose, respectivamente, nos bovinos (WALKER et al., 2014; NENE et al., 2016; ADJOU MOUMOUNI et al., 2018).

### 2.1.2 *Rhipicephalus evertsi*

O carrapato *R. evertsi* é conhecido popularmente como carrapato das pernas vermelhas é conhecido por ser vetor de diversos patógenos causadores de doenças em bois, cavalos e cabras (RECHAV; KNIGHT; NORVAL, 2006). Esta é a mais distinta espécie do gênero *Rhipicephalus*. É fácil distingui-lo das demais espécies por possuir olhos muito convexos e seu escudo dorsal coberto por muitas pontuações (Figura 4A) (WALKER et al., 2014). Mesmo confinado na região zoogeográfica Afrotropical na África Subsaariana, o carrapato *R. evertsi* é o mais difundido de todas as espécies de *Rhipicephalus* que ocorre na África (Figura 4B). Este pode ser encontrado em regiões do deserto, estepes, savana, clima temperado e até mesmo em florestas tropicais.

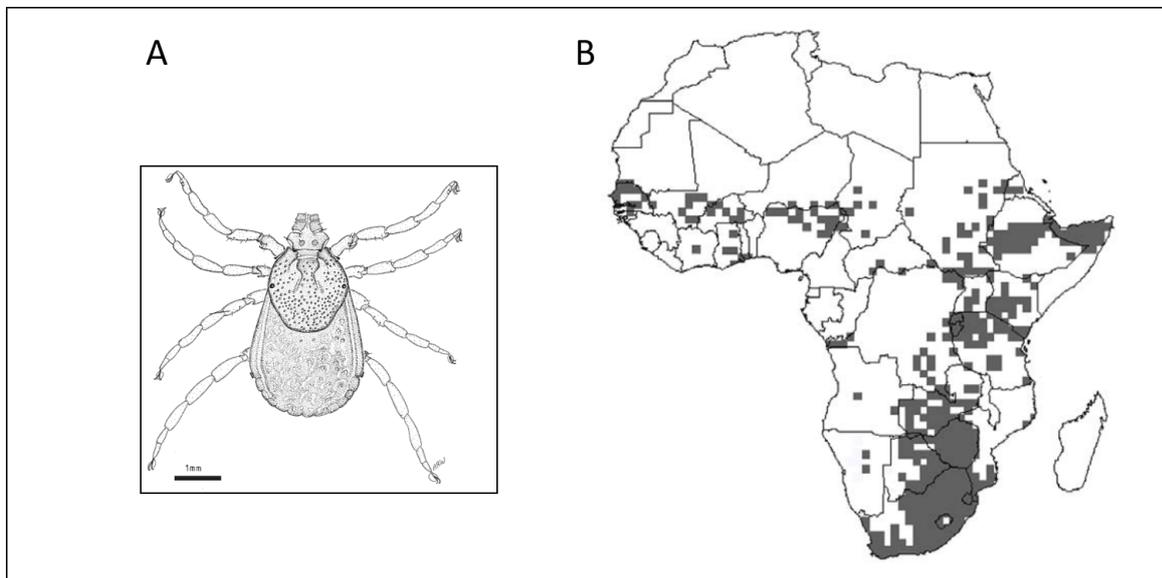


Figura 4: A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus evertsi*. B) Distribuição mundial do carrapato bovino. As regiões marcadas apresentam alta ocorrência desses parasitas (modificado de WALKER et al., 2014).

O *R. evertsi* é um carrapato que necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida (Figura 5). Neste ciclo de vida geralmente a larva se alimenta e sofre ecdise para ninfa sob o hospedeiro. Após o ingurgitamento da ninfa pela alimentação sanguínea esta cai do hospedeiro e sofre ecdise no meio ambiente para um carrapato adulto (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014). No

caso desta espécie em particular, após cair do hospedeiro a fêmea ingurgitada é capaz de ovipor de 5 a 7 mil ovos e morre em seguida (RECHAV; KNIGHT; NORVAL, 2006).

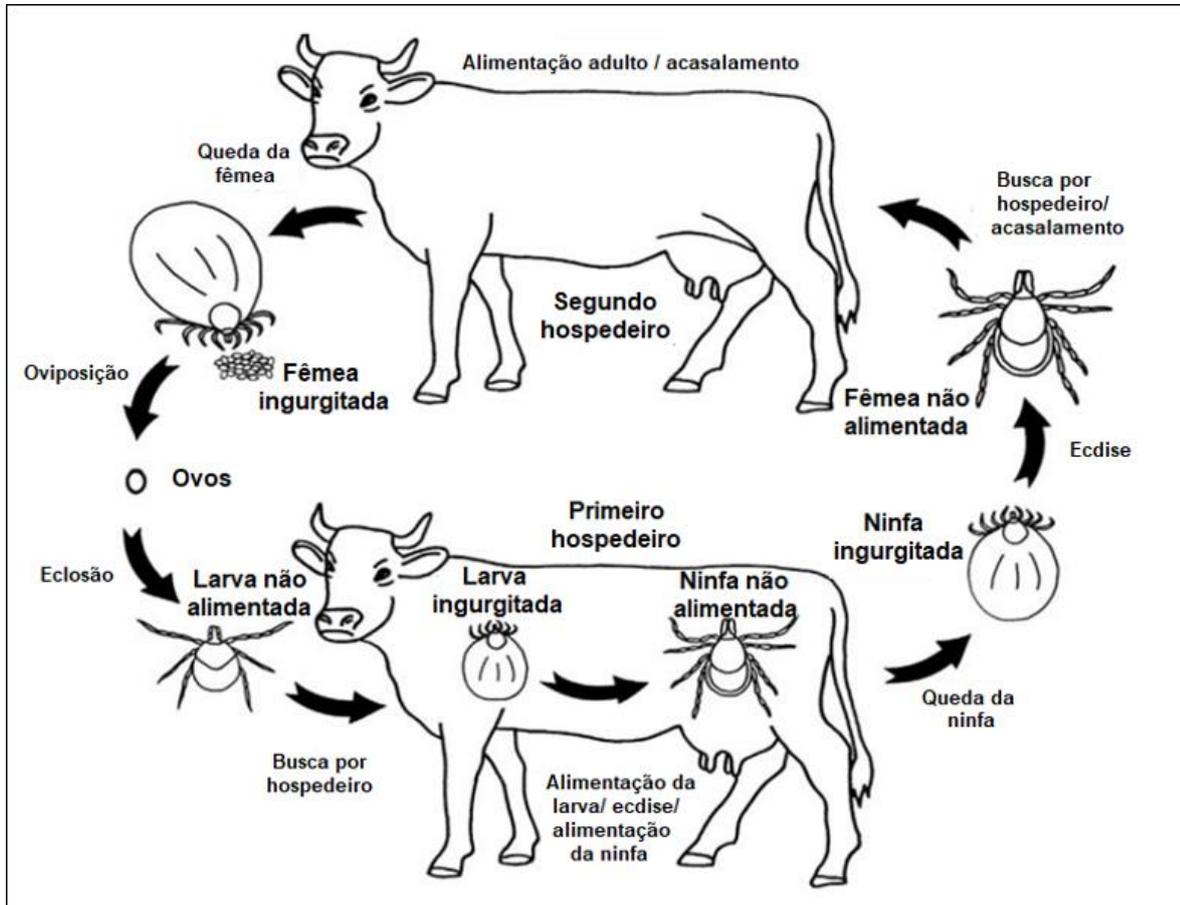


Figura 5: Ciclo de vida de um carrapato com dois hospedeiros (*R. evertsi*) (modificado de SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014).

A larva, assim como em *R. microplus*, sobe na vegetação a procura de um hospedeiro sofrendo ecdise uma semana após o encontro. As ninfas se alimentam por mais uma semana e se desprende do seu primeiro hospedeiro, sofrendo a ecdise no solo para a fase adulta. O adulto procura seu hospedeiro final no qual se alimenta por cerca de 6 a 12 dias, reiniciando o ciclo. Mais de um ciclo de vida pode ser completado durante um ano. Esses carrapatos são mais ativos durante o verão, mas estão presentes durante todo ano em regiões mais quentes (WALKER et al., 2014).

O *R. evertsi* também é um vetor de agentes patogênicos que causam grande prejuízo na pecuária principalmente africana. Ele é transmissor do

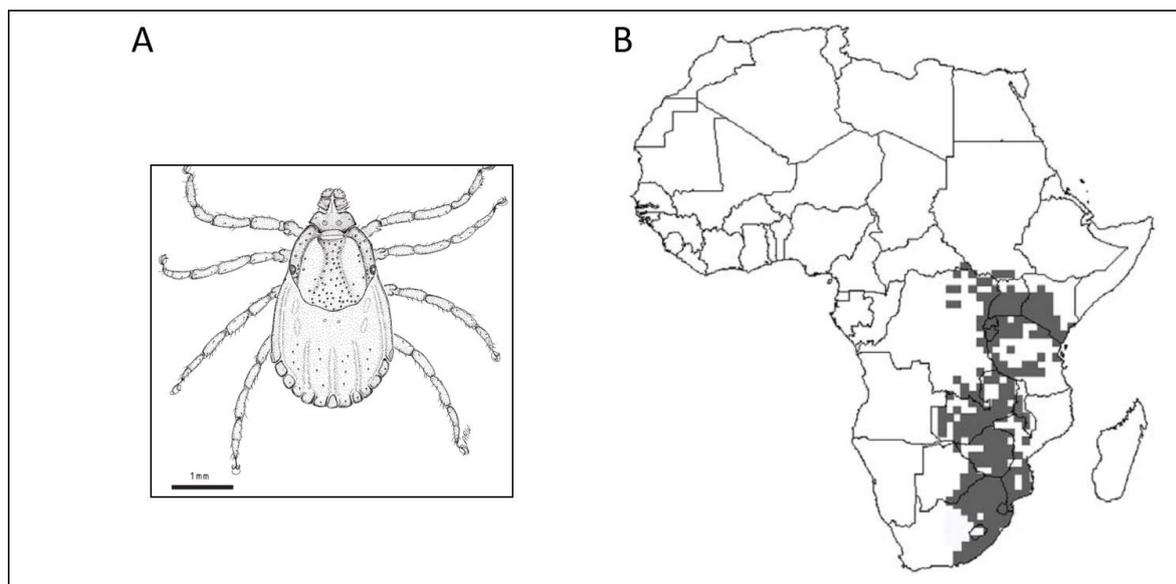
protozoário *Babesia caballi* e *Theileria equi* para cavalos, ambos causando a piroplasmose equina. Pode transmitir também a bactéria *Anaplasma marginale* para o gado causando a anaplasmosse bovina. A saliva da fêmea contém toxinas que causam paralisia principalmente em cordeiros e ovelhas (HAMEL; GOTHE, 1978; GOTHE et al., 1986; RECHAV; KNIGHT; NORVAL, 2006; HEDIMBI et al., 2011; WALKER et al., 2014).

### **2.1.3 *Rhipicephalus appendiculatus***

O carrapato *R. appendiculatus* é conhecido popularmente como carrapato marrom de orelha. Seu nome se deve ao fato de sua cor predominante e de se fixar preferencialmente nas orelhas dos bovinos para se alimentar. Esse carrapato tem se tornado alvo de estudo principalmente pela sua relação com a febre da Costa Leste bovina (OLDS; MASON; SCOLES, 2018).

*R. appendiculatus*, *R. punctatus*, *R. pravus*, *R. zambeziensis* e *R. duttoni* são espécies do mesmo gênero com bastante semelhanças. Todas essas espécies em seu exemplar masculino possuem um esporão anterior proeminente na coxa, observado latero-dorsalmente (Figura 6A). Todavia o macho de *R. appendiculatus* possui campos cervicais mais amplos com margem mais acentuada, olhos ligeiramente convexos, sulcos posteriores não estão profundamente afundados e possui menos pontuações no escudo (WALKER et al., 2014).

Esses carrapatos são característicos de savana e regiões de clima temperado. O mapa da Figura 6B foi derivado de registros históricos e sua atual distribuição pode diferir daquela indicada, principalmente devido ao intenso e prolongado tratamento contra essa espécie. São encontrados focos desse carrapato em diversas regiões africanas como Zâmbia, África do Sul, República democrática do Congo, Mpumalanga e Vredefort. De áreas costeiras quentes a planaltos frescos das terras altas, desde que o clima seja úmido (PERRY et al., 1991; WALKER et al., 2014).



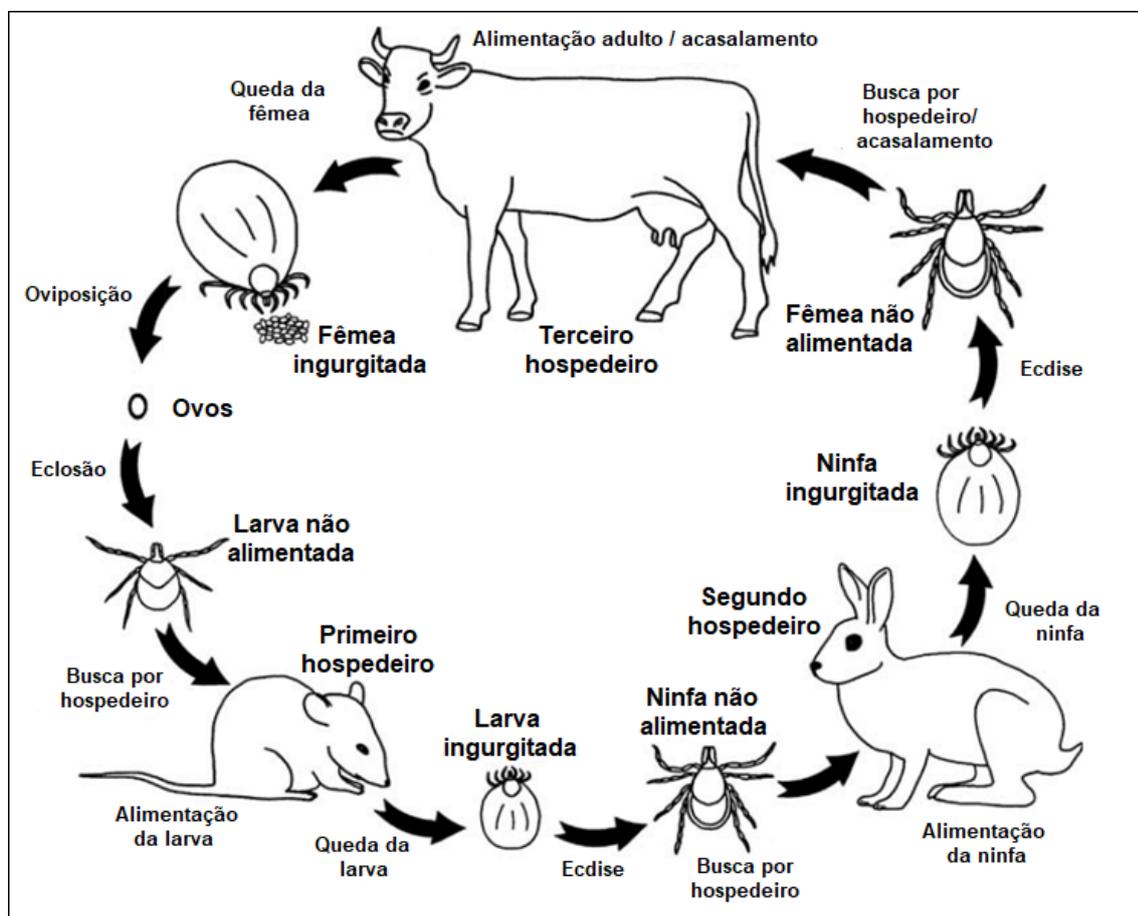
**Figura 6:** A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*. B) Distribuição mundial do carrapato. As regiões marcadas apresentam alta ocorrência desses parasitas (modificado de WALKER et al., 2014).

Os carrapatos que necessitam de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida são considerados ancestrais dos carrapatos Ixodídeos. Isso se deve indiretamente ao fato das espécies estudadas de Ixodios que possuem tal ciclo estão na base da linhagem dos carrapatos, como o gênero *Haemaphysalis* e *Amblyomma* enquanto que carrapatos com ciclo de vida com dois hospedeiros ou um apareceram independentemente em vários gêneros somente no gênero *Rhipicephalus*. É importante ressaltar que carrapatos que necessitam de um ou dois hospedeiros possuem maiores chances de completar seu ciclo de vida pois buscam por hospedeiros por menos tempo, diminuindo a chance de morte por falta de alimentação (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014).

Outro importante fator que pode ter contribuído para a diminuição da necessidade de mais de um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida são as adaptações do carrapato em resposta às condições climáticas. Carrapatos que necessitam de apenas um hospedeiro, como por exemplo o *Hyalomma scupense* foram adaptados para hibernar no corpo de seu hospedeiro (DREW; SAMUEL, 1989). *Dermacentor albipictus* é outro exemplo de espécie adaptada às condições climáticas severas. No inverno suas larvas e ninfas são capazes de se

desenvolver abaixo do pelo de seus hospedeiros, geralmente alces ou outros grandes ungulados (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014).

O carrapato *R. appendiculatus* possui um ciclo de vida dependente de três hospedeiros assim como a maioria dos carrapatos Ixodídios (Figura 7). Neste ciclo de vida a larva se desprende do hospedeiro após se alimentar e sofre ecdise para o estágio de ninfa. Em seguida, a ninfa necessita de outro hospedeiro (podendo ser de mesma espécie ou não que o primeiro), se fixa, se alimenta, se desprende e sofre ecdise para a fase adulta. Os adultos então procuram seu último hospedeiro, acasalam, se alimentam e se desprendem novamente para a ovipostura, reiniciando o ciclo. Todos os carrapatos Ixodídeos possuem um único ciclo gonotrófico, ou seja, a fêmea após acasalar, se alimentar e ovipor seus ovos continuamente durante algumas semanas morre de exaustão (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014; WALKER et al., 2014).



