

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FRANCINEA ALVES FONCECA DE SOUZA

**“AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EFICÁCIA “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*” DOS
ÓLEOS DE NEEM E LARANJA NO CONTROLE DO CARRAPATO DO BOI
Rhipicephalus (Boophilus) microplus (ACARI: IXODIDAE)”**

CURITIBA
2020

FRANCINEA ALVES FONCECA DE SOUZA

1
2
3
4
5
6
7
8 **COMPARATIVE EVALUATION OF THE “*IN VITRO*” AND “*IN VIVO*” EFFICACY**
9 **OF NEEM AND ORANGE OILS IN THE CONTROL OF THE CATTLE TICK**
10 ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

11
12
13
14 Tese apresentada ao Programa de
15 Pós-Graduação em Ciência Animal,
16 área de concentração Saúde e Bem-
17 Estar, da Escola de Ciências da Vida
18 da Pontifícia Universidade Católica do
19 Paraná, para obtenção do título de
20 Doutor em Saúde, Tecnologia e
21 Produção Animal Integrada.

22
23 Orientador: Prof. Dr. Gervasio Henrique
24 Bechara

25
26 Coorientador: Prof. Dr. Saulo Henrique
27 Weber

28
29
30
31 **CURITIBA**

32 **2020**
33

1 **FICHA CATALOGRÁFICA (solicitar à Biblioteca)**

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Souza, Francinea Alves Fonceca

COMPARATIVE EVALUATION OF THE “*IN VITRO*” AND “*IN VIVO*” EFFICACY OF NEEM AND ORANGE OILS IN THE CONTROL OF THE CATTLE TICK *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* (ACARI: IXODIDAE). Curitiba, 20. 99p.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, 2. *Citrus sinensis*, 3. *Azadirachta indica*, 4. Neem, 5. Botanical acaricide. I. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Centro de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

21
22

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

1		
2		
3	SUMÁRIO.....	v
4	DEDICATÓRIA.....	vi
5	AGRADECIMENTOS	vii
6	FORMATO DA TESE.....	viii
7	RESUMO GERAL	ix
8	CAPÍTULO 1	1
	INTRODUÇÃO	1
9	CAPÍTULO 2	15
10	<i>Eficácia in vitro de Cipermetrina, Óleo de Neem (Azadirachta indica) e Óleo de</i>	
11	<i>Laranja (Citrus sinensis) no controle de larvas de carrapatos Rhipicephalus</i>	
12	<i>microplus.</i>	15
13	CAPÍTULO 3	29
14	<i>Avaliação comparativa da eficácia “in vivo” e “in vitro” dos Óleos de Neem</i>	
15	<i>(Azadirachta indica) e Laranja (Citrus sinensis) no controle do carrapato do boi</i>	
16	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae).</i>	46
17	CAPÍTULO 4	47
18	<i>Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of Ageratum....</i>	47
19	<i>conyzoides on the oogenesis of Rhipicephalus microplus.</i>	47
20	CAPÍTULO 5	57
21	TESTE IN VITRO SOBRE O CONTROLE DE LARVAS DO CARRAPATO DO CÃO	
22	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> SUBMETIDAS AO ESPINOSADE E INDOXACARBE	
23	CAPÍTULO 6	73
24	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
25	REFERÊNCIAS.....	75
26	ANEXO (S).....	79
27	A. Parecer de aprovação da CEUA- PUCPR.....	79
28	B. Normas da REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA	80
29		
30		
31		
32		
33		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Dedico este trabalho ao meu Amado Pai, minha Adorada Mãe e a minha linda família que com supervisão da providência Divina me escolheram para auxiliar e amar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida, livre arbítrio, abundância e grande prosperidade.

Aos meus Pais que desde a mais tenra idade nos mostrou a importância da educação independentemente da condição social, econômica ou cultural e, que sempre apoiaram, incentivaram e aplaudiram as conquistas de seus filhos.

Agradeço ao Professor Gervásio Bechara de inteligência, doçura e paciência incomparáveis com as quais orienta, auxilia, ensina e cativa de forma espontânea.

Ao Professor Saulo Weber, que com bom humor e o dom de aclarar a matemática das coisas torna o entendimento e a pesquisa mais fácil e prazerosa.

A Bianca Moreira, amiga de trabalho que com sua técnica auxiliou com mestria na execução de preparos, análises, contagens e o que fosse necessário para obtenção dos mais legítimos resultados.

Ao Sr. Milton Braida com sua visão estratégica das coisas fazendo-as práticas e salutares.

Ao meu marido Julio, cujo apoio e amor foram primordiais para o desfecho deste trabalho, renunciando as horas vagas e finais de semana para auxiliar nas pesquisas à campo, acompanhando visitas a fazendas ou simplesmente cuidando dos filhos para que os compromissos com a Universidade fossem cumpridos.

Aos meus filhos, criaturas divinas e com amor incondicional aos animais. Me fazem sempre lembrar que o exemplo a ser dado é o do trabalho e estudo.

Agradeço aos meus queridos colegas de trabalho que se revezaram no cuidado as estufas, na coleta de espécimes, no auxílio aos alunos de iniciação científica e tantas outras demonstrações de amizades.

A DEXTER LATINA cujo apoio e aportes foram primordiais a execução deste trabalho.

FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por 6 capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, a justificativa e os objetivos de estudo. O capítulo 2 refere-se a artigo científico *Eficácia in vitro de Cipermetrina, Óleo de Neem (Azadirachta indica) e Óleo de Laranja (Citrus sinensis) no controle de larvas de carrapatos Rhipicephalus microplus.*

O capítulo 3 refere-se a artigo científico Avaliação comparativa da eficácia “in vivo” e “in vitro” dos Óleos de Neem (*Azadirachta indica*) e Laranja (*Citrus sinensis*) no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).

O capítulo 4 refere-se a artigo científico Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus* (Kumar et al.2019) publicado no periódico Ticks and Tick-borne Diseases.

O capítulo 5 refere-se ao capítulo do livro Atualidades em Medicina Tropical no Brasil publicado pela Senso Strictu Editora e intitulado TESTE IN VITRO SOBRE O CONTROLE DE LARVAS DO CARRAPATO DO CÃO *Rhipicephalus sanguineus sensu lato.*

O capítulo 6 finaliza esta tese com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros. As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da tese.