**Figura 7:** Ciclo de vida de carrapatos com três hospedeiros (*R. appendiculatus* e *R. pulchellus*) (modificado de SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014).

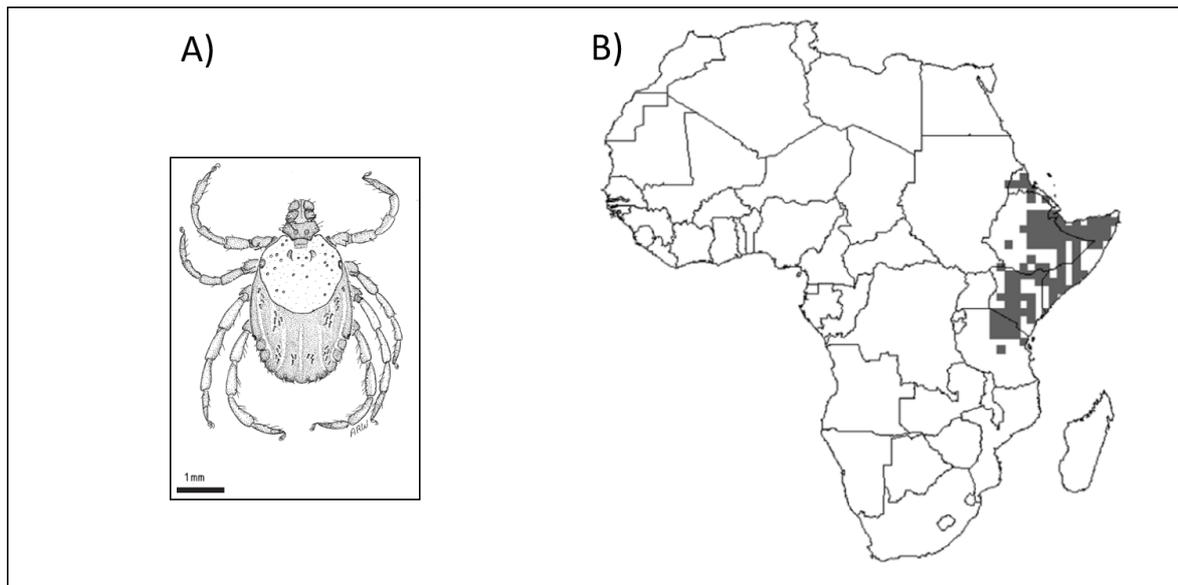
O carrapato marrom possui os ciclos de alimentação de todos os estágios entre 4 a 7 dias. A fêmea ingurgitada dessa espécie é capaz de colocar cerca de 5000 ovos as larvas nascem entre 20 a 90 dias. Em condições climáticas favoráveis esse ciclo pode durar apenas três meses, porém em condições não favoráveis esse ciclo pode durar até um ano. Esse padrão sazonal em decorrência do clima é regulado pelos adultos não alimentados, que são capazes de entrar em diapausa (WALKER et al., 2014).

O carrapato *R. appendiculatus* é um vetor de grande importância econômica em todo mundo. Isso se deve principalmente por este carrapato ser o vetor do protozoário *Theileria parva*, causador da Febre da Costa Leste, considerada a doença transmitida por carrapato mais significativa e que causa maior prejuízo no continente africano (WANZALA et al., 2018). Cerca de 28 milhões de bovinos na região estão em risco de contrair o protozoário e cerca de 1 milhão de animais são mortos por ano em decorrência da doença (OLDS ; ASON; SCOLES, 2018). Além disso, o carrapato marrom é vetor da *Theileria taurotragi*, causador da teileriose bovina, da bactéria *Anaplasma bovis* causadora da erliquiose bovina, além do vírus causador da doença da ovelha de Nairobi e a *Rickettsia conorii* (WALKER et al., 2014).

#### **2.1.4 *Rhipicephalus pulchellus***

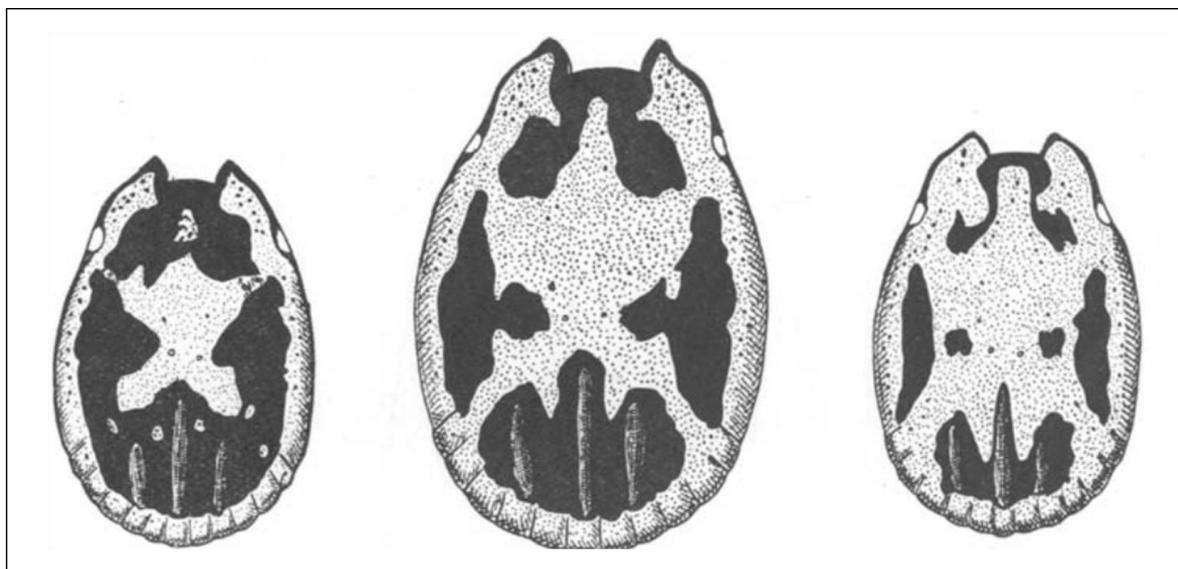
O carrapato *R. microplus* é conhecido popularmente pelo nome de carrapato de zebra, especialmente pelo fato de parasitar de preferência zebuínos. É bem conhecido nas regiões onde habita pelo fato de apresentar uma baixa especificidade de hospedeiros, podendo parasitar até mesmo humanos (WALKER et al., 2014; TAN et al., 2015).

A fêmea desse carrapato é comumente confundida com a da espécie *R. humeralis* devido a semelhança morfológica, porém apresenta como característica pontuações em menor intensidade no escudo e cerdas brancas mais distintas no alloscutum (Figura 8A).



**Figura 8:** A) Vista dorsal da fêmea do carrapato *Rhipicephalus pulchellus*. Seta preta aponta para o “alloscutum” do carrapato. B) Distribuição mundial do carrapato. As regiões marcadas apresentam alta ocorrência desses parasitas (modificado de WALKER et al., 2014).

Geralmente as fêmeas são mais facilmente identificadas pela presença do macho, bem característico, preso em sua região frontal (WALKER et al., 2014) Os machos apresentam características bem distintas para sua classificação. Em seu escudo há a presença de um padrão de listras de esmalte branco sobre um fundo marrom escuro (Figura 9)(CUNLIFFE, 1913).



**Figura 9:** Vista dorsal do escudo do macho de *R. pulchellus* e suas variações de padrão de cores (modificado de CUNLIFFE, 1913).

O *R. pulchellus* é típico de regiões de savana, desérticas, e de estepes. Este é um dos carrapatos mais comumente encontrados nas regiões do Vale di Rift, nordeste da África, do norte ao nordeste da Tanzânia e também por toda região da Eritrea (Figura 8B) (BROWNING, 1976; WALKER et al., 2014).

## **2.2 Impacto econômico do parasitismo por carrapatos do gênero *Rhipicephalus***

Os danos causados na pecuária pelos carrapatos do gênero *Rhipicephalus* podem ser categorizados em danos de ação direta e de ação indireta. A espoliação sanguínea se enquadra nos danos de ação direta já que gera um baixo rendimento produtivo decorrente de perda de peso, desvalorização do couro e predisposição a instalação de miíases. Além disso, o hábito hematófago do carrapato gera consequências como anemia, prurido e irritação, ocasionando estresse no animal. Entre os danos indiretos encontram-se os gastos referentes a mão-de-obra para o combate, além das despesas com compras de equipamentos e aquisição de carrapaticidas (FERRETO, 2013; GOMES, 2000).

Todas essas avarias causadas nos animais somado com os custos para obtenção de métodos de controle geram um grande prejuízo aos países que dependem deste tipo de economia. Somente no Brasil impacto econômico gerado apenas por uma única espécie do gênero *Rhipicephalus* devido a esses fatores ultrapassou 2 bilhões de dólares em 2002 (GRISI, et al., 2002). Dez anos após essa estimativa os prejuízos ultrapassaram os 3 bilhões de dólares (GRISI, et al. 2014). Além da pecuária de corte, há também prejuízos significativos na pecuária leiteira. A anemia causada pela perda de sangue afeta principalmente a produção de leite dos animais causando prejuízos ultrapassam 900 milhões de dólares (RODRIGUES e LEITE, 2013).

## **2.3 Métodos de controle do carrapato bovino**

O controle dos carrapatos do gênero *Rhipicephalus* apresenta uma grande complexidade devido a inúmeras variáveis, entre elas a raça dos bovinos de produção, o manejo utilizado, época do ano e também as condições climáticas da região (DONIZETE et al., 2010). Estudos demonstram que para a correta implementação de um tratamento para o controle de carrapatos é necessário levar em consideração as características genéticas dos bovinos, os diferentes tipos de manejo de cada região, além das condições climáticas (FRAGA et al., 2003).

### **2.3.1 Acaricidas comerciais**

O controle de carrapatos pelo mundo atualmente está baseado na aplicação de produtos químicos e normalmente é realizado de forma incorreta, com uso indiscriminado e em épocas de aplicação inadequadas. O ideal é o uso de práticas que promovam o controle estratégico do carrapato na propriedade, que envolve a forma responsável de aplicação do produto, no menor número de vezes possível e na época desfavorável ao carrapato (FURLONG, 2005).

O tratamento com acaricidas químicos culminam em uma elevada toxicidade para o meio ambiente, podendo causar diversos problemas como o desequilíbrio ecológico nas populações tanto de carrapatos como de predadores (TORRES, 2010). Outro entrave são os resíduos que os carrapaticidas deixam na carne e leite dos bovinos, pois eles podem representar um risco potencial para o consumidor. Países como a China, EUA e outros da União Européia já definiram os limites máximos de resíduos em leite e em tecidos comestíveis (WANG et al., 2011).

No controle com produtos comerciais são usados produtos à base de organofosforados, piretróides, amidinas e avermectinas geralmente na forma de pulverização ou pour-on. Entretanto, devido ao longo período de utilização ou forma incorreta de aplicação, o carrapato tem-se mostrado resistente a tratamentos químicos (COELHO et al., 2013; MARQUES; ARANTES; SILVA, 1995). A resistência a esses produtos vem aumentando tanto em número como em amplitude de princípios ativos, como piretróides e amidinas, recomendando a

realização de controle estratégico e uso racional de antiparasitários e com monitoramento constante da eficácia do acaricida usado na cepa em questão (CAMILLO et al., 2009).

A resistência parasitária é um fenômeno pelo qual uma droga não consegue manter a mesma eficácia contra os parasitos, se utilizada nas mesmas condições, após um determinado período de tempo (CONDER; CAMPBELL, 1995). A resistência ocorre naturalmente em populações de artrópodes como mecanismo de defesa e tem causado grandes problemas a vários países produtores de gado leiteiro e de corte (VIDOTTO, 2002). De acordo com Pires (2006) o desenvolvimento de resistência ocorre por meio de seleção natural e não por mudanças genéticas e essa seleção favorece o aparecimento de carrapatos resistentes a doses tóxicas letais para a uma população normal da mesma espécie, não podendo ser induzida pela exposição aos carrapaticidas comerciais em baixa concentração.

Diversos estudos registram populações de carrapatos que se tornaram resistentes à maioria dos carrapaticidas comerciais encontrados no mercado. Farias (1999), Pruet; Pound (2006) e Rodriguez-Vivas et al. (2006) relataram casos de resistência em carrapaticidas comerciais a base de organofosforados e piretróides sintéticos, enquanto que Furlong (1999) e Farias et al. (2008) encontraram relatos de resistência para o amitraz. A resistência do carrapato bovino ao amitraz surgiu após quatro a dez anos de uso em diversas partes do mundo (FRAGOSO et al., 2003), porém este ainda possui um alto poder carrapaticida, podendo ser utilizado ainda desde que com parcimônia (MARIA, 2008).

Para avaliar a situação da resistência carrapaticida Furlong et al. (2006) desenvolveram um ensaio de sensibilidade carrapaticida. O teste foi desenvolvido para escolher qual o produto comercial mais eficiente para a população de carrapatos a tratar, e com isso evitar a sua troca constante e indiscriminada. A determinação do carrapaticida mais eficiente para a população de carrapatos de cada propriedade deve ser realizada baseada no resultado do teste, garantindo o sucesso da eficácia no teste a campo e retardando o processo de resistência.

### 2.3.2 Controles alternativos.

Algumas medidas de manejo podem ser usadas para auxiliar o controle do carrapato, como a aplicação de vassoura de fogo nas instalações dos animais, manter os pastos limpos e roçados para que a incidência solar promova morte de larvas no solo (FURLONG, 2005) e até o cultivo de algumas forrageiras que podem impedir as larvas a terem contato com o animal como a *Melinis minutiflora* (capim gordura) e a *Brachiaria brizantha* (braquiarião) (BARROS; EVANS, 1989).

Diversos grupos de pesquisa têm se empenhado em encontrar alternativas para o controle desse carrapato. Uma das alternativas é a produção de vacinas e uma a base da proteína do intestino do carrapato, em conjunto com uma saponina, que já alcançou eficácia acima de 80% em várias raças de bovinos testados experimentalmente, reduzindo o número e peso de fêmeas adultas, redução do peso médio dos ovos e diminuição da fertilidade dos carrapatos. Assim, os estudos com imunógenos são promissores na elaboração de vacinas que protejam os animais contra a infestação. Outra alternativa é o uso do controle biológico, com a utilização de micro-organismos, principalmente fungos e bactérias, citados por Zhioua et al. (1999) como potenciais controladores de carrapatos. Algumas espécies de fungos já foram isoladas de todos os estágios de desenvolvimento de carrapatos, inclusive dos ovos.

Outra linha de pesquisa em expansão no controle dos carrapatos é a utilização de óleos essenciais e extratos vegetais oriundos de plantas. Ao longo de todo processo evolutivo as plantas começaram a desenvolver mecanismos eficazes de defesa através da produção de constituintes micromoleculares por meio de rotas sintéticas não essenciais. Esses metabólitos são substâncias que influenciam nas relações ecológicas entre o meio ambiente e o vegetal, conferindo vantagens adaptativas, tais como, proteção contra herbivoria, atração de polinizadores, além de defesa contra microrganismos patogênicos (SANTOS, 2013).

A busca por métodos para o controle do carrapato por meio de pesquisas com extratos vegetais tem aumentado consideravelmente no intuito de diminuir os problemas de resistência causados pelos carrapaticidas comerciais, minimizar a poluição ambiental causada pelo acúmulo dos pesticidas no solo e água e mitigar a contaminação de produtos de origem animal como carne e leite (BROGLIO-

MICHELETTI et al., 2009) (BROGLIO et al., 2014; SOUZA et al. 2008; VOLPATO et al., 2015). Extratos vegetais podem minimizar o surgimento da resistência dos carrapatos por serem compostos de vários princípios ativos diferentes associados entre si e impedir o acúmulo no meio ambiente uma vez que, em sua maioria, são rapidamente degradáveis. Além disso, os extratos vegetais apresentam um baixo custo de produção e são de fácil acesso para os produtores rurais (ROEL, 2001).

Devido esta demanda existente por métodos alternativos para o controle do carrapato bovino, diversas espécies vegetais têm sido testadas para avaliar a sua eficiência como um carrapaticida, entre elas: *Azadirachta indica* (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2009; BROGLIO-MICHELETTI, 2010; IANNACONE; LAMAS, 2002; SANTOS, 2012); *Carapa guianensis* (FARIAS, 2007); *Melinis minutiflora* (PRATES, 1993); *Ocimum basilicum* (SANTOS; VOGEL; MONTEIRO, 2012); eucalipto (CHAGAS et al., 2002; OLIVO et. al., 2013); *Nicotiana tabacum* (OLIVO et al., 2009); *Allium sativum* (ALVARENGA, 2004; MASSARIOL, 2009); *Melia azedarach* (BORGES, et al., 2005; BORGES, da SILVA; das NEVES, 1994; SANTOS et al. 2006; SOUZA et al., 2008); *Chenopodium ambrosioides* (ALMANÇA et al. 2013; FARIA et al. 2010; SANTOS et al. 2006; SANTOS et al., 2013); família Meliaceae (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2009); *Allium sativum* (ALVARENGA, 2004; BIANCHIN, 1999; MASSARIOL 2009); *Nicotiana L.* (MEINERZ et al. 2007; OLIVO et al. 2009).

## **2.4 Compostos bioativos vegetais**

Os compostos bioativos gerados pelas plantas apresentam alto grau de toxicidade às pragas da agropecuária, sendo muito utilizados como pesticidas ou modelos para a síntese de agroquímicos (CHAGAS et al., 2002). Entende-se como composto bioativo os metabólitos oriundos do metabolismo vegetal que origina compostos que não possuem uma distribuição universal já que não são necessários para todos os tipos de plantas. Esses metabólitos exercem um importante papel na interação planta-ambiente, agindo contra a herbivoria, ataque de patógenos, atração de agentes polinizadores, competição intra- e interespecífica entre as plantas, como dispersores de sementes e de microrganismos simbiotes (PERES, 2004).

De acordo com Rhodes (1994) o surgimento dos metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado pelas necessidades ecológicas e pelas variadas possibilidades biossintéticas, assim a sua síntese com funções principalmente de defesa e atração tem sido conduzida pela co-evolução das plantas com insetos, microrganismos e mamíferos.

Esses metabólitos têm recebido atenção em diversas áreas científicas, pela sua enorme diversidade de funções, sendo de grande importância na produção de fármacos, cosméticos, alimentos e principalmente na produção de agroquímicos (BOLZANI, et al., 2013). Os compostos bioativos podem ser divididos em três grandes grupos: os compostos fenólicos, os alcaloides e os terpenos. Sendo o grupo dos terpenos o principal componente dos óleos essenciais (OLIVEIRA, 2012).

#### **2.4.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos fazem parte de uma classe de compostos químicos com grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem no mínimo um anel aromático em que um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 1999). São derivados biossinteticamente do ácido chiquímico e/ou do ácido mevalônico. Essa classe de compostos é responsável por características como sabor e odor, atraindo não só os seres humanos, mas também outros animais. Essas substâncias agem atraindo animais para polinização ou dispersão de sementes, protegem as plantas contra os raios UV, vírus, bactérias, fungos, e até mesmo insetos (PERES, 2004).

Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que contêm anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (NACZK; SHAHIDI, 2004; SOARES, 2002). Sua classificação está essencialmente relacionada ao tipo de esqueleto molecular e à rota biossintética de origem. Com base na ampla variedade de características estruturais presentes, os compostos fenólicos são classificados em ácidos fenólicos, fenilpropanóides, cumarinas, taninos, ligninas e flavonoides e são amplamente distribuídos; outros, tais como, quinonas, xantonas, cromonas são fenólicos de distribuição restrita (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 1999).

Os dois maiores grupos de compostos fenólicos são o grupo dos flavonoides e os ácidos fenólicos. Os flavonoides possuem em sua estrutura química um núcleo formado por 15 carbonos (C6-C3-C6) e dois anéis aromáticos unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico. As classes de flavonoides variam em sua estrutura em sua substituição desse anel heterocíclico, podendo gerar flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanois, isoflavonas e antocianidinas (ANGELO; JORGE, 2007).

Os ácidos fenólicos já apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de metoxila ou hidroxila, normalmente sendo derivado do ácido hidroxicinâmico que são compostos aromáticos que possuem em sua estrutura três carbonos formando uma cadeia lateral (BRAVO, 1998; GARAMBONE; ROSA, 2007; SOARES, 2002).

#### **2.4.2 Alcalóides**

Os alcaloides são compostos nitrogenados encontrados predominantemente nas Angiospermas. Esses compostos farmacologicamente ativos são cíclicos e possuem no mínimo um átomo de nitrogênio em seu anel. A maioria desses compostos são de caráter alcalino, entretanto alguns apresentam caráter ácido, como a colchicina, piperina, oximas por exemplo (EVANS, 1996; KUTCHAN, 1995). Devido suas sínteses, essas substâncias não são encontradas em células jovens já que são sintetizados exclusivamente no retículo endoplasmático e concentrado nos vacúolos (PERES, 2004).

Dois mecanismos regem a formação do sistema heterocíclico desses metabólitos que são a formação de bases de Schiff e reações do tipo Mannich. A divisão dos alcaloides se dá de acordo com o aminoácido precursor, podendo ser indólicos e quinolínicos; pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quimolizidínicos; protoalcaloide, alcaloides isoquinolínicos e benzilisoquinolínicos. Alguns alcaloides como os pirrolizidínicos conferem as plantas uma defesa contra herbivoria por apresentarem características tóxicas, agindo principalmente sobre os hepatócitos (COSTA, 2008).

Os alcaloides são importantes produtos de detoxificação de substâncias na planta, podendo também agir como reserva de nitrogênio, defesa contra

patógenos e herbivoria (SIMÕES et al. 1999; SAAD et al., 2009). Esses metabólitos apresentam grande atividade farmacológica com atividade antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, possui ação no sistema nervoso e também característica analgésica (CHUEH et al., 2012; KANG et al., 2010; SOUTO et al., 2011; SILVA et al., 2009; PUVANENDRAN et al., 2008; WOO et al., 2006).

### **2.4.3 Terpenos**

Outra importante classe de compostos bioativos são os terpenos. Os terpenos são constituídos por unidades de isopreno (na forma de isopentenilpirofosfato), sendo que sua classificação é determinada pelo número de unidades de isopreno que constituem a molécula inteira. Muitos dos compostos vegetais importantes são terpenos ou possuem algum derivado desse metabólito em sua molécula. Entre esses compostos estão quatro, das seis classes de hormônios vegetais (PERES, 2004). Outro tipo de terpenos são as saponinas. Neste, os terpenos estão glicosilados. São cadeias de açúcar unidas por uma ligação glicosídica a uma aglicona hidrofóbica (FRANCIS et al., 2002). Esses terpenos são heterosídeos contendo uma porção aglicona lipofílica com uma ou mais cadeias osídicas que compõe a porção hidrofílica da molécula. Sua nomenclatura provém da sua capacidade de formar espuma quando agitados (GARCIA; CARRIL, 2009).

#### **2.4.3.1 Óleos essenciais**

Uma importante categoria de produtos de origem vegetal chamados óleos essenciais, são constituídos de terpenos. Esses óleos conhecidos também como óleos voláteis são componentes lipossolúveis responsáveis pelo aroma das plantas, já que seu odor e volatilidade são suas características predominantes (SIMÕES et al., 1999). Sua síntese deriva do ácido mevalônico por duas vias: a série terpênica e a dos fenilpropanóides (SAAD et al., 2009). A função desses

óleos nas plantas pode ser para atrair agentes polinizadores, ou de ação inseticida (CHAGAS et. al., 2002; PRATES, 1993; SANTOS, 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo Geral

Comprovar uma relação entre resistência ambiental adquirida naturalmente e antrópica causada por pressão seletiva por meio de testes com óleos essenciais em carrapatos *Rhipicephalus ssp.*

#### 3.2- Objetivos Específicos

- Coletar os carrapatos de campo da espécie *Rhipicephalus microplus* (expostos aos fatores abióticos naturais).
- Determinar a atividade larvicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarminetoi*, em larvas da espécie *Rhipicephalus microplus*; e comparar a linhagem dos carrapatos mantidos em condições de laboratório (sem histórico de contato com carrapaticidas) com os coletados em campo.
- Determinar a atividade larvicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarminetoi*, em larvas dos diferentes carrapatos heteroxenos de 2 hospedeiros (*R. evertsi*) e 3 hospedeiros (*R. appendiculatos*, *R. pulchellus*), coletados no continente africano.
- Determinar o perfil de mortalidade dos diferentes carrapatos expostos aos compostos dos óleos: alpha-phellandreno, sabineno, guaiol e bulnesol; e comparar com o perfil dos seus respectivos óleos essenciais.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* são artrópodes hematófagos obrigatório de vertebrados que representam uma séria ameaça para os produtores de gado leiteiro e de corte no mundo. Estudos descrevem que aproximadamente 80% da população de bovinos do mundo está em risco pela infestação destes carrapatos. Seu impacto negativo deve-se aos efeitos diretos da alimentação que causam a perda de peso dos bois e danos ao couro, e de efeitos indiretos como a transmissão de patógenos. Desta forma, calcula-se que as perdas econômicas por causa da prevenção e do tratamento contra este carrapato atingem um valor aproximado de dois bilhões de dólares por ano somente no Brasil.

Entre os atuais métodos de controle para este carrapato e para as doenças transmitidas por ele encontra-se o uso de acaricidas, vacinas e utilização de produtos naturais. Por uma parte, o uso de acaricidas químicos é a estratégia mais utilizada; no entanto, seu uso intensificado tem levado ao desenvolvimento de resistência de várias espécies de carrapatos, além do elevado custo para desenvolvê-los e registrá-los e da crescente preocupação na saúde pública pelos resíduos químicos achados em produtos de origem animal e da poluição do ambiente. Por outra parte, algumas vacinas têm sido disponibilizadas há mais de 20 anos e comercializadas no mundo inteiro; no entanto, mesmo que sejam uma alternativa muito promissora em comparação ao uso de acaricidas, ainda são insuficientes para conferir proteção contra todos os tipos de carrapatos que existem em diversas regiões geográficas no mundo. Diante deste panorama, novas estratégias para o controle deste carrapato centradas no maior entendimento sobre sua biologia são necessárias.

A descoberta de produtos naturais capazes de controlar a infestação de carrapatos apresenta como vantagens sua fácil obtenção, serem em sua maioria biodegradáveis, diminuir a contaminação de resíduos na carne e no leite, além de agirem na maioria das vezes de modo sinérgico, diminuindo assim o processo de seleção de carrapatos resistentes. No presente estudo, se caracteriza o perfil de mortalidade das larvas de carrapatos a dois óleos essenciais (*Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi*) e dois de seus componentes (alpha-phellandreno, sabineno e bulnesol e guaiol, respectivamente). Acredita-se que os resultados deste estudo

permitirão sugerir novas abordagens para o desenvolvimento de estratégias de controle e aumentar o conhecimento da biologia destes organismos.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Obtenção dos óleos essenciais:

Foi realizada uma parceria com o professor doutor Jesus M Lopez Rodilla, do Departamento de Química, da Universidade da Beira Interior, em Portugal que disponibilizou os óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi*. Junto com os óleos foram enviados também os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi*: Guaiol e Bulnesol (Tabela 1). Para os testes com os componentes majoritários do óleo essencial de *Shinus molle* foram comprados pela Sigma os compostos alpha-phellandrene e sabinense (Tabela 1).

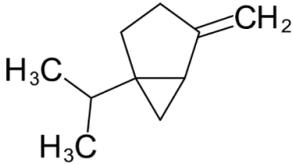
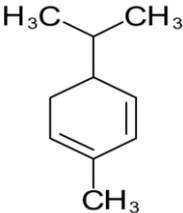
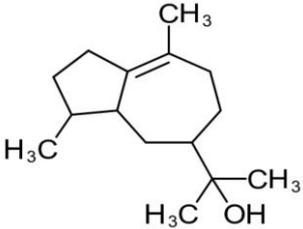
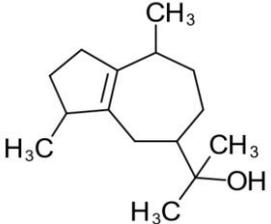
O óleo essencial de *Schinus molle* foi preparado a partir de frutos e folhas da planta (Figura 10 A) pelo processo de hidrodestilação, realizado em um aparelho semiindustrial por Silvia Guala e Heriberto Helder, pela Universidad del litoral, na Argentina. O alpha-phellandreno e o sabineno foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH.

O óleo de *B. sarmientoi* foi extraído de madeira triturada da árvore (Figura 10 B) por um processo industrial na Empresa Alpacasa, no Paraguai. O guaiol é obtido por cristalização da essência da madeira de *B. sarmientoi*, obtido por arraste de vapor, junto ao hexano em baixa temperatura. O guaiol cristalizado é separado então por filtração. O líquido remanescente da fase de filtração, conhecido como água-mãe, é separado por cromatografia em coluna com sílica-gel extraíndo assim o bulnesol.

|  |   |
|--|---|
| <p><b>A</b></p> <p>Domínio: Eukaryota<br/> Reino: Plantae<br/> Sub reino: Tracheobionta<br/> Super divisão: Spermatophyta<br/> Divisão: Magnoliophyta<br/> Classe: Magnoliopsida<br/> Ordem: Sapindales<br/> Família: Anacardiaceae<br/> Gênero: <i>Schinus</i><br/> Espécie: <i>Schinus molle</i></p>                                       |   |
| <p><b>B</b></p> <p>Domínio: Eukaryota<br/> Reino: Plantae<br/> Sub reino: Tracheobionta<br/> Super divisão: Spermatophyta<br/> Divisão: Magnoliophyta<br/> Classe: Magnoliopsida<br/> Ordem: Sapindales<br/> Família: Zygophyllaceae<br/> Sub família: Larreoideae<br/> Gênero: <i>Bulnesia</i><br/> Espécie: <i>Bulnesia sarmientoi</i></p> |  |

**Figura 10:** Plantas usadas para extrair o óleo essencial e seus compostos bioativos. (A) Folhas e frutos da árvore *Schinus molle*, da família Anacardiaceae, utilizados para a extração do óleo essencial testado nas diferentes espécies do gênero *Rhipicephalus*; (B) Flor e folhas da árvore *Bulnesia sarmientoi*, pertencentes à família Zygophyllaceae. Utilizou-se madeira para extração de óleo essencial e posterior isolamento dos componentes mais abundantes: guaiol e bulnesol.

**Tabela 1:** Estrutura química e peso molecular dos compostos constituintes dos óleos essenciais utilizados para o teste de imersão.

| Estrutura molecular   | Nomenclatura  | Peso molecular (g/mol) | Óleo essencial de origem   |
|---|---|------------------------|----------------------------|
|    | Alpha-phellandrene<br>2-Methyl-5-(1-methylethyl)-1,3-cyclohexadiene                       | 136.238                | <i>Schinus molle</i>       |
|    | Sabinene<br>4-Methylene-1-(1-methylethyl)bicyclo[3.1.0]hexane                             | 136.238                | <i>Schinus molle</i>       |
|   | Guaiol<br>2-[(3S,5R,8S)-8-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroazulen-5-yl]propano-2-ol      | 222.372                | <i>Bulnesia sarmientoi</i> |
|  | Bulnesol<br>2-(3,8-dimethyl-1,2,3 <sup>a</sup> ,4,5,6,7-octahydroazulen-5-yl)propano-2-ol | 222.372                | <i>Bulnesia sarmientoi</i> |

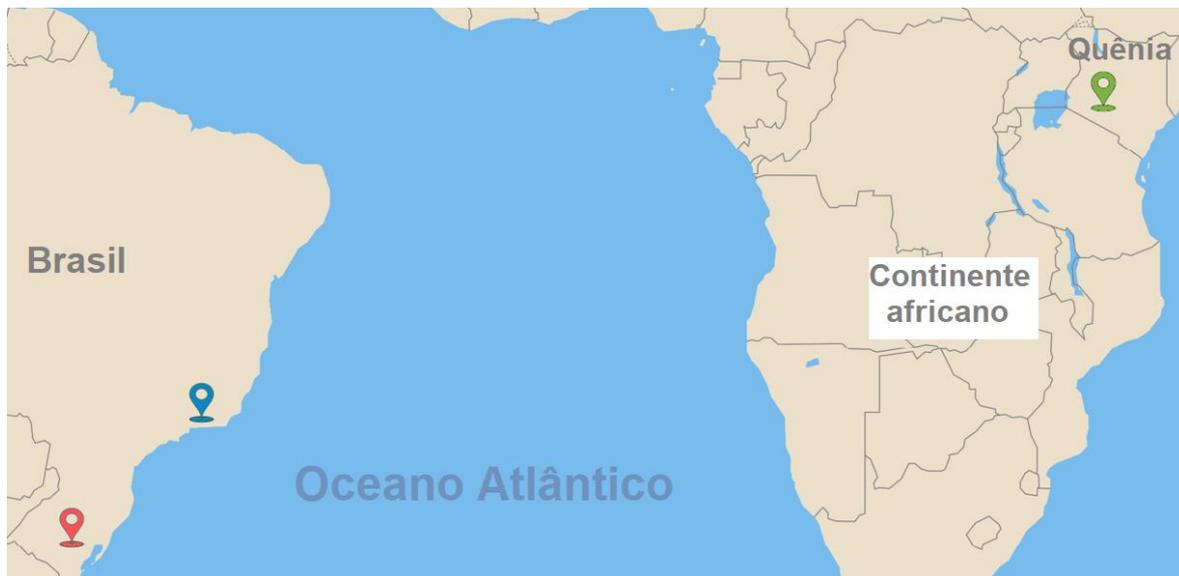
## 5.2. Diluição dos óleos essenciais e substâncias constituintes:

Os óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi* e seus constituintes utilizados no estudo foram todos solubilizados em metanol 100%. As diluições foram realizadas com o auxílio de provetas a partir de uma solução superconcentrada do material. Foram utilizados neste experimento as concentrações de 0,01%; 0,1%; 1% e 10% (v/v).

### 5.3. Obtenção dos carrapatos:

Neste estudo foram utilizadas quatro espécies de carrapatos Ixodídeos do gênero *Rhipicephalus*: *R. microplus*, *R. evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus* coletados em diferentes regiões (Figura 11).

Os carrapatos da espécie *R. microplus* foram obtidos de duas diferentes linhagens; a primeira linhagem foi obtida por meio de uma parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo esta cepa considerada como susceptível neste trabalho. Esses carrapatos foram adquiridos inicialmente de uma fazenda localizada em Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil) sem histórico de utilização de carrapaticida. Os carrapatos foram então mantidos em laboratório sob condições controladas e por meio infestação artificial foram realizadas a manutenção da colônia por várias gerações. Estudos apontam susceptibilidade dessa linhagem para carrapaticidas comerciais como Ivermectina, Deltametrina, Cipermitrina, Fipronil e Flumetrina.



**Figura 11:** Local de coleta dos carrapatos utilizados nos testes de imersão: Foram coletados amostras de *R. microplus* com (marcador azul) e sem histórico de carrapaticida (marcador vermelho). Os carrapatos da espécie *R. evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus* sem histórico de carrapaticida foram coletados em Náirobi, Quênia (marcador verde).