RESUMO GERAL

1
2
3 O carrapato do boi *Rhipicephalus microplus* apresenta importância
4 econômica e sanitária para o rebanho bovino no Brasil e outros países tropicais e
5 subtropicais. Apesar dos esforços empregados na busca de formas alternativas de
6 controle de carrapatos, o uso dos acaricidas químicos ainda são a eleição para
7 controle de carrapatos, porém o controle pelo uso de produtos químicos apresenta
8 inconvenientes como o desenvolvimento de resistência , seja pelo uso excessivo ou
9 pela pressão de seleção aonde os ácaros mais resistentes sobrevivem aos
10 tratamentos, presença de resíduos em carne e leite, ação tóxica aos animais e
11 aplicadores, danos ambientais por contaminação do solo, bem como a ação em
12 organismos não-alvo. Frente à necessidade de sanar ou ao menos mitigar estes
13 inconvenientes este trabalho objetivou investigar a eficácia de produtos de origem
14 botânica, mais especificamente a eficácia dos óleos de neem (*Azadirachta indica*) e
15 de laranja (*Citrus sinensis*) no controle de carrapatos da espécie *R. (B.) microplus*
16 em bovinos.

17 Inicialmente traçou-se delineamento experimental em laboratório
18 empregando o teste de pacote de larvas (TPL) para determinar a concentração letal
19 (CL) necessária para eliminar 95% dos carrapatos e assim, pré-estabelecer a
20 concentração a ser utilizada a campo, em rebanhos naturalmente infestados. Os
21 ensaios laboratoriais de TPL foram feitos em quadruplicata e com o uso de quatro
22 diferentes concentrações dos ingredientes ativos (i.a.). As larvas foram então
23 utilizadas no bioensaio *in vitro* em TPL comparando-se os óleos de neem e de
24 laranja formulados na forma de concentrado emulsionável e diluídos em água para
25 obtenção das dosagens finais de 9.600 µg, 4.800 µg, 2.400 µg e 1.200 µg i.a. Como
26 controle positivo, utilizou-se cipermetrina aplicada da mesma maneira como
27 concentrado emulsionável e diluído para obtenção das dosagens de 600 µg; 300 µg;
28 150 µg e 75 µg i.a. e água deionizada como controle negativo. Os resultados
29 mostraram que as concentrações letais (CL) CL50 e CL75 para cipermetrina foram
30 atingidas com 50 e 193 µg i.a, respectivamente. O tratamento com óleo de neem
31 apresentou as seguintes concentrações letais CL50 3.829 µg, CL75 7.723 µg e CL80
32 de 8.905 µg i.a. Com as CLs obtidas, a dosagem de ingrediente ativo a ser utilizada
33 para obter uma CL90 e CL95 , foram de respectivamente 12.725 µg e 17.645 µg i.a.

1 Para óleo de laranja as CL50, CL75 e CL80 foram de respectivamente 4.344 µg,
2 8.000 µg e 8.848 µg i.a. e, de acordo com as projeções estatísticas, as dosagens
3 para obtenção de CL90 e CL95 devem ser de 10.775 µg e 11.909 µg i.a.,
4 respectivamente.

5 A partir do ensaio das CL realizou-se o ensaio *in vivo*, utilizando-se
6 apenas os óleos essenciais; e as concentrações de óleo de laranja e de neem de
7 17.645 µg i.a. e de 11.909 µg i.a. foram arredondadas para 18.000 µg i.a. e 12.000
8 µg i.a., respectivamente. Como controle negativo foram mantidos animais separados
9 sem tratamento. Para o teste a campo utilizou-se 80 ml de produto na forma de
10 concentrado emulsionável (CE) para um litro de água e aplicado na forma de spray
11 em 24 bovinos da raça Red Angus distribuídos em três grupos com 8 animais cada,
12 sendo um grupo tratado com óleo de neem, outro grupo com óleo de laranja e grupo
13 controle pulverizado com água potável disponível na fazenda. As curvas dose-
14 resposta foram comparadas entre óleo de neem, óleo de laranja e controle. As
15 variáveis analisadas foram o número de carrapatos aderidos ao corpo do animal em
16 um, cinco e sete dias após o tratamento, estimando-se assim o número de
17 carrapatos caídos (*Knock down* - KD). O tratamento quanto ao tempo KD dos
18 carrapatos foi analisado e mostrou diferença significativa ($p < 0,01$ ou $0,05$) entre os
19 grupos controle e os grupos tratados, sendo o KD50 8,38 horas para o óleo de neem
20 e 9,36 horas para o óleo de laranja. Os resultados deste estudo demonstraram que
21 os produtos botânicos obtidos a partir dos óleos de neem e laranja podem ser
22 empregados em formulações carrapaticidas na forma de concentrado emulsionável
23 para controlar carrapatos *Rhipicephalus microplus* em condições a campo,
24 salvaguardados ensaios de segurança alimentar e toxicológicas. A extrapolação dos
25 ensaios deve ser feita em bovinos de outras raças e regiões para confirmar a
26 eficácia interespecies, bem como ensaios de segurança química e alimentar
27 submetidos de forma regulatória aos fármacos destinados ao tratamento animal.

28

29 **Palavras-chave,** *Citrus sinensis*, *Azadirachta indica*, *Azadiractina*, acaricida
30 botânico, Óleo essencial, fitoquímicos.

31

ABSTRACT

1
2
3 The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cattle tick is of great economic
4 and health importance for the bovine herd in Brazil and in several other tropical and
5 subtropical countries. Despite the efforts made in the search for alternative forms of
6 tick control, chemical acaricides are still the most widely used conventional method,
7 but this type of control presents drawbacks such as the development of tick
8 resistance to products, presence of residues in meat and milk, toxic action to animals
9 and applicators, environmental damage due to soil contamination and action on non-
10 target organisms, among others. In view of the need to remedy or at least mitigate
11 these inconveniences, the present work sought to investigate the effectiveness of
12 products of botanical origin, more specifically the effectiveness of neem (*Azadirachta*
13 *indica*) and orange (*Citrus sinensis*) oils in controlling ticks of the species *R.*
14 *microplus* in cattle, initially outlining an experimental laboratory design using the
15 larval pack test (TPL) to determine the lethal concentration (CL) necessary to
16 eliminate 95% of ticks and pre-establish the optimal concentration to be used field in
17 naturally infested herds. Laboratory tests for TPL were performed in quadruplicate
18 using four different concentrations of the active ingredients (i.a.). The *R. microplus*
19 larvae, obtained from engorged females from a tick colony maintained by EMBRAPA
20 - Gado de Corte, Campo Grande (MS), Brazil, and kept in our laboratories under
21 controlled conditions of temperature ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), relative humidity (80-90%) and a
22 12-hour photoperiod until use two weeks after the eggs hatch. The larvae were then
23 used in the in vitro TPL bioassay comparing neem and orange oils with cypermethrin
24 in microgram dosages of active ingredient (μg a.i.) of 9,600, 4,800, 2,400 and 1,200
25 for formulations of neem and of orange oils. Cypermethrin was used as positive
26 control, at doses of 600; 300; 150 and $75\mu\text{g}$ a.i. and deionized water as a negative
27 control. In this experiment, the amount of active ingredient needed to reach larval
28 mortality (lethal concentration-LC) was estimated in the percentages of 50%, 75%,
29 80%, 90% and 95%. The results showed that the LC50 and LC75 for cypermethrin
30 were reached with respectively 50 and $193\mu\text{g}$ a.i., not statistically reaching mortality
31 of 80% of the larvae, even with an empirical increase in the dosage of this asset. The
32 statistical data of the treatment with neem oil showed CL50, CL75 and CL80 with
33 respectively 3,829, 7,723 and 8,905 μg a.i., and according to statistical projections

1 the dosage of active ingredient to be used to obtain a CL90 and CL95 must be
2 12,725 and 17,645 µg a.i., respectively. For orange oil, the CL50, CL75 and CL80
3 were 4,344, 8,000 and 8,848 µg a.i., respectively, and according to the statistical
4 projections the dosages for obtaining CL90 and CL95 should be 10,775 and 11,909
5 µg a.i., respectively.