A segunda linhagem de *R. microplus* foi obtida na área agrícola da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizado na cidade de

Campos dos Goytacazes (Rio de Janeiro, Brasil). Para o controle de carrapatos desse polo agropecuário os trabalhadores utilizam carrapaticidas comerciais administrados na forma de banhos nos animais por gerações. No último ano o TOPLINE POUR ON tem sido usado nos animais, e nos dois anos anteriores o COLOSSO FC30. A mudança do produto ocorreu devido a visível resistência adquirida ao primeiro produto que é constituído principalmente por Clorpirifós (30%), Cipermitrina (15%) e Fenthion (15%), enquanto que o segundo é constituído apenas de 1% de Fipronil 1%, da classe de inseticida-acaricidas conhecida como fenilpirazóis.

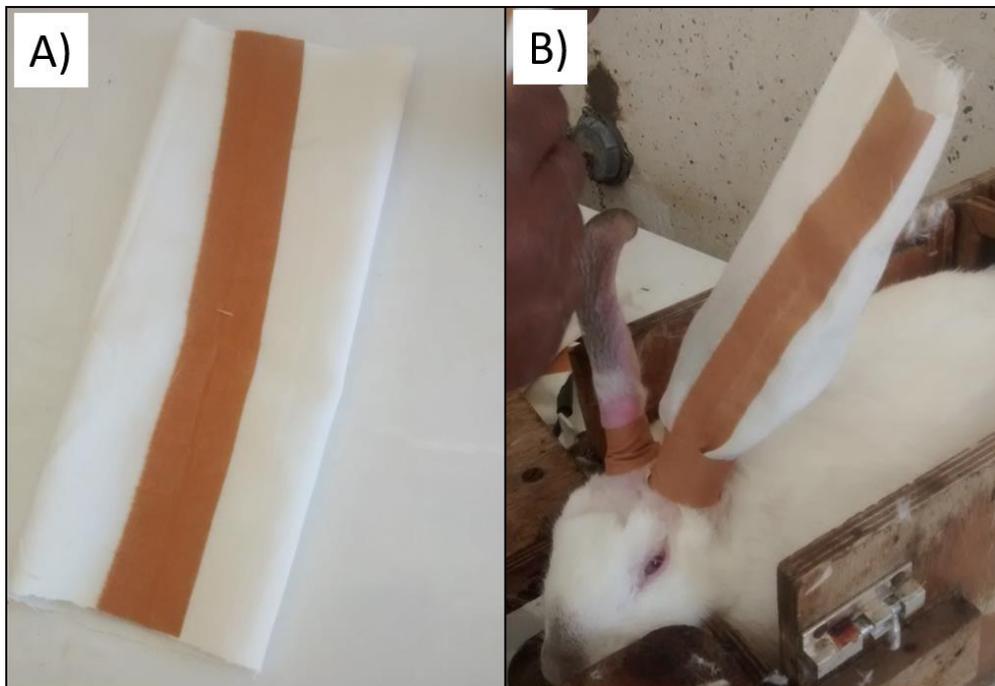
O tratamento carrapaticida é realizado sempre que os animais apresentam infestação e utilizando diferentes tipos de carrapaticidas. De acordo com os responsáveis pela área agrícola os carrapatos vêm ressurgindo com cada vez menos tempo após o banho com os produtos. Neste estudo esses carrapatos foram considerados como tolerantes devido a ação antrópica.

#### **5.4. Infestação artificial de carrapatos africanos**

Durante o período de dezembro de 2016 a julho de 2017, por meio do doutorado sanduiche, foram realizados experimentos no ILRI, International Livestock Research Institute. Sob supervisão do doutor Naftaly W. Githakac, responsável pela Unidade de carrapatos do Instituto foram realizadas coletas, infestações e testes em três espécies de carrapatos africanos: *Rhipicephalus evertsi*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus pulchellus* (coletados de animais selvagens do Parque Nacional de Náirobi, Quênia). Após a coleta, as fêmeas ingurgitadas foram mantidas por infestação artificial por gerações na ausência de qualquer carrapaticida. Os ovos depositados pelas fêmeas foram recolhidos e separados em tubos de vidro vedados com malha fina (para impedir a fuga das larvas (Figura 12).

As três espécies africanas testadas neste estudo possuem em seu ciclo de vida mais de um hospedeiro, sendo os primeiros hospedeiros mamíferos de pequeno porte, como roedores, enquanto que os adultos costumam parasitar mamíferos de grande porte, como bovinos. Para alimentação de larvas e ninfas foram utilizados coelhos, adquiridos no próprio Instituto (ILRI), que continha sua

própria criação de roedores para essa rotina de alimentação de carrapatos. Para isso era necessário raspar os pelos das orelhas dos animais, e com o auxílio de uma fita era preso na cabeça do animal um saco feito de pano de malha fina. Dentro deste pano eram depositados larvas ou ninfas (dependendo da fase de vida) e fechado. O ingurgitamento nessas primeiras fases demorou cerca de 3-10 dias. O período de muda da larva para ninfa e de ninfa para adulto demorou cerca de 5-15 dias. Após a coleta dos indivíduos adultos, estes eram transferidos para um bovino na área experimental que não tivesse tido contato com qualquer acaricida. No bovino acontecia a reprodução e posterior ingurgitamento das fêmeas. Após ingurgitadas, as fêmeas eram levadas para câmara climática com temperatura e umidade controladas até o término da postura.



**Figura 12:** Procedimento para realização da infestação artificial em coelhos: A) Raspagem dos pelos auriculares e fixação do pacote de malha; B) Pacote produzido de malha grossa para contenção das larvas e ninfas de carrapato.

### 5.5. Manutenção dos carrapatos:

As fêmeas das quatro diferentes espécies de carrapatos foram coletadas na fase de teleóginas adultas após o desprendimento do seu último hospedeiro

(completamente ingurgitada). Após as coletas esses animais foram lavados com água destilada, secas em papel toalha e em seguida fixadas em placas de petri por meio de fita dupla face e mantidas em câmara climática com temperatura e umidade controladas (28 °C; 80% UR) para realizarem a postura. Houveram coletas diárias dos ovos dos carrapatos sendo estes separados em microtubos, tipo eppendorf, cerca de 10 mg de ovos/tubo (cerca de 200 ovos). Cada microtubo foi coberto por uma malha fina permitindo as trocas gasosas e agindo como impedimento físico para a fuga das larvas. As larvas após o nascimento foram mantidas na câmara até completarem 10 dias de idade para assim serem realizados os testes.

### **5.5. Teste de imersão larval (TIL):**

Para o teste de imersão foi utilizada a técnica de Shaw (1966) com algumas adaptações. Cerca de 200 larvas de carrapato foram imersas por cinco minutos nos mesmos solventes e concentrações supracitadas dos óleos essenciais. Após esse tempo as larvas foram colocadas em papel filtro para retirada do excesso de solução e secagem, e em seguida transferidas para uma placa de petri. As placas foram acondicionadas em câmara climática com temperatura e umidade controladas (28 °C;80%UR). A aferição da mortalidade das larvas foi realizada 24 horas após o tratamento.

### **5.6. Análise estatística:**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e triplicata experimental com  $n$  utilizado de aproximadamente 200 larvas. Foram realizados testes de seis tratamentos e quatro concentrações de cada tratamento em quatro espécies de carrapatos do gênero *Rhipicephalus*. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o Statistical Analysis System (SAS System, Inc., Cary, NC, EUA). Deste modo, a significância estatística foi avaliada por ANOVA unidirecional e bidirecional para determinar diferenças significativas entre os grupos. O teste de Tukey foi usado para comparar dados entre grupos.

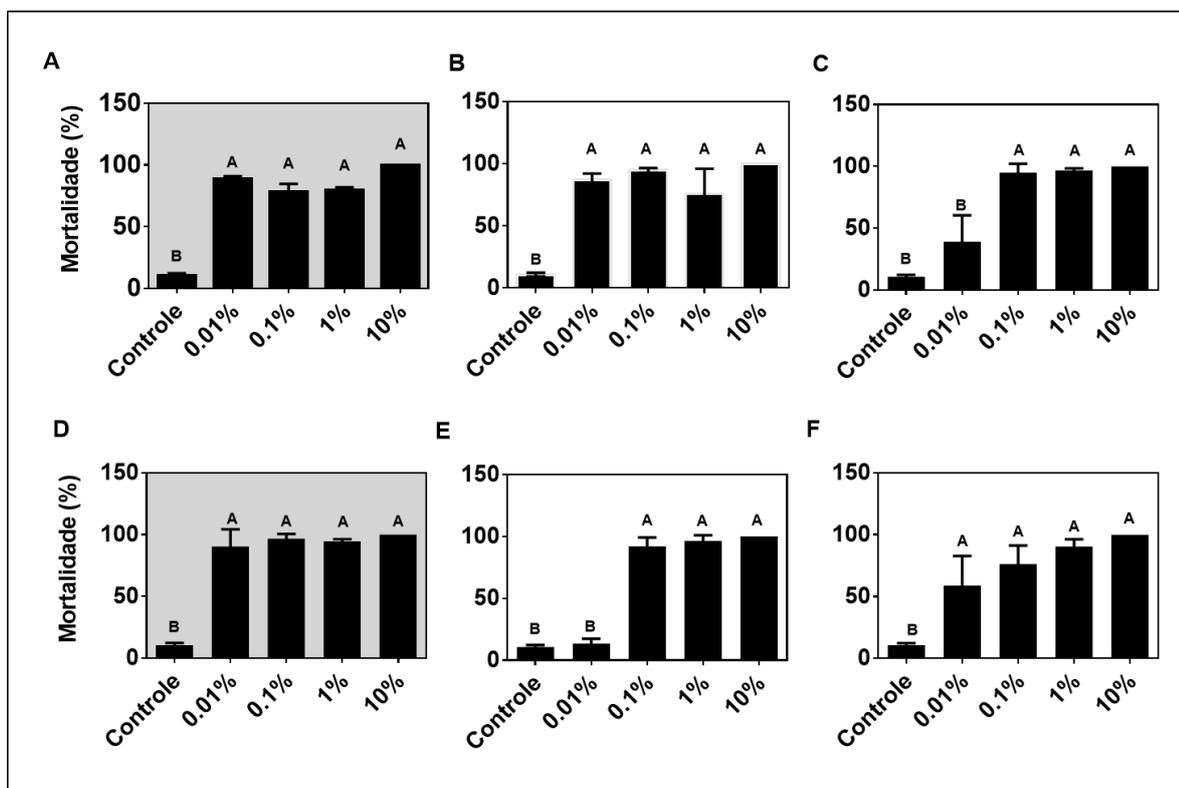


## 6. RESULTADOS

### 6.1. Perfil de mortalidade dos carrapatos da linhagem de Porto Alegre (POA)

No presente estudo foram utilizadas duas diferentes linhagens de carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, conhecida popularmente como o carrapato bovino. A linhagem oriunda de Porto Alegre, mantida na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foi coletada inicialmente em uma fazenda localizada na região e que não apresentava em seu histórico a utilização de nenhum carrapaticida comercial. A manutenção desses animais se deu por infestação artificial durante múltiplas gerações, sendo estes utilizados como referência de susceptibilidade para testes de ivermectina e fipronil (KLAFKE et al., 2006; CASTRO-JANER et al., 2010).

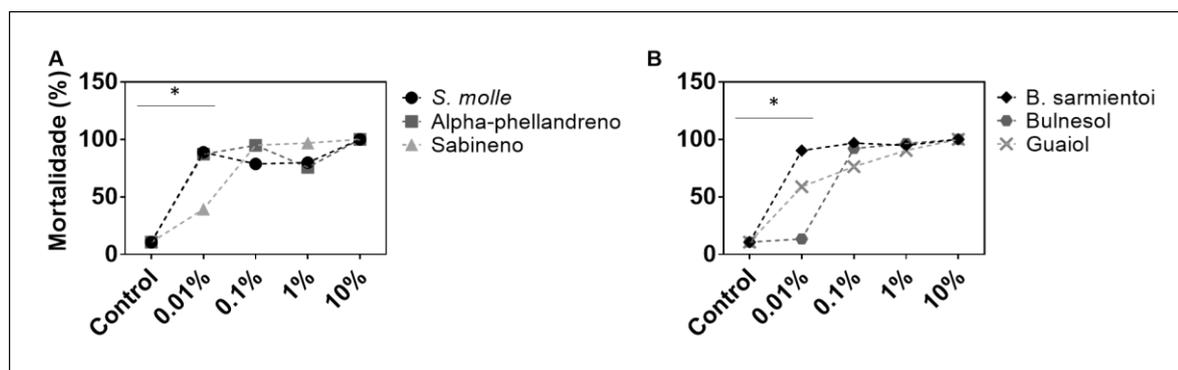
Foram comparados os perfis de sobrevivência 24 horas após imersão das larvas da linhagem POA em 6 diferentes tratamentos. O teste de mortalidade de larvas foi realizado em diluições seriadas de 10%; 1%; 0,1% e 0,01%, dos óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi*, e seus respectivos componentes, conforme descrito na metodologia desta tese (Tabela 1). A maioria dos testes realizados, nos carrapatos da linhagem POA, exibiram uma taxa de mortalidade de larvas acima de 85% já na concentração mais diluída de 0,01%; foram estes os tratamentos feitos com óleo essencial de *Schinus molle* e seu constituinte Alpha-phellandreno (Figura 13, A e B); e óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* e seu composto Guaiol (Figura 13, D e F). Com exceção do sabineno (Figura 13 C) e do Bulnesol (Figura 13 E), que apresentaram uma taxa de mortalidade acima de 85% a partir da concentração de 0,1%. O composto sabineno apresentou uma mortalidade elevada a partir da concentração de 0,1 %, matando cerca de 95% das larvas testadas. No óleo de *Bulnesia sarmientoi*, que demonstrou ter uma eficiência acima de 90% em todas as concentrações, seus dois constituintes majoritários Guaiol e Bulnesol apresentaram um perfil menor mortalidade nas concentrações abaixo de 1%. Todavia, todos os tratamentos apresentaram eficácia de 100% de mortalidade na maior concentração testada.



**Figura 13:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. microplus* da linhagem POA determinado pelo teste de imersão larval. A mortalidade das larvas foi avaliada 24 horas após a imersão em seis diferentes soluções. (A) Óleo essencial de *Schinus molle* e dois de seus constituintes: (B) Alpha-phellandreno e (C) Sabineno; (D) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* e seus compostos majoritários: (E) Bulnesol e (F) Guaiol.

Afim de avaliar se existe diferença significativa entre os óleos essenciais e seus componentes testados; na Figura 14, foi feita uma comparação entre os perfis de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, na espécie de *R. microplus*, linhagem sem histórico de contato com carrapaticidas. Em ambos os óleos testados, *Schinus molle* (Figura 14 A) e *Bulnesia sarmientoi* (Figura 14 B), houve diferença estatística apenas na concentração mais diluída de 0,01%, entre o efeito do óleo e o efeito dos respectivos componentes: Sabineno e Bulnesol. Para as concentrações maiores não houve diferença estatística entre os componentes e seus respectivos óleos. (Figura 14 A e B). Este resultado infere sobre a seguinte observação: <sup>(1)</sup> entre os 2 compostos do óleo de *Schinus mole*, o alfafelandreno apresentou maior efeito na mortalidade das larvas de *R. microplus*, linhagem POA, em comparação ao constituinte Sabineno. <sup>(2)</sup> entre os 2 compostos do óleo de *Bulnesia sarmientoi*, o

Guaiol apresentou maior efeito na mortalidade larval, em comparação ao constituinte Bulnesol na concentração de 0,01% (v/v).



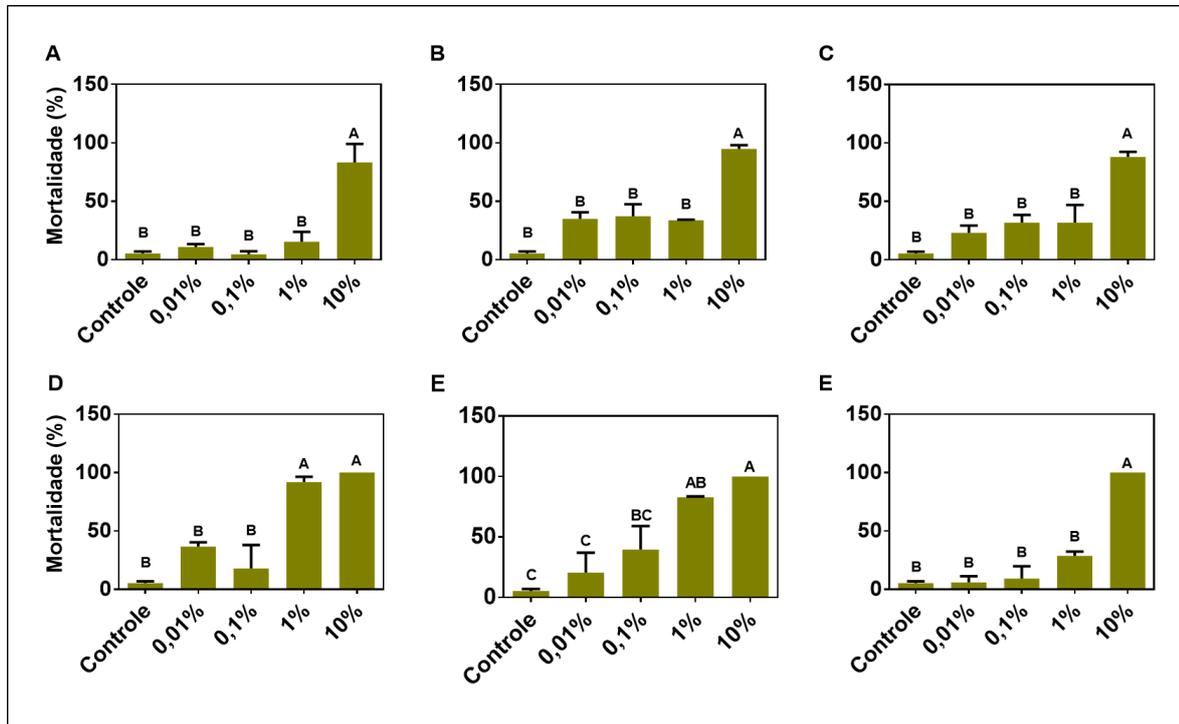
**Figura 14:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, na espécie *R. microplus* da linhagem POA. A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol. \* indica diferença estatística no teste de TUKEY ( $p > 0,05$ ).

Diante desses resultados foi possível traçar um perfil de mortalidade das larvas de *R. microplus* que estão por gerações em infestação artificial na ausência de quaisquer acaricidas. Deste modo, o próximo passo foi realizar o teste larvicida nos carrapatos *R. microplus* que sofrem por gerações a pressão seletiva dos acaricidas e do ambiente. E comparar os perfis de mortalidade das larvas de carrapato da mesma espécie, porém, de linhagens diferentes.

## 6.2. Perfil de mortalidade dos carrapatos da população de campo, Rio de Janeiro:

A população de campo de *R. microplus* avaliada foi coletada na área agrícola da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, que utiliza carrapaticidas comerciais com frequência para diminuir as infestações de carrapato na região. Carrapaticidas químicos como Clorpirifós, cipermitrina, fenthion e fipronil vem agindo na linhagem por no mínimo três anos. Esta população de campo, portanto, durante gerações sofre uma maior pressão seletiva devido ao constante uso de acaricidas comerciais de contato comparado

com a linhagem POA. A mortalidade das larvas desta população de carrapatos de campo da espécie *R. microplus*, frente ao desafio dos compostos naturais está representada na Figura 15.



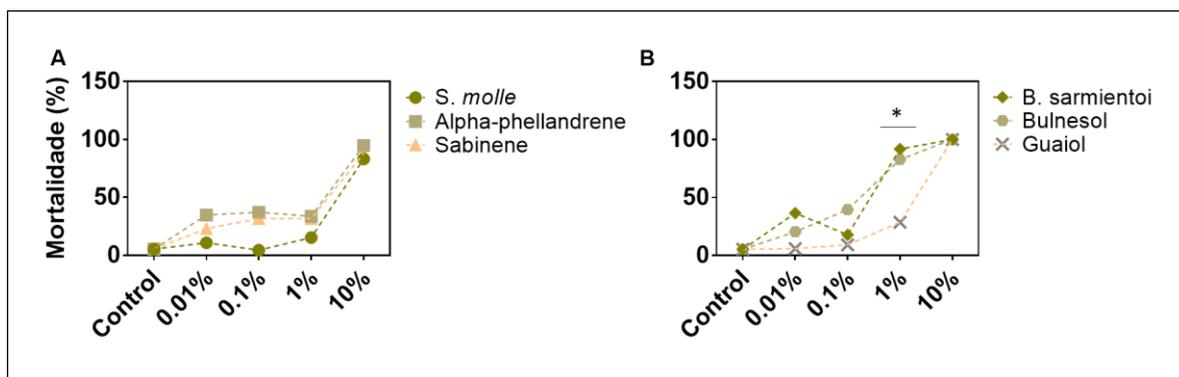
**Figura 15:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. microplus* coletados em campo, determinado pelo teste de imersão larval. As larvas de *R. microplus* expostas aos fatores abióticos naturais possuem por gerações influência de acaricidas de contato como cipermitrina, clorpirifós, fenthion e Fipronil. A mortalidade das larvas foi comparada 24 horas após a imersão em seis diferentes soluções. (A) Óleo essencial de *Schinus molle* e dois de seus constituintes: (B) Alpha-phellandreno e (C) sabineno; (D) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* e seus compostos majoritários: (E) Bulnesol e (F) Guaiol.

Após 24 horas do tratamento, observou-se que as larvas provenientes de carrapatos de campo apresentaram uma maior tolerância às concentrações de 0,01 – 1% se comparadas a linhagem POA. O perfil do óleo essencial de *Schinus molle* e de seus dois constituintes testados não ultrapassaram 50% de letalidade nas três primeiras concentrações. O óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* e seu constituinte Bulnesol foram os únicos tratamentos que apresentaram mortalidade próxima a 100% na concentração de 1%, sendo os mais letais nessa concentração das soluções testadas. Enquanto que a concentração de 0,01% já é suficiente para causar a morte de mais de 50% de larvas da linhagem POA na maioria dos tratamentos.

Ao compararmos os respectivos componentes com seu óleo, observamos que:

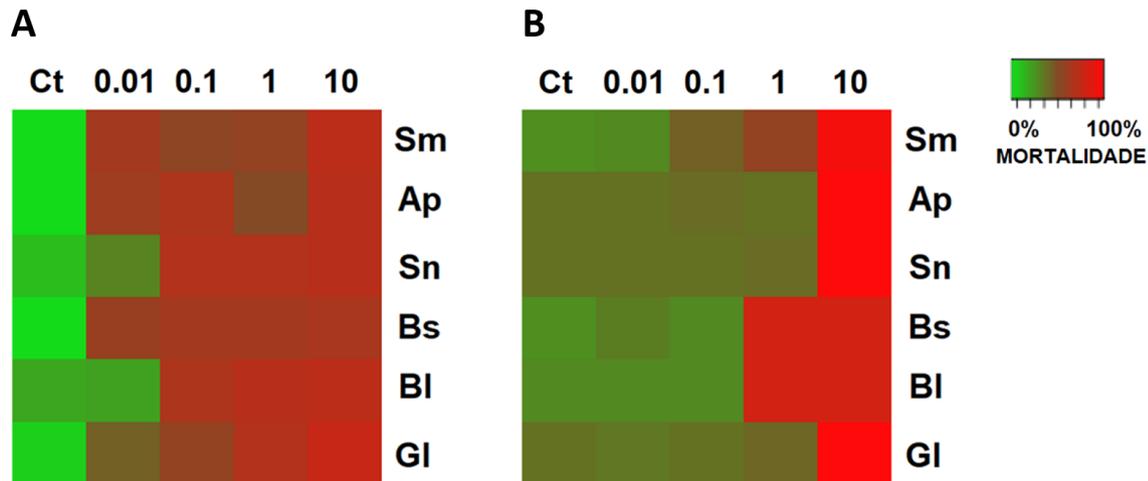
(1) não houve diferença estatística entre os componentes e o óleo de *S. molle*; não ultrapassando de 50% de letalidade nas três primeiras concentrações, porém atingindo aproximadamente 100% de mortalidade na maior concentração de 10 % (Figura 16 A);

(2) entre os 2 compostos do óleo de *B. sarmientoi*, o Bulnesol apresentou maior efeito na mortalidade larval na concentração de 1 %, em comparação ao Guaiol (Figura 16 B).



**Figura 16:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. microplus* de campo (expostos a acaricidas e fatores abióticos). A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol.

O mapa de calor, representado na Figura 17, evidencia a diferença entre os perfis de mortalidade das larvas de carrapatos da linhagem POA e dos coletados de campo, expostos a acaricidas e fatores abióticos.



**Figura 17:** Mapa de calor referente as duas amostras de *Rhipicephalus microplus* testadas no trabalho. A) Mapa de calor referente ao *R. microplus* POA (sem histórico carrapaticida); B) Mapa de calor referente ao *R. microplus* de campo, com histórico de carrapaticidas. Tons de verde indicam baixa mortalidade de larvas enquanto que tons mais vermelhos indicam alta mortalidade de larvas no Teste de imersão larval. Sm: *Schinus molle*; Ap: *Alfa-felandreno*; Sn: Sabineno; Bs: *Bulnesia sarmientoi*; Bl: Bulnesol; Gl: guaiol.

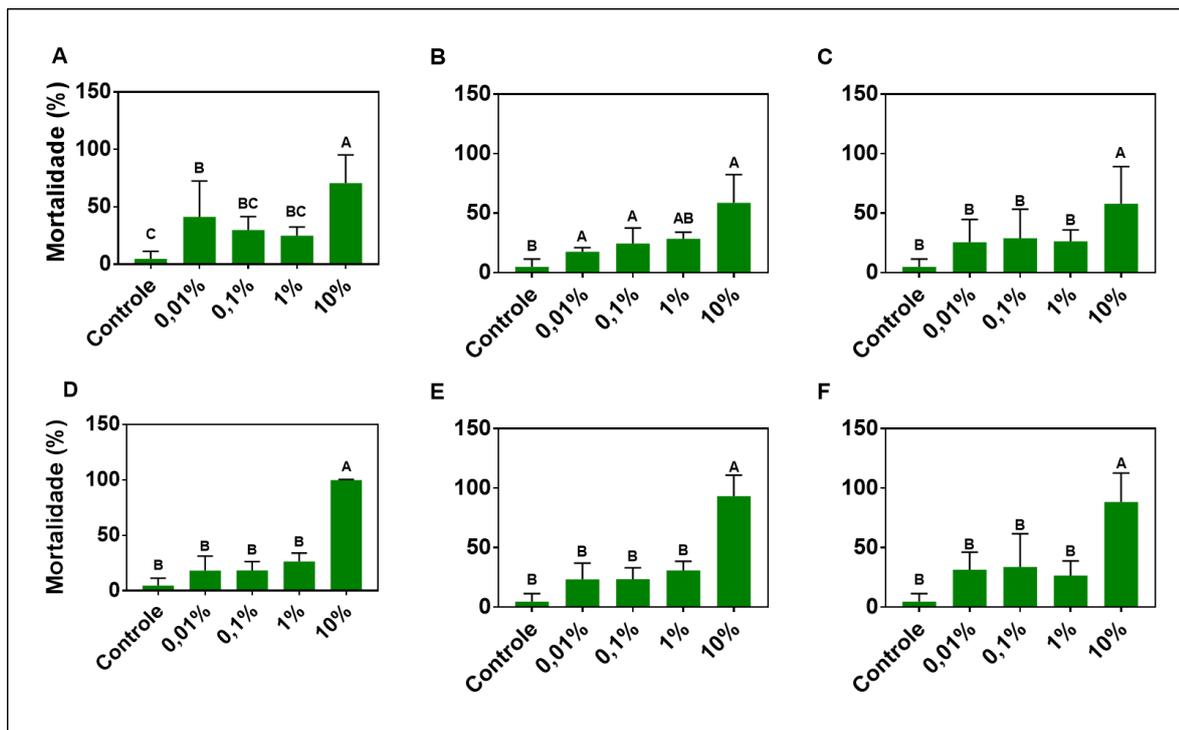
O mapa de calor demonstrado na figura 17 evidencia o perfil de mortalidade das duas amostras testadas de *R. microplus*. O mapa apresenta uma matriz que compila os dados do perfil de mortalidade para cada tratamento com óleo essencial e com componente isolado. Tons mais avermelhados indicam maior mortalidade das larvas frente ao desafio de imersão, enquanto que tons mais verdes indicam uma maior tolerância das larvas aos tratamentos.

Observa-se neste mapa de calor que a linhagem POA apresenta uma coloração bem mais avermelhada que dos carrapatos coletados em campo. Essa diferença de coloração denota uma maior tolerância aos tratamentos testados em larvas de carrapatos de campo. Isto indica que carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, que possuem frequente contato com carrapaticidas durante gerações, podem exibir resistência cruzada com tratamentos nunca antes testados.

Sendo assim, apesar da tolerância esperada e observada nos carrapatos de uma população de campo (exposto a diversos acaricidas e fatores abióticos) em comparação aos de linhagem POA; ainda assim, os óleos essenciais e os respectivos compostos na concentração de 10%, afetam mais de 90% da viabilidade das larvas.

### 6.3. Perfil de tolerância dos carrapatos do gênero *Rhipicephalus* coletados no continente africano

A mortalidade das larvas de carrapatos coletados no Quênia, Africa, testados com *Schinus molle*, alpha-phallandreno, sabineno, *Bulnesia sarmientoi*, bulnesol e guaiol estão representados nas figuras 18, 20 e 22. *Rhipicephalus evertsi* é um carrapato que necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida (Figura 5). Seu perfil de mortalidade frente ao desafio de imersão de larvas aos óleos essenciais encontra-se na figura 18.

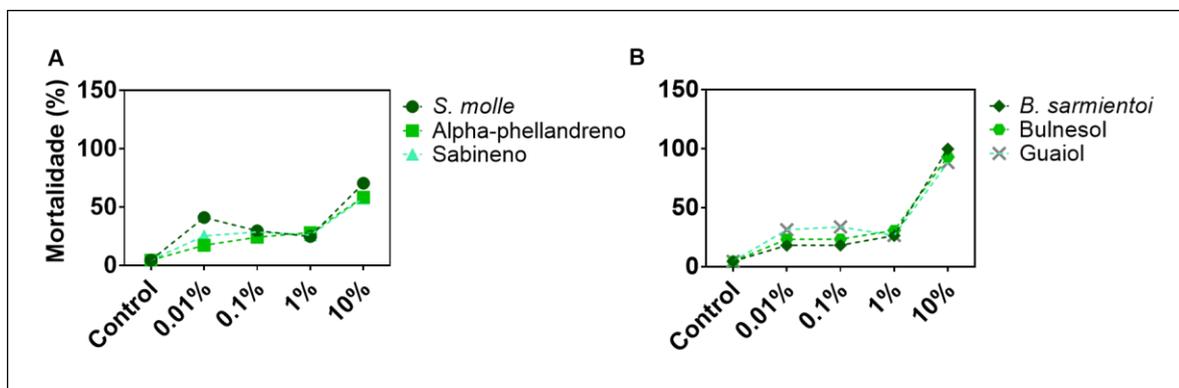


**Figura 18:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. evertsi*. Mortalidade observada após 24 horas do teste de imersão larval. A mortalidade das larvas foi analisada 24 horas após o teste de imersão para as seis diferentes soluções: (A) óleo essencial de *Schinus molle*, (B) alfa-felandreno, (C) sabineno, (D) *Bulnesia sarmientoi* óleo essencial, (E) bulnesol e (F) guaiol.

Esta foi a espécie coletada no Quênia com maior tolerância encontrada neste estudo. Os óleos e componentes testados nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1% apresentaram um efeito de < 50 % na mortalidade das larvas. Para a concentração de 10 % de óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* assim como seus componentes majoritários Bulnesol e Guaiol, a letalidade das larvas foi > 90%. O

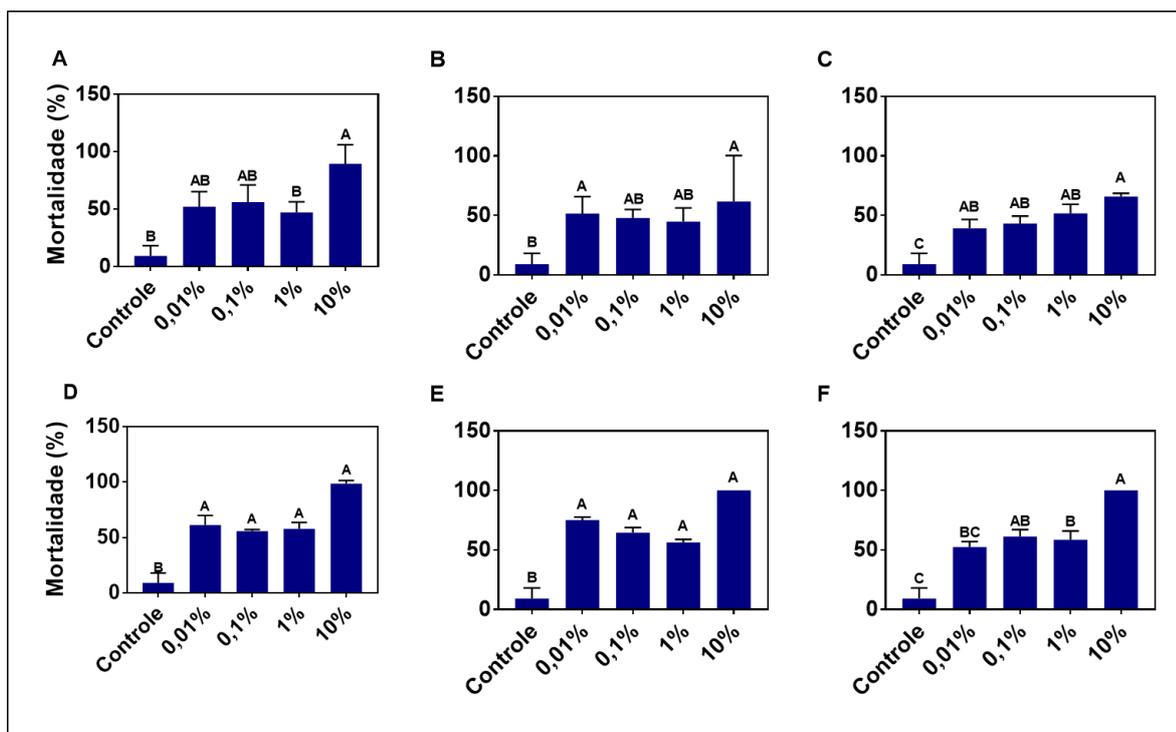
óleo essencial de *Schinus molle* e seus componentes foram os tratamentos menos eficientes, apresentando um potencial larvicida entre 57 e 70%, na concentração de 10%.

A atividade larvicida dos óleos essenciais não diferiu dos seus respectivos compostos isolados também nesta espécie como pode-se observar na figura 19.