6 With these results, the in vivo test was performed using only the
7 essential oils. In the field trial, a new in vitro laboratory test of TPL was performed to
8 confirm the lethal concentrations of neem and orange oils. The tests indicated as the
9 best dosages the concentrations 18,000 µg i.a. (rounding 17,645 µg) and 12,000 µg
10 i.a. (rounding up of 11,909 µg) of neem and orange, respectively, which were
11 applied, in formulations of the emulsifiable concentrated type (CE) and later used in
12 field tests in the form of spray on 24 Red Angus cattle distributed in three groups with
13 8 animals each. In the field test, dose-response curves were compared between
14 neem oil, orange oil and negative control (untreated). The variables analyzed were
15 the number of ticks adhered to the animal's body in one, five and seven days after
16 treatment, thus estimating the number of ticks that fell (Knock down KD). The
17 treatment for the KD time of ticks was analyzed and revealed a significant difference
18 between the control and treatment groups, with 8.38 hours KD50 for neem oil and
19 9.36 hours for orange oil. The results of this study demonstrated that botanical
20 products such as neem and orange oils can be used in tick formulations in the form
21 of emulsifiable concentrate and used to control *R. microplus* ticks in field conditions
22 as an ecofriendly method in order to decrease or even avoid possible resistance of
23 ticks to applications of synthetic acaricides. The extrapolation of the tests should be
24 done in cattle of other breeds and regions to confirm the interspecies effectiveness,
25 as well as chemical and food safety tests submitted to any drugs intended for
26 commercial distribution.

27

28 **Keywords:** *Rhipicephalus microplus*, *Citrus sinensis*, *Azadirachta indica*,
29 *Azadirachtin*, acaricide, botanical

30

31

CAPÍTULO 1

1. CARRAPATO DO BOI – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rhipicephalus microplus, carrapatos monoxenos de distribuição sazonal em regiões tropicais e subtropicais, são hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, família Ixodidae, subgênero Boophilus. Os carrapatos de maior importância econômica e sanitária estão classificados principalmente em duas famílias: Ixodidae (carrapatos duros) e Argasidae (carrapatos moles) (Black & Piesman, 1994)¹. Os carrapatos Argasidae alimentam-se mais rapidamente e ingerem pequenos volumes de sangue por refeição, enquanto os carrapatos Ixodidae, alimentam-se por um intervalo maior de tempo e assim ingerem maiores quantidades de sangue, o que os torna ímpares entre os ectoparasitos devido ao seu longo período de fixação no hospedeiro (Sauer et al., 2000).

O carrapato do boi afeta a saúde animal acarretando impactos econômicos devido à perda de peso, perdas em produção de carne e leite e como vetor dos biopatógenos da tristeza parasitária bovina. Os danos causados pelos carrapatos têm sido reportados em muitos países tropicais e subtropicais estimando uma perda anual estimada de US\$ 22 a 30 bilhões de dólares (Lew-Tabor e Rodriguez Valle, 2016), sendo US\$3,4 bilhões apenas no Brasil, de acordo com Grisi et al. (2014).

Rhipicephalus microplus possuem um ciclo de vida com três estágios diferentes de desenvolvimento que são larva, ninfa e adultos, e requerem ingestão de sangue para mudar para o próximo estágio no mesmo hospedeiro. As larvas eclodem dos ovos num intervalo que pode variar em torno de 35 dias após postura, possuem tamanho de aproximadamente 0,05 mm e três pares de patas; nesta fase encontram-se na vegetação à procura de um hospedeiro, no qual completarão seu ciclo de vida. As ninfas são maiores que as larvas em tamanho, mas menores que os adultos, podem variar de 2 a 7mm e possuem quatro pares de patas; nesse estágio, começam a se parecer com a fêmea adulta, mas podem ser distinguida pela ausência de uma abertura genital na superfície ventral (Walker et al., 2003; Walker et al., 2005). Os

1 machos adultos, diferentemente das fêmeas, não necessitam se alimentar com
2 grandes aportes de sangue e por isso não ficam grandes períodos de tempos
3 nos hospedeiros, geralmente permanecendo no hospedeiro pelo tempo de
4 cópula. As fêmeas após a cópula, ingerem sangue pelo período de um a três
5 dias, passando para a fase de vida livre ou não-parasitária que ocorre a partir
6 do momento que caem ao solo para realizar a oviposição e reiniciar seu ciclo
7 biológico.

8 Os carrapatos ao fixarem-se ao hospedeiro perfuram sua pele e
9 podem causar a transmissão de patógenos através da saliva. De acordo com
10 Wikel (2013), à medida que as peças bucais perfuram a derme, a saliva
11 contaminada entra em contato com os vasos sanguíneos ocorrendo a interação
12 carrapato-hospedeiro-patógeno causando as chamadas doenças transmitidas
13 pelos carrapatos (DTCs ou TBDs na sigla em inglês).

14 Os principais patógenos intra-eritrocíticos responsáveis pelas
15 doenças hemolíticas transmitidas por carrapatos (DTCs) na espécie bovina são
16 os protozoários *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e a riquetsia *Anaplasma*
17 *marginale*, organismos historicamente associados, que podem causar doenças
18 hemolíticas persistentes, clinicamente relacionadas em bovinos, transmitidas
19 por carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Suarez & Noh, 2011).

20 Os hospedeiros possuem mecanismos de defesa para eliminar os
21 carrapatos, todavia a saliva dos artrópodes elabora respostas para escapar aos
22 mecanismos de defesa do hospedeiro. De fato, a saliva dos carrapatos contém
23 uma mistura complexa de moléculas que inibem a hemostasia, bloqueiam a dor
24 e o prurido, que são respostas à aderência ou à espoliação sanguínea,
25 angiogênese modulada e remodelação da matriz extracelular relacionada à
26 cicatrização de feridas, além de atuar como imunomoduladores na imunidade
27 inata ou adaptativa do hospedeiro (Wikel, 2013). Várias práticas vêm sendo
28 associadas para o controle de *R. (B.) microplus*, sendo que cada uma delas
29 apresenta inconvenientes dos pontos de vista imunológico, resistência
30 adquirida, resistência cruzada, custos de tratamento e manejo.