**Figura 19:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. evertsi*. A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol.

A espécie de três hospedeiros *R. appendiculatus* coletada no Quênia, África, demonstrou grande susceptibilidade aos tratamentos com óleos essenciais e seus componentes (Figura 20).

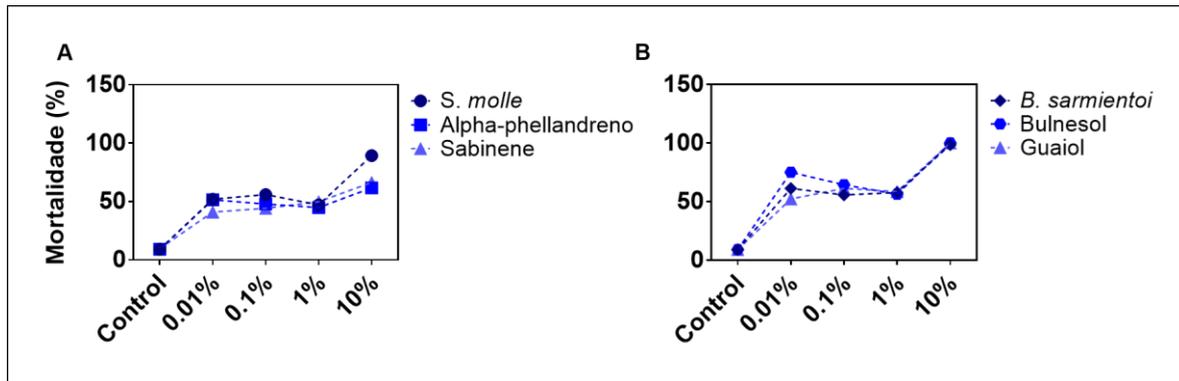


**Figura 20:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. appendiculatus*. Mortalidade observada após 24 horas do teste de imersão larval nas quatro concentrações, para as seis diferentes soluções: (A) óleo essencial de *Schinus molle*, (B) alfa-felandreno, (C) sabineno, (D) *Bulnesia sarmientoi* óleo essencial, (E) bulnesol e (F) guaiol. .

O óleo essencial de *Schinus molle* foi o tratamento que apresentou nas três menores concentrações uma mortalidade não excedente a 60%, assim como seus compostos alfa-phellandreno e sabineno. Todavia, seus componentes demonstraram uma menor eficiência larvicida na maior concentração sendo encontrado uma mortalidade de 60% (alfa-phellandreno) e 67% (sabineno) enquanto que o óleo essencial apresentou uma mortalidade de quase 90% na mesma concentração de 10%.

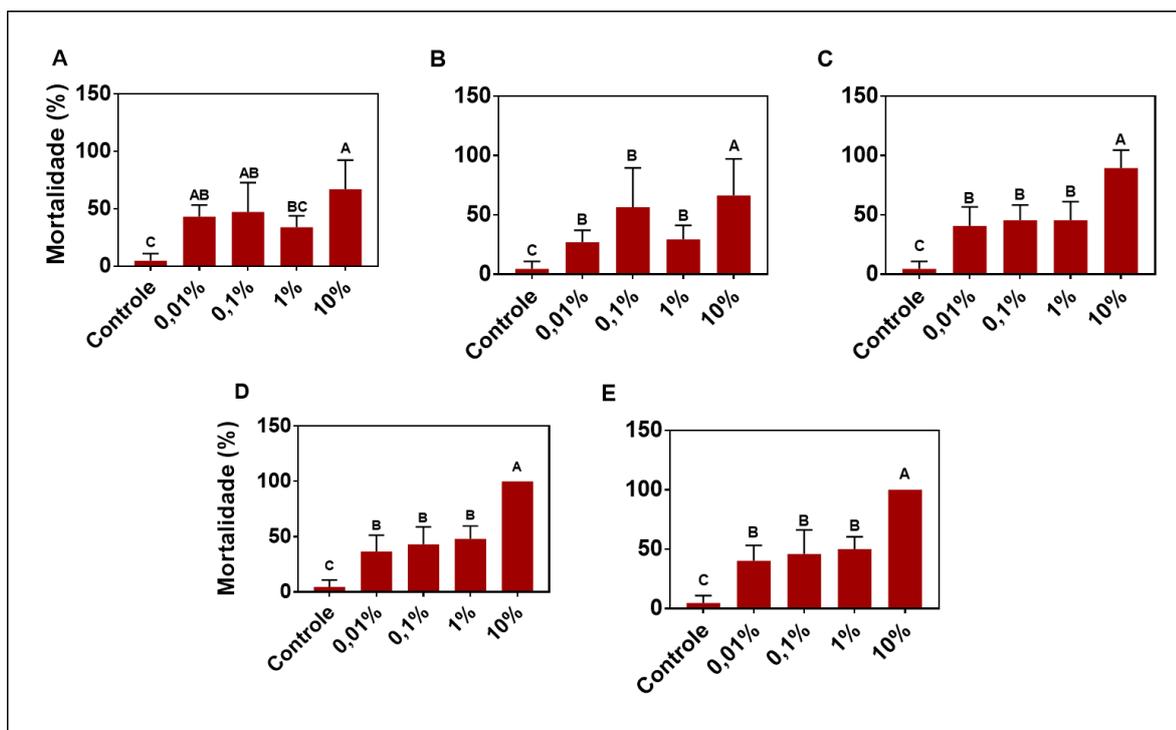
O óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* mostrou-se mais eficiente no controle das larvas desse carrapato apresentando uma mortalidade maior que 60% nas menores concentrações, chegando a 80% de mortalidade nas larvas tratadas apenas com o componente Bulnesol. Os tratamentos com óleo essencial de *B. sarmientoi* na concentração de 10% apresentou 100% de mortalidade das larvas imersas. Esse efeito também foi encontrado em seus componentes majoritários (Figura 21). Ambos óleos essenciais não demonstraram diferença

significativa com seus respectivos compostos isolados nas concentrações testadas.



**Figura 21:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. appendiculatus*; testadas com óleos essenciais e seus respectivos componentes isolados. A) Óleo essencial de *Schinus molle* comparado com seus compostos alpha-phellandreno e sabineno. B) Óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* comparado com seus compostos majoritários bulnesol e guaiol.

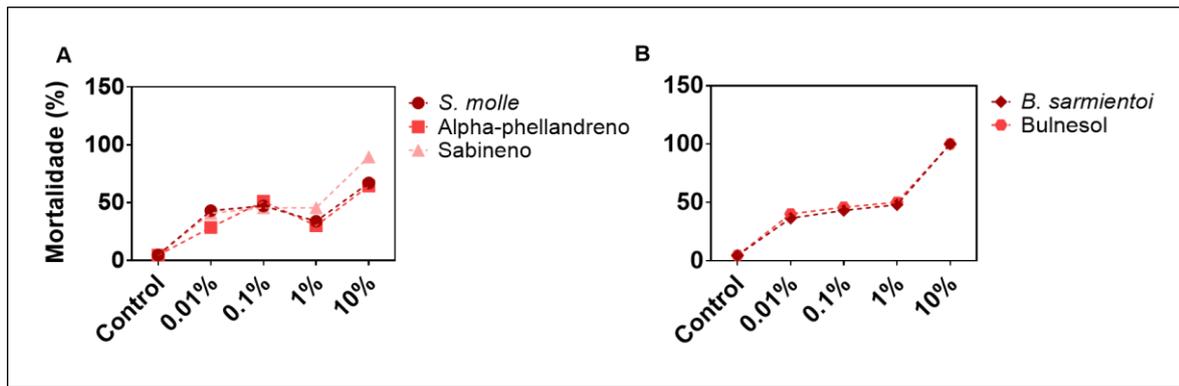
A espécie *R. pulchellus*, assim como o *R. appendiculatus*, necessitam de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Para esta espécie o óleo essencial de *Schinus molle*, assim como seus componentes isolados Alpha-phellandreno e sabineno, apresentaram mortalidade geralmente inferior a 50%. Na maior concentração testada, o pico de mortalidade foi encontrado nas larvas tratadas com sabineno, que apresentou quase 90% de mortalidade, enquanto que o alpha-phellandreno e o próprio óleo essencial obtiveram mortalidade inferior a 70% em mesma concentração (Figura 22 A, B e C).



**Figura 22:** Perfil de mortalidade das larvas de *R. pulchellus*. Mortalidade observada após 24 horas do teste de imersão larval nas quatro concentrações de cada tratamento: (A) óleo essencial de *Schinus molle*, (B) alfa-felandreno, (C) sabineno, (D) *Bulnesia sarmientoi* óleo essencial e (E) bulnesol.

Assim como nas outras espécies testadas neste estudo, o óleo essencial de *B. sarmientoi* foi o mais eficiente no controle das larvas de *R. pulchellus*. Apesar de apresentarem um perfil de dose-resposta semelhante ao de *S. molle* e seus componentes, os tratamentos com óleo essencial de *B. sarmientoi* e bulnesol apresentaram 100% de eficácia na morte das larvas tratadas em sua maior concentração testada (Figura 22 D e E). Não foi possível avaliar a eficácia larvicida do guaiol para esta espécie devido a problemas de trabalho que interferiram no controle do experimento.

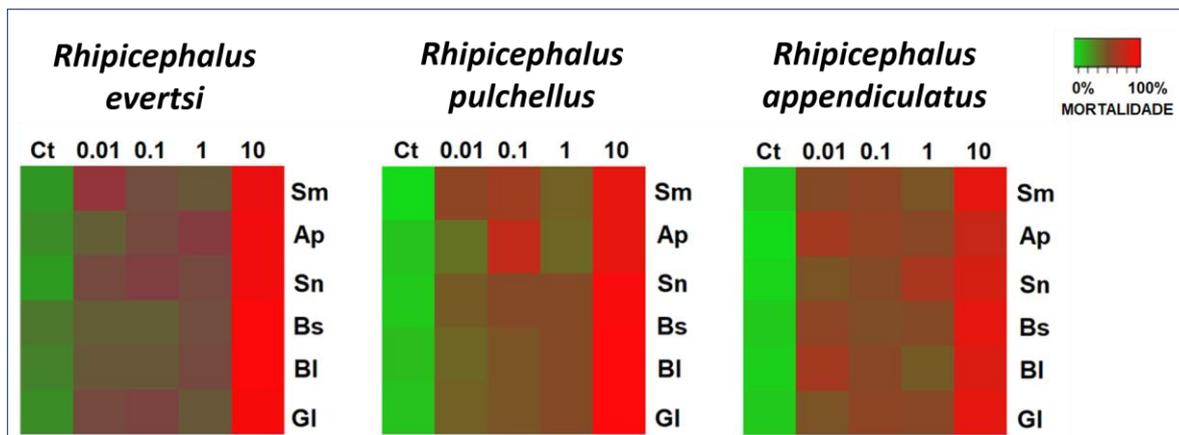
A relação do perfil de mortalidade dos óleos essenciais com seus respectivos componentes testados neste estudo está na Figura 23. Assim como as demais espécies testadas, o efeito larvicida dos óleos essenciais testados (*Schinus molle* e *B. sarmientoi*) não demonstraram diferença significativa quando comparados com seus componentes escolhidos para este experimento em nenhuma das concentrações testadas.



**Figura 23:** Comparação do perfil de mortalidade larval dos compostos com seus respectivos óleos essenciais, em larvas de *R. pulchellus*. A) Perfil de mortalidade do óleo essencial de *Schinus molle* juntamente com o perfil de seus componentes alpha-phellandreno e sabineno. B) Perfil de mortalidade do óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* juntamente com o Bulnesol.

O mapa de calor demonstrado na figura 24 tem como objetivo evidenciar a diferença entre os perfis de mortalidade das três espécies heteroxenicas testadas nesta tese. Assim como o outro mapa (Figura 17), este mapa apresenta uma matriz com os dados do perfil de mortalidade para cada tratamento com óleo essencial e com componente isolado. Tons mais avermelhados indicam maior mortalidade das larvas frente ao desafio de imersão, enquanto que tons mais verdes indicam uma maior tolerância das larvas aos tratamentos.

É possível observar que dentre as três espécies coletadas no território africano, o *R. evertsi* apresentou a maior tolerância aos óleos essenciais e seus compostos. Essa espécie é a única testada que necessita de dois diferentes hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Uma das espécies testadas que necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo *R. appendiculatus* apresentou a maior susceptibilidade frente ao desafio apresentando uma matriz com tons mais verdes que as demais. Embora apresentem diferentes perfis, todos os carrapatos amostrados do Quênia apresentaram mortalidade de 100% na maior concentração do óleo essencial de *B. sarmientoi* e seu componente majoritário Bulnesol.



**Figura 24:** Mapa de calor referente as espécies africanas do gênero *Rhipicephalus* testadas no trabalho. Tons de verde indicam baixa mortalidade de larvas enquanto que tons mais vermelhos indicam alta mortalidade de larvas no Teste de imersão larval. Sm: *Schinus molle*; Ap: Alpha-phellandreno; Sn: Sabineno; Bs: *Bulnesia sarmientoi*; Bl: Bulnesol; Gl: Guaiol.

## 7. DISCUSSÃO

Após a descoberta dos primeiros acaricidas desde 1896 suas utilizações se difundiram sistemática e continuamente. Produtores rurais frequentemente utilizam acaricidas comerciais para o controle dos carrapatos, estes por sua vez, aumentam a pressão seletiva sob esses parasitas acelerando o processo de seleção de indivíduos mais tolerantes à esse produto (FURLONG, 2005). De acordo com Rush (1993), em uma população natural de carrapatos os alelos que conferem resistência a determinado xenobiótico já estão presentes na população, na frequência de um a cada um milhão ou mais de indivíduos. À medida que o acaricida é utilizado, os carrapatos que apresentam o alelo que confere resistência sobrevivem ao tratamento, se reproduzem e dão origem às larvas que carregam essa característica. O tempo de desenvolvimento da resistência geralmente é relacionado ao grau de dominância desses alelos, além do manejo e qualidade dos produtos utilizados (KLAFKE, 2008). A resistência a acaricidas, causada seja pela ação de fatores abióticos e/ou pela ação antrópica (incluindo o mal-uso de acaricidas), pode estar relacionada com a pressão seletiva. Dentro deste contexto, avaliou-se a tolerância de larvas, com os resultados apresentados na figura 17, comparando o perfil de mortalidade de carrapatos de *R. microplus* da linhagem mantida em condições de laboratório, sem histórico de contato com carrapaticidas. Avaliou-se também os coletados em campo da mesma espécie, expostos a fatores abióticos e influenciados por gerações com acaricidas como: cipermitrina, clorpirifós, fenthion, fipronil. Observou-se que os carrapatos de campo apresentaram maior tolerância aos testes de mortalidade dos óleos e seus compostos, do que os de linhagem POA.

Casos de incidência de resistência a acaricidas em populações de carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* têm sido descritos para todas as categorias de carrapaticidas, desde arsenicais em 1937 até lactonas macrocíclicas em 1981 (ANGUS, 1996; GEORGE; POUND; DAVEY, 2008). Diversos fatores são envolvidos no desenvolvimento da resistência à esses produtos, o que faz a resistência a xenobióticos ser um fenômeno multifatorial (COSSÍO-BAYÚGAR et

al., 2018). Entre esses fatores estão influências ambientais (entre elas pluviosidade e temperatura), aversão do animal ao local contendo o produto, fatores bioquímicos, aumento da impermeabilidade do exoesqueleto, aumento dos processos de detoxificação celular, além da diminuição da sensibilidade do acaricida devido à mudanças conformacionais de seus sítios de ação (ALONSO-DÍAZ et al., 2006; COSSÍO-BAYÚGAR et al., 2018). A população de campo da espécie *R. microplus* utilizada neste estudo que demonstrou alta tolerância aos óleos essenciais de *Schinus molle* e seus componentes alpha-phellandreno e sabineno, e ao óleo de *Bulnesia sarmientoi* e seus compostos majoritários guaiol e bulnesol (Figura 16) apresentam em seu histórico o uso de acaricidas de contato como manejo para suas infestações. Entre os acaricidas utilizados pelos produtores da propriedade estão Clorpirifós, cipermitrina, fention e fipronil. É descrito na literatura que invertebrados resistentes a esses produtos apresentam como característica em comum um aumento na eficácia de processos metabólicos relacionados principalmente com a detoxificação de xenobióticos.

O clorpirifós, um pesticida organofosfato, é geralmente utilizado para o controle de diversas pragas agrícolas e pecuárias que atua no sistema nervoso dos artrópodes inibindo a acetilcolinesterase. A resistência à esse pesticida é associado ao aumento da atividade das esterases (EST), responsáveis pela hidrólise de ésteres endógenos e exógenos nos artrópodes (AYVAZ et al., 2010; WANG et al., 2010; ZAMANI; SAJEDI; MEMARIZADEH, 2014; DAABOUB et al., 2017; GAO et al., 2019). Todavia também foram relatados a ação de outras enzimas participando deste processo de conferência de resistência como Citocromo P450 (YAN et al., 2019), glutathione-S-transferase (ZAMANI; SAJEDI; MEMARIZADEH, 2014), além da dessensibilização de alguns receptores da própria acetilcolinesterase (CUI et al., 2006; ZAMANI; SAJEDI; MEMARIZADEH, 2014). A resistência a fention, um pesticida organotiofostato que também causa inibição da enzima acetilcolinesterase, tem sido associada a mudanças qualitativas e quantitativas das enzimas esterases. As mudanças quantitativas estão associadas a um aumento da amplificação dos genes e conseqüentemente aumento do número de enzimas nas células (STONE; BROWN, 1969), enquanto que as mudanças qualitativas são relacionadas principalmente com o aumento da atividade enzimática afim de combater o acaricida (DORVAL; BROWN, 1970;

BARROS et al., 2001; HSU et al., 2011). O fipronil, por sua vez, afeta os organismos alvos bloqueando a passagem de íons cloro através dos receptores GABA danificando assim o sistema nervoso do animal (RAYMOND-DELPECH et al., 2005). Invertebrados resistentes a esse pesticida possuem mutações nesse receptor, inibindo assim ação do fipronil (ZHANG et al., 2016; MANGIA et al., 2018)

A cipermitrina é um piretróide derivado da piretrina natural utilizada amplamente como inseticida e acaricida sendo altamente tóxica. Organismos resistentes à esse pesticida apresentam alta atividade e aumento da transcrição do citocromo P450 e glutathione-S-transferase (VALLES; DONG; BRENNER, 2000; MAGADUM; MONDAL; GHOSH, 2009; LIN et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2014; MUTHUSAMY; SHIVAKUMAR, 2015; WHYTE et al., 2016; GHOSH et al., 2017; ÇAĞATAY et al., 2018; RUTTANAPHAN; PLUEMPANUPAT; BULLANGPOTI, 2018). Além disso, algumas populações de artrópodes resistentes a cipermitrina também apresentam um aumento significativo na atividade das esterases, oxidases de função mista e também mutações no gene de canais de sódio (GUO et al., 2013; MUTHUSAMY; SHIVAKUMAR, 2015). A população de campo de *Rhipicephalus microplus* utilizada neste experimento sofreu durante mais de três anos pressão seletiva causada por esses pesticidas. Todos os mecanismos observados em organismos resistentes a esses produtos incluem um aumento transcricional e na atividade de moléculas responsáveis pelos processos de detoxificação celular, neste caso Glutathione S transferase, citocromo P450 e esterases principalmente. Há relatos de resistência há mais de um pesticida ocasionado pelo aumento da atividade dessas enzimas (WANG et al., 1989; BROGDON; BARBER, 1990; FONSECA-GONZÁLEZ et al., 2009; CHEN et al., 2015; XI et al., 2015; XU et al., 2017).

Em *Rhipicephalus microplus* essas enzimas também podem agir fornecendo a característica de resistência a mais de um pesticida. Glutathione S transferase e citocromo P450 já foram descritos como responsáveis pela resistência atribuída aos pesticidas coumifós e diazinon, enquanto que essas duas enzimas juntamente com esterases foram responsáveis por gerar resistência à pesticidas derivados de organofosfatos e piretróides em carrapatos dessa espécie no México (JAMROZ et al., 2000). A hipótese para o fenômeno encontrado neste

estudo no qual o carrapato que teve contato com acaricidas por gerações obteve uma maior tolerância aos óleos essenciais e seus componentes selecionados quando comparado ao carrapato que nunca teve contato com esses produtos é que a seleção causada por esses tratamentos pode ter selecionado carrapatos que apresentam maior atividade das enzimas responsáveis pelos processos de detoxificação celular. Como estas enzimas apresentam atividade inespecífica à vários pesticidas (LI et al., 2003; ROSARIO-CRUZ et al., 2009; RASOOL et al., 2014; ZHANG et al., 2017; SMITH et al., 2019), estas podem estar agindo para diminuir a toxicidade causada pelos produtos naturais testados. Três outras espécies de *Rhipicephalus* foram testadas neste estudo afim de se observar o perfil de mortalidade das larvas frente ao desafio de imersão aos óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi* e dois de seus constituintes, alpha-phellandreno, sabineno, bulnesol e guaiol (Figuras 19, 21 e 23). Foram testadas as larvas das espécies *Rhipicephalus evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus*. As larvas dessas espécies que foram testadas foram originalmente de animais selvagens do Quênia e em seguida mantidos em condições laboratoriais na ausência de quaisquer carrapaticidas.

Todos os carrapatos testados originados do Quênia são heteroxenos que necessitam de dois ou mais hospedeiros para completar seu ciclo de vida, característica considerada ancestral para os carrapatos ixodídeos (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014). Um dos fatos que sustentam isso é o fato dos gêneros *Haemaphysalis* e *Amblyomma* que estão na base da linhagem de Ixodídeos necessitarem de três hospedeiros para completar seu ciclo (COIMBRA-DORES et al., 2018). Além disso, é mais fácil para carrapatos que precisam de menos hospedeiros, encontrarem o seu hospedeiro para conseguirem completar seu ciclo de vida. Sendo assim, não morrendo por falta de hospedeiro para parasitar. Os carrapatos que necessitam de menos hospedeiros estão mais aptos a sobrevivência em invernos rigorosos, pois a permanência no hospedeiro diminui os efeitos das baixas temperaturas nas larvas e ninfas. Esse tipo de estratégia é observada no carrapato *Dermacentor albipictus* que mesmo nas estações de inverno consegue desenvolver seus primeiros estágios devido a permanência no hospedeiro ungueado, não sendo necessário entrar em diapausa como os carrapatos com mais estágios de vida livre (DREW; SAMUEL, 1989).

Fenômenos climáticos são os principais fatores que delimitam o território de populações de carrapato, já que o alcance do hospedeiro não delimita o seu alcance (ESTRADA-PEÑA, 2003). Embora não seja estabelecido todos os fatores que delimitam as faixas de espécies de carrapatos, sabe-se que os principais são a precipitação, a temperatura e o tipo de vegetação (CUMMING, 2002). Carrapatos heteróxeos possuem maior tempo em estágio de vida livre, portanto são mais sensíveis as influências das condições ambientais externas do que os carrapatos monoxênicos (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014; SANDS et al., 2017). Neste trabalho, os perfis de mortalidade encontrados após o teste de atividade larval dos carrapatos heteróxeos (Figura 25), foi semelhante ao perfil do carrapato *R. microplus* com histórico de carrapaticida (Figura 14). Isso pode indicar que não é apenas a pressão seletiva causada por acaricidas que influencia a capacidade de um organismo de tolerar e ser mais efetivo na neutralização e excreção de xenobióticos. Também é descrito na literatura que mudanças comportamentais (como o fato de ter mais tempo no estágio de vida livre) (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014; WALKER et al., 2014; SANDS et al., 2017), somado às condições ambientais que interferem severamente no ciclo do carrapato (CUMMING, 2002; ESTRADA-PEÑA, 2003; OLWOCH et al., 2007; OGDEN; MECHAI; MARGOS, 2013), podem contribuir para a seleção de carrapatos com maior capacidade de combater ou eliminar substâncias que possam ser prejudiciais a este organismo.

Deste modo, as pressões seletivas dos fatores abióticos (precipitação e temperatura), a vegetação, a espécie e a disponibilidade dos hospedeiros podem estar agindo na seleção de carrapatos com maior capacidade de lidar com substâncias nocivas, uma resistência natural. (CUMMING, 2002; OLWOCH et al., 2007). Isso também pode significar que a pressão seletiva ambiental somada à causada pelos acaricidas na amostra de *R. microplus* coletada em campo pode ter agido concomitantemente nestes indivíduos. Isto pode explicar a menor mortalidade do estudo ser encontrada no carrapato que sofreu ambas pressões seletivas (*Rhipicephalus microplus* – amostra de campo). Em termos gerais as influências ambientais devem ser levadas em consideração em estudos para descoberta de novos métodos de controle das espécies de carrapato. No caso dos carrapatos heteróxeos testados, é possível observar que a quantidade de

hospedeiros pode não ter influenciado tanto na resistência ambiental adquirida, já que o carrapato heteróxico que apresentou maior tolerância aos tratamentos com óleo essencial foi a espécie *R. evertsi* (Figura 19) que possui apenas dois hospedeiros. A crescente seleção de carrapatos resistentes aos produtos químicos, que são convencionalmente utilizados no controle desses parasitas, tem sido um fator determinante na busca de novos produtos alternativos (BENELLI et al., 2016). Além disso, a utilização desses acaricidas acarretam em outros problemas como contaminação de leite e carne dos animais tratados e poluição ambiental (contaminação de corpos d'água e organismos não-alvos) (SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, 2014). Portanto a busca por métodos alternativos deve também ser consistentes com os princípios da agricultura sustentável (DONALD, 1994; GHOSH; AZHAHIANAMBI; DE LA FUENTE, 2006).

Diversas plantas são capazes de sintetizar substâncias que são empregadas para sua própria proteção contra fungos, bactérias, ação oxidativa, predadores ou até mesmo outras plantas (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009; MAGADUM; MONDAL; GHOSH, 2009; ANDRADE et al., 2016; ANDRADE; PONCELET; FERREIRA, 2017). Algumas dessas substâncias se tornaram modelo para o desenvolvimento de princípios ativos de pesticidas sintéticos, como a nicotina (EL-WAKEIL, 2013), enquanto que mais atualmente os próprios extratos de algumas plantas são utilizados como princípio ativo de pesticidas botânicos (ISMAN, 2006). Os compostos bioativos encontrados nesses vegetais são considerados promissores para a descoberta de novos acaricidas botânicos naturais, porém poucas espécies de plantas tem sido utilizadas para a produção de pesticidas botânicos (DUBEY, 2011).

Os compostos bioativos vegetais quando utilizados no controle de pragas oferecem várias vantagens quando comparados aos produtos sintéticos, como a rápida degradação de seus resíduos, apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade contra organismos não-alvos, além de retardarem a seleção de carrapatos resistentes (pela ação sinérgica de seus compostos e diversos mecanismos de ação de cada um) (RATTAN, 2010; PAVELA, 2011). Entre os mecanismos de ação encontrados nesses compostos são encontrados a ação repelente, inibidores de alimentação e crescimento além de afetarem a postura e o desenvolvimento embrionário. (PAVELA; HERDA, 2007; PAVELA, 2011; RAMIREZ et al., 2013;

BENELLI; PAVELA, 2018). O desenvolvimento de novos acaricidas que se adequam aos rígidos critérios para o desenvolvimento de acaricidas botânicos comerciais se iniciam em uma triagem primária da atividade biológica desses vegetais. Para isso, ensaios de atividade acaricida, como o utilizado neste estudo, têm sido importantes para a descoberta de possíveis métodos de controle de pragas e parasitas. Todavia esses experimentos são bastante laboriosos e dispendem de muito tempo para sua execução (BENELLI et al., 2016).

O teste utilizado neste estudo foi o de imersão de larvas (TIL) que possui como vantagem a alta sensibilidade comparado ao teste de pacote (TPL). Isso se deve a imersão direta das larvas nas soluções a serem testadas possibilitando uma maior percepção dos efeitos de mortalidade mesmo em concentrações muito baixas (SINDHU; JONSSON; IQBAL, 2012). Castro-janer e colaboradores (2010) observaram esse efeito ao determinar a letalidade do acaricida comercial fipronil no carrapato bovino *R. microplus*, verificando que em mesmas concentrações o teste de imersão apresentava uma maior mortalidade quando comparado ao teste de pacote de larvas.

O teste de imersão também apresenta maior sensibilidade em testes de virulência de fungos em carrapatos bovinos como observado por Quinelato e colaboradores (2012) Nesse estudo os autores observaram uma maior mortalidade das larvas testadas por imersão, comparado a metodologia de suspensão usualmente utilizada. Camargo e colaboradores(2012). utilizando a mesma metodologia descrita por Quinelato(2012) verificou uma mortalidade 20% maior no teste de imersão quando comparado aos testes de suspensão e até mesmo o teste de pacote de larvas. Já Webster e colaboradores(2018) observaram que além de apresentar maior mortalidade que o teste de TPL, o TIL também matava as larvas mais rapidamente. Essas características conferem ao teste uma maior vantagem na descoberta de novas moléculas a serem testadas para determinado efeito no controle de pragas, como no caso deste estudo.

Os dados do experimento das espécies mono e heteróxenas também demonstram um alto potencial carrapaticida dos óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bunesia sarmientoi*, já que em todos os testes houve mortalidade maior que 90% na concentração de 10%(v/v). No caso do óleo essencial de *Schinus molle* seu efeito larvicida foi encontrado para o carrapato bovino (*R. microplus*)

tratado por anos com acaricidas comerciais, além de ser efetivo na atividade larvicida para três outras espécies de carrapatos (*R. evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus*).

Os perfis de mortalidade das larvas testadas com os compostos isolados (alpha-phelandreno e sabineno) não demonstraram diferença significativa quando comparados com o perfil causado pelo óleo de *S. molle* para as três espécies de carrapatos heteróxenos. Isso pode indicar que o efeito larvicida do óleo puro possivelmente é derivado da soma dos efeitos de cada substância que o compõe. A soma de cada mecanismo de ação dos componentes presentes no óleo essencial de *S. molle* foi também encontrada na ação bactericida contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Salmonella* genus (HAYOUNI et al., 2008; DE MENDONÇA ROCHA et al., 2012). Todavia seu óleo essencial apresenta especial toxicidade à artrópodes considerados pragas para agricultura e também pecuária. São relatadas alta eficiência desse composto no controle de *Trogoderma granarium*, *Tribolium castaneum*, *Triatoma infestans*, *Blatta orientalis*, *Ctenocephalides felis felis*, *Trissolcus basalus* e *Rhynchophorus ferrugineus* (FERRERO; WERDIN GONZÁLEZ; SÁNCHEZ CHOPA, 2006; ABDEL-SATTAR et al., 2010; DEVECI et al., 2010; WERDIN GONZÁLEZ et al., 2013; RIZWAN-UL-HAQ; ALJABR, 2015; DE BATISTA et al., 2016). Esse óleo ainda apresenta efeitos medicinais como atividade anti-oxidante, antidepressivo e também anti-câncer (MACHADO et al., 2007; BENDAOUD et al., 2010; MARTINS et al., 2014).

Dentre os testes de atividade larval, o óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* demonstrou eficácia de 100% em todas as quatro espécies de carrapatos testados, na concentração de 10% (v/v). Pesquisas com esse óleo observaram principalmente sua atividade bactericida e fungicida (SALVAT et al., 2004; CASTILLO et al., 2012; HIEBERT et al., 2012; PEGARD, 2015), porém já foram relatados efeitos antileishmania, anticâncer e também atividade pesticida para diferentes artrópodes (ARIAS; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1992; ANDRADE et al., 2016; WANG et al., 2018; IKBAL; PAVELA, 2019).

Os testes realizados nesta tese nos levam a acreditar que o uso destes óleos essenciais e seus componentes são possíveis de serem capazes de controlar a infestação de carrapatos. Por serem compostos naturais, estes podem apresentar como vantagens o fato de serem em sua maioria biodegradáveis,

diminuírem a contaminação de resíduos na carne e no leite, além de agirem na maioria das vezes de modo sinérgico, diminuindo assim o processo de seleção de carrapatos resistentes. Porém ainda são necessários maiores estudos para compreender os mecanismos de ação destas moléculas em potencial.

## 8. CONCLUSÕES

Nesta tese podemos concluir que:

Os carrapatos da espécie *R. microplus* da linhagem que nunca teve contato com carrapaticida a partir da concentração de 0,01% apresentou mortalidade superior a 90% para a todos os tratamentos com os óleos essenciais de *Schinus molle*, *Bulnesia sarmientoi* e os compostos alpha-phellandreno e guaiol. Os compostos sabineno, e bulnesol apresentaram essa mortalidade acima da concentração de 0,1%.

Os carrapatos da espécie *R. microplus*, com histórico de utilização de acaricidas, demonstraram mortalidade abaixo de 50% para as concentrações de 0,01; 0,1 e 1% para os tratamentos de *S. molle*, alpha-phellandreno, sabineno e guaiol, ainda assim a concentração de 10% é capaz de eliminar < 90% das larvas. Para os tratamentos com *B. sarmientoi* e bulnesol, a concentração de 1% já apresenta essa mortalidade.

Os óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi* apresentaram uma atividade larvicida para os carrapatos heteróxenos, com o seguinte perfil:

Para o carrapato *R. appendiculatus*, as concentrações de 0,01; 0,1 e 1 % foram letais a <50% das larvas. Os óleos essenciais de *B. sarmientoi* e seu composto bulnesol foi capaz de eliminar acima de 95% das larvas na concentração de 10%.

O carrapato *R. pulchellus* apresentou mortalidade abaixo de 50% nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1% para os diferentes tratamentos. Apenas os tratamentos com *B. sarmientoi* e bulnesol alcançaram mortalidade acima de 95% na concentração de 10%.

Para o carrapato *R. evertsi*, heteróxico com maior tolerância encontrado, o óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* e seus compostos guaiol e bulnesol demonstraram alta eficiência na concentração de 10% atingindo mortalidade maior que 95%.

Possivelmente a tolerância apresentada pelo carrapato *R. evertsi*, pode estar relacionada com o fato dessa espécie ser a mais generalista dentre as três

espécies africanas testadas, sendo capaz de sobreviver em diferentes tipos de ambientes e assim sofrer uma maior pressão seletiva dos fatores abióticos.

Mesmo em diferentes concentrações os óleos essenciais de *Schinus molle* e *Bulnesia sarmientoi*, assim como seus compostos são capazes de apresentar atividade larvicida para as espécies de carrapatos aqui testadas. Dos compostos testados que pertencem aos óleos essenciais, o composto extraído da *B. sarmientoi*, o Bulnesol apresenta maior efeito larvicida contra as espécies de *R. microplus*, *R. evertsi*, *R. appendiculatus* e *R. pulchellus*. Causando mortalidade acima de 95% das lavas na concentração de 10%, sendo uma molécula com potencial para futuros estudos que visam à formulação de novos métodos de controle para esses carrapatos.

## 9. LITERATURA CITADA

ABDEL-SATTAR, E. et al. Chemical composition , insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L . leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. v. 6419, n. December 2016, 2010.