31

1 2. CONTROLE DE CARRAPATOS

2 2.1. Imunização induzida (Vacinas)

3

4 O uso de vacinas preconizando indução da imunidade por
5 antígenos está bem estabelecida como estratégia para controle de carrapatos,
6 sendo uma alternativa com custo aceitável e ambientalmente correta. Estudos
7 realizados nas décadas de 1980 e 1990 levaram ao desenvolvimento comercial
8 da vacina contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*, chamadas de TickGARD
9 e Tick-GARD Plus na Austrália (Willadsen et al. 1995b) e de GAVAC em Cuba
10 (Penichet et al. 1994; Rodriguez et al., 1995), porém sua eficácia variável e
11 proteção parcial tem levado a investigações e busca de novos antígenos
12 (McKenna, 1998). Csordas et al., (2018) descrevem a caracterização
13 imunológica de um multi-antígeno composto por dois antígenos *R. (B.)*
14 *microplus* (RmLTI e BmCG) e um antígeno de *Escherichia coli* (B subunidade
15 LTB) aplicados experimentalmente em gado da raça Angus reduzindo o
16 número de carrapatos fêmeas adultas em 6,29% e a vacinação alcançou
17 55,6% de eficácia para a infestação de *R. (B.) microplus*. No Uruguai, há uma
18 vacina refrigerada produzida pela DILAVE desde 1941 (Miraballes & Riet-
19 Correa, 2018).

20

21 2.2. Tratamento parcial seletivo

22

23 O tratamento parcial seletivo (TPS) ou Tratamento Seletivo de
24 Bovinos (TSB), também conhecido como controle seletivo do carrapato dos
25 bovinos é uma estratégia que propõe um novo formato em relação aos bovinos
26 e o uso adequado dos medicamentos além de viabilizar a implementação de
27 novas recomendações e tipos de manejo de acordo com a propriedade. Este
28 tratamento utiliza a resistência natural das raças zebuínas e preconiza que o
29 controle seja realizado somente em uma pequena parcela da população de
30 hospedeiros, geralmente os animais mais suscetíveis. O TPS não segue um
31 calendário fixo e não adota o tratamento em massa do rebanho para controle
do carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus* (Molento, 2020).

32
33

1 **2.3. Controle químico**

2

3 O controle químico é o método de eleição realizado através do
4 uso de acaricidas sintéticos também chamados de ectoparasiticidas, porém,
5 vem apresentando limitações em sua utilização em decorrência de seu uso
6 abusivo ou inadequado, aumentando a pressão de seleção de indivíduos e
7 levando ao desenvolvimento da resistência (Silva et al., 2000). O controle
8 efetivo pelo uso de ectoparasiticidas dá-se basicamente pela ação neurotóxica
9 dos componentes do fármaco sobre o sistema nervoso central dos insetos de
10 forma sistêmica ou por contato (Taylor, 2001).

11 Com base em sua estrutura química, os ectoparasiticidas podem
12 ser divididos em classes de produtos, segundo o modo de ação, como as
13 amidinas (amitraz) que agem nos receptores de octopamina dos insetos.
14 Inibidores de acetilcolinesterase, assim como os inseticidas carbamatos cujos
15 principais representantes são o carbaril e o propoxur.

16 O grupo das nitroguanidinas representado pelo imidacloprido que
17 age especificamente nos receptores colinérgicos nicotínicos (pós sinápticos), a
18 ligação causa descargas espontâneas impedindo a propagação dos impulsos
19 nervosos.

20 O grupo de organoclorados (OCs) como os compostos DDT,
21 aldrin, dieldrin e hexacloro benzeno entre outros, inibem reversivelmente a
22 acetilcolinesterase (AChE) e são considerados altamente prejudiciais e
23 persistentes no ambiente, de acordo com Zaffar et al. (2016) a ação
24 toxicológica dos OCs estão relacionadas à substituição do cloro na molécula.
25 Devido sua capacidade de solubilização em gorduras estes compostos
26 acumulam-se nos organismos (humanos e animais) e acarretam em patologias
27 como câncer e doenças hematopoiéticas, nefrotóxicas, hepatotóxicas e
28 reprodutivas. Além disso, eles também afetam o sistema hormonal e pode ter
29 efeitos interativos, produzindo efeitos androgênicos e estrogênicos. Em
30 invertebrados, causam desregulação endócrina, neurológica e
31 imunodeficiência.

32 A inibição da AChE pelos organofosfatos ocorre por meio de uma
33 reação química de bloqueio enzimático impedindo a fosforilação enzimática de

1 maneira análoga à acetilação da AChE impedindo a hidrólise da acetilcolina
2 causando hiperexcitabilidade e levando o inseto a paralisia e morte (Ajith
3 Kumar et al., 2019). As moléculas do grupo dos organofosforados agem por
4 inibição da acetilcolinesterase de forma irreversível e podem ser extremamente
5 tóxicos para animais e humanos devido ao seu efeito anticolinesterásico pela
6 inibição da enzima acetilcolinesterase levando ao acúmulo deste
7 neurotransmissor nas sinapses e com consequente exacerbação dos efeitos
8 colinérgicos, podendo ocasionar em mamíferos lacrimejamento, salivação,
9 sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios que podem
10 acarretar em morte.

11 Clorpirifós é um organofosforotioato com ação de contato,
12 ingestão e inalação, age no sistema nervoso dos insetos causando efeitos não
13 colinérgicos e efeitos colinérgicos pela inibição da quebra ou pela degradação
14 da acetilcolina (ACh). Diazinon é um inibidor da acetilcolinesterase (AChE), que
15 causa a hidrólise da ACh nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares
16 resultando em acúmulo de ACh no sistema nervoso; outros fosforados são
17 fosmet, fampur e fention.

18 Fenilpirazois como o fipronil são usados para controle de pulgas e
19 carrapatos em cães e gatos (Van der Sluijs, 2013) e seu modo de ação é pela
20 ligação aos canais de cloro, bloqueando a ativação da condução dos estímulos
21 nervosos, pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), causando alteração no fluxo
22 de íons cloro (Cl⁻) nos neurônios.

23 Piretróides como cipermetrina, deltametrina, fenvalerate,
24 flumetrina, lambda-cialotrina, fenotrina e permetrina entre outros, agem por
25 alteração nos canais de sódio e potássio das membranas neurais, causando
26 alteração do impulso elétrico no inseto levando a hipersensibilidade inicial
27 seguida por paralisia e morte dos insetos.

28 As benzoilfenilureias, representadas pelo diflubenzuron e
29 flufenoxuron e os derivados triazina e pirimidina, mais conhecidos como
30 ciromazinas, representam uma categoria de agentes controladores de insetos
31 por inibição da formação de quitina impedindo a ecdise ou expondo as partes
32 moles do corpo dos insetos levando-os à morte.

1 Metoprene e piriproxifeno são análogos ao hormônio juvenil que
2 impedem mudança de estágio larval por mimetização destes hormônios juvenis
3 (Oliveira et al., 2012) causando morte pela extensão do período larval.

4 Assim, conclui-se que há diversos grupos com diferentes
5 moléculas e modos de ação para controle de carrapatos, porém com vieses a
6 serem considerados para uso e desuso dos mesmos.

7 8 **2.4. Produtos Acaricidas - Origem Biológica**

9
10 Produtos obtidos através de processos fermentativos como as
11 lactonas macrocíclicas que, incluem as avermectinas, abamectinas,
12 doramectinas, eprinomectina, ivermectina, selamectina e milbemicinas oximas,
13 são derivados de microorganismos do solo pertencentes ao gênero
14 *Streptomyces* e possuem um potente e amplo espectro com doses
15 relativamente baixas. Espinosade é um ectoparasiticida biológico de amplo
16 espectro em baixas doses; obtido pela fermentação aeróbica do actinomiceto
17 *Saccharopolyspora spinosa* produzindo metabolitos naturais (espinosinas A e
18 D). Além da eficácia sobre insetos o espinosade possui excelente degradação
19 no solo, baixa toxicidade aos aplicadores tanto em uso agrícola como em
20 saúde animal (Davey et al, 2001).

21 22 **2.5. Produtos Acaricidas - Origem Botânica**

23
24 Produtos botânicos têm apresentado boas perspectivas quanto à
25 ação ectoparasiticida e vem sendo amplamente estudados como alternativa
26 aos produtos sintéticos devido a sua menor toxicidade para organismos não-
27 alvo, e efeitos tóxicos agudos a humanos e animais, possuem uma degradação
28 mais rápida pela luz do sol e detoxificação enzimática que pode ser de algumas
29 semanas até algumas horas, o que reduz a presença de resíduos e prevenção
30 do desenvolvimento de resistência contra substâncias ativas, geralmente
31 devido à ação entre os vários compostos e diferentes mecanismos de ação
32 destes produtos sobre os insetos (Ratan, 2010).

1 Extratos obtidos dos frutos de *Guarea kunthiana* e *Guarea*
2 *guidonia* da família *Melaceae* inibiram a eclosão das larvas na concentração de
3 apenas 0,2%. Costa Jr. et al. (2016) testaram a eficácia do óleo essencial de
4 *Lippia gracilis*, que apresenta como um dos componentes principais os
5 monoterpenos cravacol, timol e seus fitoquímicos, em linhagens de
6 *Rhipicephalus microplus* resistentes aos organofosforados, verificando que
7 estes monoterpenos foram 3,2 vezes mais tóxicos para a cepa resistente em
8 comparação à cepa suscetível quando aplicado no teste de pacote de larvas.
9 Kumar et al. (2016) compararam *in vitro* a eficácia de produtos comercialmente
10 disponíveis (Butox®) e fito-formulações recentemente desenvolvidas
11 (Zerokeet®, Erina EP®, NBA/13/B/2 e NAC-01) no controle de cepas
12 resistentes de *Rhipicephalus (B.) microplus* para mortalidade e redução da
13 capacidade de postura de ovos. Neste experimento foi observado a eficácia
14 máxima em NBA / 13 / B / 2 (82,4-91,3%), seguido pelo NAC-01 (62,3-94,6%),
15 Zerokeet® (41,8-75,4%), Erina-EP® (4,7–14,8%) com menor eficácia de 1,5–
16 6,2% observada em carrapatos tratados com Butox Vet®. Andreotti et al.
17 (2013) estudaram a ação protetora do óleo essencial derivado de *Tagetes*
18 *minuta* para controle de *Rhipicephalus microplus* em bezerros da raça
19 Holandesa. A composição química deste óleo essencial revelou a presença de
20 quatro componentes que ao todo, representam mais de 70% do óleo essencial,
21 sendo eles o limoneno (6,96%), -ocimeno (5,11%), di-hidrotagetona (54,10%) e
22 tagetona (6,73%). Os ensaios a campo indicaram diferenças significativas entre
23 os valores médios do número de carrapatos, peso médio dos carrapatos, peso
24 médio dos ovos por fêmea ingurgitada e viabilidade larval e apresentaram
25 eficácia de 99,98% em comparação ao grupo controle quando utilizado na
26 concentração de 20% do óleo essencial). Matos et al. (2017) realizaram análise
27 fotoquímica e atividade acaricida de extratos frescos e desidratados de *Aloe*
28 *arborescens* Mill sobre *Rhipicephalus microplus*, obtidos com os solventes
29 etanol puro, mistura binária de etanol e diclorometano, e mistura ternária de
30 etanol, diclorometano e acetona, e concluíram que tais extratos continham
31 taninos hidrossolúveis apresentando atividade acaricida sobre os parâmetros
32 reprodutivos, tais como, taxa de postura e de eclosão de larvas.

1 Singh et al. (2018) avaliaram a eficácia do óleo de alecrim,
2 produto botânico comercial concentrado denominado Essentria® IC-3 contendo
3 10% de óleo essencial, foram comparados ao geraniol (5%) e óleo de hortelã-
4 pimenta (2%) com mecanismo de ação comprovado de bloqueador da
5 octopamina em cepas suscetíveis e resistentes do carrapato *Rhipicephalus*
6 *microplus* , através do teste do pacote de larvas de 14 a 21 dias de idade e
7 não alimentadas. Os resultados do Essentria® IC-3 em relação a mortalidade,
8 contendo geraniol em cepa suscetível foram de CL50 0,647% (0,59-0,69%
9 percentual de mortalidade) e 1,033% (0,94-1,19) para CL95, enquanto valores
10 de CL50 e CL95 para outras cepas variaram de 0,597-1,674% e 0,927-2,236%,
11 respectivamente . Pereira Junior et al. (2019) avaliaram a eficácia do carvacrol
12 como acaricida, em carrapatos fêmeas de *Rhipicephalus microplus* pelo teste
13 de imersão em adultos (TIA). A partir da CL 50 identificada, novo teste TIA foi
14 realizado nas concentrações de 20%, 40%, 60%, 80% e 100% para avaliação
15 dos parâmetros de peso da fêmea antes da oviposição, peso da massa de
16 ovos, período de pré-oviposição e incubação, porcentagem de eclosão, índice
17 de produção de ovos, taxa de fecundidade, reprodução estimada, redução da
18 oviposição e eclosão e eficácia do produto. Os resultados obtidos foram
19 eficácia do produto nos grupos tratados com 100% de mortalidade das fêmeas
20 e a CL50 foi de 61,10%.