ADJOU MOUMOUNI, P. F. et al. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of veterinary important tick-borne pathogens in cattle from *Rhipicephalus microplus*-invaded and non-invaded areas of Benin. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 450–464, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.12.015>>.

ALONSO-DÍAZ, M. et al. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodídeos Ixodidae resistance of the the *Boophilus microplus* tick to ixodídeos. **Arch. Med.**, v. 38, n. 2, p. 105–113, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2006000200003](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200003)>.

AMZATI, G. S. et al. Mitochondrial phylogeography and population structure of the cattle tick *Rhipicephalus appendiculatus* in the African Great Lakes region. p. 1–19, 2018.

ANDERSON, J. F. The natural history of ticks. **Medical Clinics of North America**, v. 86, n. 2, p. 205–218, 2002.

ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**, v. 204, p. 38–45, 2017.

ANDRADE, M. A. et al. Essential oils : in vitro activity against *Leishmania amazonensis* , cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9>>.

ANGUS, B. M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1341–1355, 1996.

ARIAS, A. R. De; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Feeding Deterrence and Insecticidal Effects of Plant Extracts on *Lutzomyia longipalpis*. v. 6, n. March 1991, p. 64–67, 1992.

AYVAZ, A. et al. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. **Journal of insect science (Online)**, v. 10, n. 21, p. 21, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3014752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BARBOSA, J.; PASSOS, C.; AZEVEDO, B. De. Ticks and Tick-borne Diseases Influence of the physiological state on infestation by *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1–2, p. 52–56, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.07.003>>.

BARROS, A. T. . et al. Horn fly (Diptera: Muscidae) resistance to organophosphate insecticides. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 243–256, abr. 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401700004350>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

BENDAOUD, H. et al. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 466–472, 2010.

BENELLI, G. et al. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2545–2560, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5095-1>>.

BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, n. December 2017, p. 47–54, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.025>>.

BROGDON, W. G.; BARBER, A. M. Fenitrothion-deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 2, p. 130–139, 1990.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. et al. Plant extracts in control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 18, n. 4, p. 44–48, 2009.

BROWNING, T. O. The aggregation of questing ticks,. 1976.

ÇAĞATAY, N. S. et al. Biochemical and molecular characterizations of cypermethrin resistance in laboratory-selected cypermethrin-resistant strains of *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae). **International Journal of Acarology**, v. 44, n. 6, p. 262–267, 18 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01647954.2018.1500641>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

CAMARGO, M. G. et al. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 140–147, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.012>>.

CASTILLO, F. et al. Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants. **Fungicides for Plant and Animal Diseases**, 2012.

CASTRO-JANER, E. et al. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3–4, p. 300–306, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.036>>.

CHEN, X. et al. The cross-resistance patterns and biochemical characteristics of an imidacloprid-resistant strain of the cotton aphid. **Journal of Pesticide Science**, v. 40, n. 2, p. 55–59, 2015.

COIMBRA-DORES, M. J. et al. Phylogenetic insights on Mediterranean and Afrotropical *Rhipicephalus* species (Acari: Ixodida) based on mitochondrial DNA.

**Experimental and Applied Acarology**, v. 75, n. 1, p. 107–128, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10493-018-0254-y>>.

COSSÍO-BAYÚGAR, R. et al. to P-450 Cytochrome Oxidase Expression in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–6, 2018.

CUI, F. et al. Recent Emergence of Insensitive Acetylcholinesterase in Chinese Populations of the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). v. 119, p. 878–883, 2006.

CUMMING, G. S. Comparing Climate and Vegetation As Limiting Factors for. **Ecology**, v. 83, n. 1, p. 255–268, 2002.

CUNLIFFE, N. The Variability of *Rhipicephalus pulchellus* (Gerstäcker, 1873), together with its Geographical Distribution. **Parasitology**, v. 6, n. 02, p. 204, 1913.

DAABOUB, J. et al. Evaluation of Chlorpyrifos Resistance and Biochemical Mechanisms of *Culex pipiens* in Five Localities of Grand Tunis Area , Northeast Tunisia. v. 6, n. 2, p. 2–4, 2017.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022–4034, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>>.

DE BATISTA, L. C. S. O. et al. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 627–638, 2016.

DE MENDONÇA ROCHA, P. M. et al. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *aguaribay* (*schinus molle* l.). **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12023–12036, 2012.

DEVECI, O. et al. Chemical composition , repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L . v. 4, n. December 2008, p. 2211–2216, 2010.

DONALD, A. D. Parasites , animal production and sustainable development. **Veterinary Parasitology**, v. 54, p. 27–47, 1994.

DONIZETE, C. et al. Carrapato dos Bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Cerrados Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br>>. Acesso em: 27 ago. 2019.

DORVAL, C.; BROWN, A. W. Inheritance of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 43, n. 5, p. 727–734, 1970.

DREW, M. L.; SAMUEL, W. M. Instar development and disengagement rate of engorged female winter ticks, *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae), following single- and trickle-exposure of moose (*Alces alces*). **Experimental and Applied Acarology**, v. 6, n. 3, p. 189–196, 1989.

DUBEY, N. K. **Natural Products in Plant Pest Management**. [s.l: s.n.]

EL-WAKEIL, N. E. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, n. 4, p. 125–149, 2013.

ESTRADA-PENÑA, A. Climate change decreases habitat suitability for some tick species (Acari: Ixodidae) in South Africa. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 70, n. 2, p. 79–93, 2003.

FERRERO, A. A.; WERDIN GONZÁLEZ, J. O.; SÁNCHEZ CHOPA, C. Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 5, p. 381–383, 2006.

FONSECA-GONZÁLEZ, I. et al. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 18–26, 2009.

FRAGA, A. B. et al. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6 suppl 1, p. 1578–1586, dez. 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982003000700006&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982003000700006&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 27 ago. 2019.

FULAR, A. et al. Establishment of a multi-acaricide resistant reference tick strain (IVRI-V) of *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1184–1191, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.014>>.

FURLONG, J. **Carrapato : problemas e soluções Editor**. [s.l.: s.n.]

GAO, A. C. et al. Mechanism of Fipronil Resistance in *Laodelphax striatellus* ( Hemiptera : Delphacidae ). v. 49, n. 1, p. 1–10, 2019.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. **Ticks: Biology, Disease and Control**, n. January 2008, p. 408–423, 2008.

GHOSH, S. et al. Characterization and establishment of a reference deltamethrin and cypermethrin resistant tick line ( IVRI-IV ) of *Rhipicephalus* ( *Boophilus* ) *microplus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 66–70, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.03.002>>.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; DE LA FUENTE, J. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: Present and future possibilities for integrated control - A review. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 1, p. 49–66, 2006.

GOTHE, R. et al. Studies on the ability of different strains or populations of female *Rhipicephalus evertsi evertsi* (Acarina: Ixodidae) to produce paralysis in sheep. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 53, p. 19–24, 1986. Disponível em: <<https://repository.up.ac.za/dspace/bitstream/handle/2263/42806/4gothe1986.pdf?sequence=1>>.

GUO, H. fang et al. Overexpression of carboxylesterase-1 and mutation (F439H) of acetylcholinesterase-1 are associated with chlorpyrifos resistance in *Laodelphax striatellus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 1–2, p. 8–13, 2013.

HAMEL, H. D.; GOTHE, R. Influence of infestation rate of tick-paralysis in sheep induced by *Rhipicephalus evertsi evertsi* Neumann, 1897. **Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 183–191, 1978.

HAYOUNI, E. A. et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 242–251, 2008.

HEDIMBI, M. et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the red-legged tick, *Rhipicephalus evertsi evertsi*. n. January, 2011.

HIEBERT, M. R. et al. Antimycobacterial activity of the ethanolic extract of the wood of *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex. Griseb. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 40, n. 1, p. 7–12, 2012.

HSU, J. et al. Molecular and biochemical mechanisms of organophosphate resistance in laboratory-selected lines of the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 1, p. 57–63, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.005>>.

IKBAL, C.; PAVELA, R. Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids. **Journal of Pest Science**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10340-019-01089-6>>.

ISMAN, M. B. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. **Annual Review of Entomology**, v. 51, n. 1, p. 45–66, 2006.

JAMROZ, R. C. et al. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 5, p. 685–695, 2000.

KLAFKE, G. M. et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 386–390, 2006.

KLAFKE, G. M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência**, n. October, p. 81–106, 2008.

LI, A. Y. et al. Resistance to Coumaphos and Diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and Evidence for the Involvement of an Oxidative Detoxification Mechanism. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 4, p. 482–490, 2003.

LIN, Y. et al. Circadian regulation of permethrin susceptibility by glutathione S-transferase (*BgGSTD1*) in the German cockroach (*Blattella germanica*). **JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY**, v. 65, p. 45–50, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.001>>.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 2, p. 421–428, 2007.

MAGADUM, S.; MONDAL, D. B.; GHOSH, S. Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. **Parasitology research**, v. 105, n. 4, p. 1085–91, out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557436>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

MANGIA, C. et al. Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an *Ixodes ricinus* cell line. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.

MARTINS, M. D. R. et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485–492, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.063>>.

MONDAL, D. B.; SARMA, K.; SARAVANAN, M. Upcoming of the integrated tick control program of ruminants with special emphasis on livestock farming system in India. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1–2, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.05.006>>.

MUTHUSAMY, R.; SHIVAKUMAR, M. S. Resistance selection and molecular mechanisms of cypermethrin resistance in red hairy caterpillar ( *Amsacta albistriga* walker ). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 117, p. 54–61, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.10.009>>.

NENE, V. et al. Ticks and Tick-borne Diseases The biology of *Theileria parva* and control of East Coast fever – Current status and future trends. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 549–564, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.001>>.

OGDEN, N. H.; MECHAI, S.; MARGOS, G. Changing geographic ranges of ticks and tick-borne pathogens: drivers, mechanisms and consequences for pathogen diversity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. August, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00046/abstract>>.

OLDS, C. L.; MASON, K. L.; SCOLES, G. A. *Rhipicephalus appendiculatus* ticks transmit *Theileria parva* from persistently infected cattle in the absence of detectable parasitemia: Implications for East Coast fever epidemiology. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.

OLWOCH, J. M. et al. Climate change and the genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae) in Africa. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 74, n. 1, p. 45–72, 2007. Disponível em: <<http://ojvr.org/index.php/ojvr/article/view/139>>.

PAVELA, R. Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Fabricius) adults. **Industrial Crops and**

**Products**, v. 34, n. 1, p. 888–892, 2011. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.014>>.

PAVELA, R. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3835–3853, 2015.

PAVELA, R.; HERDA, G. Repellent effects of pongam oil on settlement and oviposition of the common greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* on chrysanthemum. **Insect Science**, v. 14, n. 3, p. 219–224, 2007.

PEGARD, A. Antimicrobial activity of essential oil of *Bulnesia sarmienti* Lorenz (Gaiac Wood) and of a rectified fraction of this oil. Comparison with *Melaleuca alternifolia* L. (Tea Tree) essential oil activity. *Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Bulnes*. **Phytothérapie**, v. 13, n. 6, p. 384–388, 2015.

PERRY, B. D. et al. Estimating the distribution and abundance of *Rhipicephalus appendiculatus* in Africa. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 11, n. 3–4, p. 261–268, 1991.

QUINELATO, S. et al. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3–4, p. 556–565, 2012. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.028>>.

RAMIREZ, A. M. et al. Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in *Pyrethrum* (*Tanacetum cinerariifolium*). **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

RASOOL, A. et al. An independent occurrence of the chimeric P450 enzyme CYP337B3 of *Helicoverpa armigera* confers cypermethrin resistance in Pakistan. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, p. 54–65, 2014.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913–920, 2010. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>>.

RAYMOND-DELPECH, V. et al. Ion channels: Molecular targets of neuroactive insecticides. **Invertebrate Neuroscience**, v. 5, n. 3–4, p. 119–133, 2005.

REHAV, Y.; KNIGHT, M. M.; NORVAL, R. A. I. Life Cycle of the Tick *Rhipicephalus evertsi evertsi* Neumann (Acarina: Ixodidae) under Laboratory Conditions. **The Journal of Parasitology**, v. 63, n. 3, p. 575, 2006.

RIZWAN-UL-HAQ, M.; ALJABR, A. M. *Rhynchophorus ferrugineus* midgut cell line to evaluate insecticidal potency of different plant essential oils. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 51, n. 3, p. 281–286, 2015.

ROSARIO-CRUZ, R. et al. Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 1145–1153, 2009.

RUTTANAPHAN, T.; PLUEMPANUPAT, W.; BULLANGPOTI, V. Cypermethrin resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) from three locations in Thailand and detoxification enzyme activities. **Agriculture and Natural**

**Resources**, v. 52, n. 5, p. 484–488, 2018. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.10.014>>.

SALVAT, A. et al. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2–3, p. 230–234, 2004.

SANDS, A. F. et al. Effects of tectonics and large scale climatic changes on the evolutionary history of Hyalomma ticks. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 114, p. 153–165, 2017. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.06.002>>.

SCHNEIDER, B. et al. An independent occurrence of the chimeric P450 enzyme CYP337B3 of *Helicoverpa armigera* confers cypermethrin resistance in Pakistan. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, p. 54–65, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.07.006>>.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus Resistance, strain of *B. microplus* and an assessment of its spectrum. **B. Entomol .Res.**, v. 56, n. L 2400, p. 389–405, 1966.

SINDHU, Z. ud D.; JONSSON, N. N.; IQBAL, Z. Syringe test (modified larval immersion test): A new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 362–367, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.021>>.

SMITH, L. B. et al. CYP-mediated resistance and cross-resistance to pyrethroids and organophosphates in *Aedes aegypti* in the presence and absence of kdr. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. May, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357519304158>>.

SONENSHINEM DANIEL E.; ROE, R. M. **Biology of Ticks**. [s.l: s.n.]

SOUZA CONCEIÇÃO, R. et al. In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 275–282, 2017.

SOUZA, A. P. De et al. Resistance to cypermethrin and amitraz in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* on the Santa Catarina Plateau, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 133–136, 2012.

STONE, B. F.; BROWN, A. W. A. Mechanisms of Resistance to Fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied .\*. n. 1, p. 401–408, 1969.

TAN, A. W. L. et al. Sexual differences in the sialomes of the zebra tick, *Rhipicephalus pulchellus*. **Journal of Proteomics**, v. 117, p. 120–144, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.014>>.

VALLES, S. M.; DONG, K.; BRENNER, R. J. Mechanisms Responsible for Cypermethrin Resistance in a Strain of German Cockroach , *Blattella germanica*. v. 205, p. 195–205, 2000.

WALKER, A. R. et al. **Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species**. [s.l: s.n.]

- WALKER, J.; KEIRANS, J.; HORAK, I. **The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world.** [s.l: s.n.]
- WANG, H. et al. Bulnesia sarmientoi Supercritical Fluid Extract Exhibits Necroptotic Effects and Anti-Metastatic Activity on Lung Cancer Cells. 2018.
- WANG, L. et al. Cross-resistance and possible mechanisms of chlorpyrifos resistance in Laodelphax striatellus ( Fall en ). n. June, p. 1096–1100, 2010.
- WANG, Y. et al. Cross-Resistance and Glutathione-S-transferase- $\pi$  Levels among Four Human Melanoma Cell Lines Selected for Alkylating Agent Resistance. **Cancer Research**, v. 49, n. 22, p. 6185–6192, 1989.
- WANZALA, W. et al. The effect of essential oils of tagetes minuta and tithonia diversifolia on on-host behaviour of the brown ear tick rhipicephalus appendiculatus. **Livestock Research for Rural Development**, v. 30, n. 6, 2018.
- WEBSTER, A. et al. Comparative study between Larval Packet Test and Larval Immersion Test to assess the effect of Metarhizium anisopliae on Rhipicephalus microplus tick larvae. **Experimental and Applied Acarology**, v. 74, n. 4, p. 455–461, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10493-018-0235-1>>.
- WERDIN GONZÁLEZ, J. O. et al. Lethal and sublethal effects of four essential oils on the egg parasitoids Trissolcus basalis. **Chemosphere**, v. 92, n. 5, p. 608–615, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.066>>.
- WHYTE, S. K. et al. Cypermethrin exposure induces metabolic and stress-related gene expression in copepodid salmon lice ( Lepeophtheirus salmonis ). **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 20, p. 74–84, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2016.08.004>>.
- XI, J. et al. Elevated expression of esterase and cytochrome P450 are related with lambda-cyhalothrin resistance and lead to cross resistance in Aphis glycines Matsumura. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 77–81, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.002>>.
- XU, W. et al. Cypermethrin resistance conferred by increased target insensitivity and metabolic detoxification in Culex pipiens pallens Coq. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 77–82, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.01.008>>.
- YAN, A. D. et al. Proteomic Analysis Reveals Resistance Mechanism Against Chlorpyrifos in Frankliniella occidentalis ( Thysanoptera : Thripidae ) Proteomic Analysis Reveals Resistance Mechanism Against Chlorpyrifos in Frankliniella occidentalis ( Thysanoptera : Thripidae ). v. 108, n. 4, p. 2000–2008, 2019.
- ZAMANI, P.; SAJEDI, R.; MEMARIZADEH, N. Resistance mechanisms to chlorpyrifos in Iranian populations of the two- spotted spider mite , Tetranychus urticae Koch ( Acari : Tetranychidae ) Resistance Mechanisms to Chlorpyrifos in Iranian Populations of the Two-spotted Spider Mite , Tetranychus urt. n. May 2015, 2014.

ZHANG, S. et al. Cross-resistance and biochemical mechanisms of resistance to indoxacarb in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 85–89, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.011>>.

ZHANG, Y. et al. Synergistic and compensatory effects of two point mutations conferring target-site resistance to fipronil in the insect GABA receptor. **Nature Publishing Group**, n. August, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep32335>>.