21

22 **2.5.1. Óleo de Laranja (*Citrus sinensis*)**

23

24 A laranja *Citrus sinensis* L. (Myrtales: Myrtaceae) é nativa da Ásia
25 e atualmente distribuída em todas as regiões quentes (clima tropical) do
26 mundo. Manuel J. et al., (2016) relatam em sua revisão que vários tipos de
27 compostos químicos dos grupos flavonóides, esteróides, hidroxiamidas,
28 alcanos e ácidos graxos, cumarinas, peptídeos, carboidratos, carbamatos e
29 alquilaminas, carotenóides, compostos voláteis e elementos nutricionais
30 como potássio, magnésio, cálcio e sódio foram identificados nas frutas,
31 casca, folhas, suco e raízes de *C. sinensis*.

1



Figura 1 *Citrus sinensis* – Árvore de laranja – Lemoenboom (Fonte Sun Trees Krugersdorp)

2

3

4

Kumar et al. (2012) avaliaram a atividade inseticida de óleos essenciais de *C. sinensis* no controle de larvas de mosca doméstica *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) e verificaram atividade significativa sobre larvas e pupas apresentando uma taxa de inibição percentual de pupas de 27,3 a 72,7% de acordo com a toxicidade por contato e 46,4 a 100% através do ensaio por fumigação.

10

Em relação a ação carrapaticida do óleo de casca de *C. sinensis*, de acordo com Chungsamarnyart & Jansawan (1996) na concentração 1: 10 (V/V) apresentou uma alta atividade larvicida, sendo 1,5 vezes mais potente que d-limoneno. Habeeb et al. (2007) avaliaram o efeito do óleo essencial de *C. sinensis* em diferentes idades dos ovos de *Hyalomma dromedarii* utilizando quatro concentrações de 1:40, 1:30, 1:20 e 1:15 (óleo: etanol 95%) (v/v) e demonstraram ação tóxica no desenvolvimento embrionário dos ovos. Armugan et al. (2016) observaram o efeito do extrato da casca de *C. sinensis* em larvas de carrapatos de cão *Rhipicephalus sanguineus* e obtiveram taxa de mortalidade de 98% dos carrapatos ($p < 0,05$). Bala et al. (2011) testaram a atividade acaricida do extrato de casca de laranja contra carrapatos *Amblyomma variegatum* e *Rhipicephalus appendiculatus in vitro* expostos a cinco diluições seriadas (0 %, 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5,0% e 10,0%) e compararam ao Diazintol®, verificando a eficácia do óleo de laranja com correlação positiva a concentração, o tempo e a espécie alvo, sendo mais eficaz a 10% ($p < 0,05$) contra *Rhipicephalus appendiculatus*, com 100% de mortalidade seguido de *Amblyomma variegatum*, com mortalidade 78,8%.

26

1

2 **2.5.2. Óleo de Neem (*Azadirachta indica*)**

3 A árvore do neem (*Azadirachta indica* Juss) (Figura 2) membro da
4 família Meliaceae originária do subcontinente indiano, contém cerca de 135
5 compostos que podem ter ação contra artrópodes e entre estes compostos,
6 destaca-se a azadiractina A (AZA) (Liu et al., 2005). De acordo com índice
7 monográfico disponibilizado pela ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância
8 Sanitária) que informa a monografia de agrotóxicos com uso permitido no Brasil
9 o neem possui a seguinte classificação Taxonômica: Reino: Plantae; Divisão:
10 Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida; Ordem: Sapindales; Família:
11 Meliaceae; Gênero: *Azadirachta*; Espécie: *Azadirachta indica*; Identificação:
12 *Azadirachta indica*, A. Juss; outros nomes científicos: *Melia azadirachta* e
13 nomes comuns: Nim, Neem. Este princípio ativo é encontrado principalmente
14 na amêndoa. A concentração de AZA pode atingir 40% no óleo extraído
15 (ABDEL-SHAFY; ZAYED, 2002) a extração do óleo é feita principalmente da
16 amêndoa, mas pode ser também a partir de folha ou caule.

17



18 *Figura 2 Árvore de Neem (Fonte Green Souq, Dubai)*

19

20

21

22

23

24

25

26

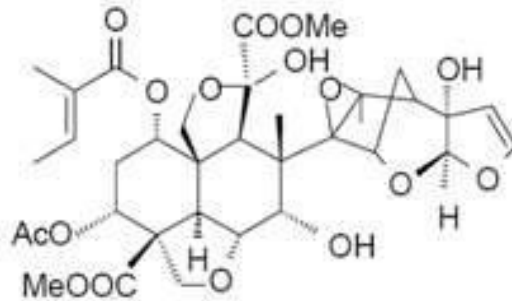
27

De acordo com a ANVISA a parte a ser utilizada são as sementes e o tipo de derivado vegetal é óleo vegetal ativo (puro) com a descrição: óleo de amêndoas de sementes secas de *Azadirachta indica* obtido por prensagem a frio e os marcadores fitoquímicos desta planta são a Azadiractina A e Azadiractina B. O princípio ativo Azadirachta A (azadiractina A) possui o nome químico de Dimethyl(2aR,3S,4S,4aR,5S,7aS,8S,10R,10aS,10bR)-10-acetoxy-3,5-dihydroxy-4-[(1aR,2S,3aS,6aS,7S,7aS)-6a-hydroxy-7a-methyl-3a,6a,7,7a-tetrahydro-2,7-methanofuro[2,3-b]oxireno[e]oxepin-1a(2H)-yl]-4-methyl-8-[(2E)-

1 2-methylbut-2-enyl]oxy)octahydro-1H-naphtho[1,8a-c:4,5-b']difuran-
2 5,10a(8H)-dicarboxylate, fórmula bruta $C_{35}H_{44}O_{16}$ com massa molecular de
3 720,7 g/mol e fórmula estrutural conforme figura 3.

4

5



6 *Figura 3 Fórmula estrutural da Azadiractina A. Fonte ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).*

7

8 O princípio ativo Azadiractina B ou 3-Tigloyl-azadirachtol
9 (azadiractina B) possui o nome químico 1H,7H-Naphtho[1,8-bc:4,4a-c']difuran-
10 5,10a(8H)-dicarboxylic acid, octahydro-3,8-dihydroxy-4-methyl-10-[[[(2E)-2-
11 methyl-1-oxo-2-butenyl]oxy]-4-[(1aR,2S,3aS,6aS,7S,7aS)-3a,6a,7,7a-tetrahydro
12 -6a-hydroxy-7a-methyl-2,7-methanofuro[2,3-b]oxireno[e]oxepin-1a(2H)-yl]-,
13 dimethyl ester, (2aR,3S,4S,4aR,5S,7aS,8S,10R,10aS,10bR), fórmula bruta:
14 $C_{33}H_{42}O_{14}$, massa molecular: 662,69 g/mol e fórmula estrutural conforme figura
15 4.

16



17 *Figura 4 Fórmula estrutural da Azadiractina B. Fonte ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).*

1 Os extratos obtidos a partir do neem são passíveis de
2 fotodegradação, oxidação e degradação térmica, e de acordo com Bousier et
3 al. (2011) o efeito oxidativo e temperaturas de armazenamento altas impactam
4 na concentração de azadiractina A que diminuiu cerca de 30% da concentração
5 inicial entre o terceiro e o sétimo dia, em temperaturas ambientes de 30°C.

6 O emprego do neem em agricultura orgânica tem sido difundido
7 como relatado por Bousier et al. (2011) em bioensaios sobre a cigarrinha
8 *Macrostelus quadripunctulatus*, mariposa *Spodoptera littoralis* e mosca branca
9 *Bemisia tabaci* ao comparar a eficácia de uma solução de azadiractina pura A
10 ao produto comercial Neemazal® T/S e verificar que para cigarrinha e
11 mariposa, a solução de neem na concentração recomendada (25 mg/L⁻¹ de
12 óleo de neem) foi tão eficaz quanto o produto comercial à base de azadiractina,
13 enquanto que para o controle de mosca branca foi necessária uma maior
14 concentração do extrato aquoso.

15 A ação carrapaticida da azadiractina mostrou ter efeito inibitório
16 sobre a vitelogenina durante a oogênese dos artrópodes (Jonsson; Piper,
17 2007), preconização na eclosão e mortalidade de larvas recém-incubadas de
18 *Dermacentor variabilis* (Landau et al., 2009; Abdel-Shafy; Zayed, 2002). Santos
19 et al. (2012) avaliaram o efeito *in vitro* utilizando o teste de imersão de fêmeas
20 ingurgitadas dos extratos de neem e óleo essencial de cravo (*Syzygium aroma-*
21 *ticum*) sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus*. As concentrações dos
22 extratos aquosos e etanólicos de neem foram 10% e 50% e a do óleo essencial
23 de cravo foi 2,5% e 5% resultando em eficácia média dos extratos de neem
24 entre 15,04% a 74,39%, dependendo da concentração e do solvente utilizado
25 enquanto a eficácia média do óleo essencial de cravo foi de 97,15 e 99,4%,
26 respectivamente.

27 Giglioti et al. (2011) testaram o efeito de quatro extratos de
28 sementes de neem contendo 2.000, 5.000, 9.000 e 10.000 ppm de azadiractina
29 A (AZA), diluídos a 1,25%; 2,5%; 5,0%; 10,0% e 12,8% através de ensaio *in*
30 *vitro* com fêmeas ingurgitadas e larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus* e
31 notaram que o principal efeito tóxico dos extratos se deu sobre os parâmetros
32 reprodutivos, com queda acentuada na postura e taxa de eclosão de ovos,
33 principalmente nos extratos a 10,0% e 12,8%. A solução de AZA a 10.000 ppm

1 (N10) foi a mais eficaz, porém, não foi possível estimar os valores de CL90 na
2 faixa de diluição testada.

3 Pazinato et al., (2016) avaliaram *in vitro* a ação de sete óleos;
4 zimbro (*Juniperus munis*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), cedro (*Cedrus*
5 *atlantica*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), gengibre (*Zingiber officinale*),
6 gerânio (*Pelargonium graveolens*) e bergamota (*Citrus aurantium var bergamia*)
7 em concentrações de 1%, 5% e 10% cada. *C. martinii*, *C. citratus* e *C. atlantica*
8 apresentaram eficácia superior a 99% enquanto *J. munis*, *Z. officinale*, *P.*
9 *graveolens* e *C. aurantium var bergamia* apresentaram eficácia variando de
10 73% a 95%. Assim, concentrações mais altas mostraram maior eficácia para
11 parâmetros reprodutivos, inibição da oviposição e eclodibilidade.

12 Os ensaios utilizando o óleo e extratos de para controle de
13 carrapatos *in vitro* permite inferir que as concentrações dos ativos botânicos
14 devam ser superiores a 10% para que tenham efetividade. No entanto,
15 componentes e frações de ingredientes ativos presentes nos extratos botânicos
16 apresentam alto potencial a fotodegradação, oxidação e degradação térmica.

17

18 **3. Justificativa**

19

20 Os problemas de resistência, resíduos tóxicos em subprodutos,
21 toxicidade aos aplicadores, ação em organismos não alvo, eficácia reduzida e
22 danos ambientais diretos ou indiretos causados pela maioria dos acaricidas
23 sintéticos ampliou a necessidade pela busca de produtos alternativos em
24 escala que atenda a demanda pecuária Brasileira de acaricidas para uso em
25 programas integrados de manejo de pragas no rebanho bovino.

26 Os produtos de origem vegetal derivados de plantas tem
27 mostrado excelente potencial acaricida e incrementado o número de pesquisas
28 neste segmento, porém há escassez de ensaios utilizando produtos comerciais
29 ou em desenvolvimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que os estudos
30 concentram-se no emprego de extratos obtidos de forma não escalonada ou
31 em grandes quantidades ampliando as variáveis de confiança para
32 repetibilidade do uso destes extratos.

1 Assim, torna-se necessário que se faça estudos utilizando
2 produtos de origem botânica disponíveis no mercado em quantidade, tempo e
3 qualidade frequentes para que se avalie a aplicação destes óleos em produtos
4 comerciais para uso efetivo no manejo do rebanho bovino.

6 **4. Objetivos**

7 O objetivo deste estudo foi estabelecer a concentração letal dos
8 óleos de laranja e neem obtidos no mercado nacional e indiano
9 respectivamente, através de ensaios *in vitro* estimando-se a morte das larvas
10 de carrapatos *Rhipicephalus microplus* e posteriormente aplicadas em
11 formulações concentradas a serem emulsionadas a campo para pulverização
12 em gado infestado naturalmente por carrapatos *Rhipicephalus microplus*.

13 Identificar as concentrações letais do óleo de neem sobre
14 carrapatos *Rhipicephalus (B.) microplus* in vitro.

15 Identificar as concentrações letais do óleo de laranja sobre
16 carrapatos *Rhipicephalus (B.) microplus* in vitro.

17 Estimar a concentração de óleo de neem como ectoacaricida em
18 bovinos a campo.

19 Estimar a concentração de óleo de laranja como ectoacaricida em
20 bovinos a campo.

21 Comparar a eficácia do óleo de neem e de laranja com produto
22 comercial aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
23 (MAPA) como acaricida em bovinos.

24

CAPÍTULO 2

Eficácia in vitro de Cipermetrina, Óleo de Neem (Azadirachta indica) e Óleo de Laranja (Citrus sinensis) no controle de larvas de carrapatos Rhipicephalus microplus.

Souza, Francinea A.F.^{1,3}; Dunkel, Karen F.¹; Lima, Gabriel A.C.¹; Higa, Leandro²; Silva, Bianca M.³; Weber, Saulo H.¹; Bechara, Gervasio H.¹

¹ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil; ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS; ³Dexter Latina Indústria e Comércio de Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil; (1*) souzafrancinea@gmail.com

RESUMO

O uso de extratos feitos a partir de produtos vegetais tem sido amplamente estudado e vem apresentando boas perspectivas em relação ao controle de artrópodes. Contudo, esses extratos nem sempre possuem uma composição que pode ser escalonada ou mesmo repetível. Formulações a partir de óleos essenciais na forma comercial podem apresentar boas perspectiva no controle de carrapatos para uso em bovinos. O objetivo do presente estudo foi testar os óleos essenciais de neem e laranja adquiridos comercialmente e formulados como concentrados emulsionáveis (CE) solúveis em água. Foi utilizado o teste de pacote de larvas (TPL) em larvas de *Rhipicephalus microplus* para determinar as concentrações letais de neem (*Azadirachta indica*) e óleo de laranja (*Citrus sinensis*), comparando com um acaricida sintético à base de cipermetrina autorizado. Larvas de *Rhipicephalus microplus* foram obtidas de colônia de carrapatos mantida pela EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande (MS),

¹ Avenida Senador Salgado Filho, 5195, 81570-000, Curitiba, Paraná, Brasil. 0051 +41 32991900 999732934, souzafrancinea@gmail.com

1 Brasil e utilizadas duas semanas após eclosão. As doses acaricidas pré-
2 estabelecidas para o TPL expressas em μg de ingrediente ativo (i.a.) foram de
3 600, 300, 150 e 75 para cipermetrina, e 9.600, 4.800, 2.400 e 1.200 para
4 formulações dos óleos de neem e laranja; utilizou-se como controle negativo
5 água deionizada. Foram empregadas comparações das concentrações de
6 dose-resposta entre cipermetrina, óleos de neem e laranja e controle para a
7 mortalidade de larvas nos percentuais de 50%, 75%, 80%, 90% e 95% para
8 obtenção e análise das concentrações letais (CL) e obteve-se percentual de
9 mortalidade de 84%; 74%, 65% e 58% respectivamente para as doses de 600,
10 300, 150 e 75 μg i.a./L para cipermetrina, 84%, 51%, 45% e 31% para óleo de
11 neem e 85%, 49%, 38% e 36% para óleo de laranja nas dosagens de 9.600,
12 4.800, 2.400 e 1.200 μg i.a./L para formulações dos óleos de neem e laranja.
13 O tratamento com óleo de neem apresentaram as CL50, CL75, CL80 com
14 respectivamente 3.829 μg , 7.723 μg , 8.905 μg e estatisticamente estima-se que
15 a dosagem a ser utilizada para obter uma CL90 e CL95 deve ser
16 respectivamente 12.725 μg e 17.645 μg . Os resultados com óleo de laranja
17 apresentaram CL50, CL75 e CL80 de respectivamente 4.344 μg , 8.000 μg e
18 8.848 μg e, sendo que se estima que dosagens para obtenção de CL90 e CL95
19 devem ser de 10.775 μg e 11.909 μg , respectivamente. Neste estudo concluiu-
20 se que os óleos de neem e laranja podem ser empregados como acaricidas
21 botânicos no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

22

23 *Keywords*; acaricidas, óleo essenciais; piretroides; inseticida; larvicida.

24

25 **1. Introdução**

26 O carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*, afeta a saúde animal
27 ao redor do mundo, acarretando grandes impactos econômicos devido à
28 redução no ganho de peso, ocasionando perdas na produção de carne e leite,
29 danos ao couro, além de atuarem como vetor dos biopatógenos da tristeza
30 parasitária bovina. Os danos causados pelos carrapatos têm sido reportados
31 em muitos países tropicais e subtropicais, estimando-se uma perda anual de
32 US\$ 22 a 30 bilhões de dólares (Lew-Tabor e Rodriguez Valle, 2016), sendo
33 US\$3,24 bilhões apenas no Brasil, de acordo com Grisi et al. (2014).

1 Vários agentes químicos comerciais como organofosforados,
2 piretróides, amidinas, benzilfenilureias, lactonas macrocíclicas, neonicotinóides,
3 fenilpirazois, são utilizados como principal estratégia de controle no manejo
4 sanitário contra o carrapato de bovinos no Brasil até o momento, devido à sua
5 grande disponibilidade no mercado, custo-benefício e facilidade de aplicação
6 por pulverização, imersão ou sob a forma de derramamento, permitindo
7 também a associação com outros medicamentos ou manejos.

8 Apesar dos problemas relacionados à aplicação dos acaricidas
9 sintéticos, como contaminação dos produtos de origem animal, contaminação
10 ambiental e seleção de linhagens de carrapatos resistentes, entre outros.
11 Devido à alta capacidade adaptativa, taxa reprodutiva e diversidade genética
12 dos carrapatos, há relatos sobre seleção de cepas da espécie *R. microplus*
13 resistentes às principais classes de acaricidas sintéticos atualmente em uso,
14 motivo pelo qual uma seleção de produtos químicos de forma racional para
15 controlar carrapatos de maneira eficaz se faz necessário (Robbertse et al,
16 2016).

17 Portanto, é fundamental buscar novas alternativas visando um
18 controle eficiente dos carrapatos nos rebanhos, a fim de mitigar os danos
19 econômicos e sanitários. Nesse contexto, mais de 55 espécies de plantas
20 pertencentes a 26 famílias ao redor do mundo foram avaliadas contra
21 *Rhipicephalus microplus* (Borges et al., 2011; Benelli et al., 2016).

22 De acordo com Liu et al. (2005) a árvore de neem (*Azadirachta*
23 *indica*), planta originária da Ásia, possui cerca de 135 compostos com possível
24 ação intoxicante sobre artrópodes. De fato, óleo de neem possui efeito inibitório
25 sobre a vitelogênese durante a oogênese de artrópodes como demonstrado por
26 Jonsson e Piper (2007) e Abdel-Shafy & Zayed (2002), que observaram
27 decréscimo na eclosão de ovos e mortalidade de larvas de *Hyalomma*
28 *anatolicum excavatum* recém incubadas.

29 Além disso, o uso de óleos essenciais como repelentes já é
30 amplamente utilizado e estudado. Lima et. al. (2016) mostraram resultados
31 positivos para repelência de óleo essencial de *L. alba* que contém compostos
32 bioativos com atividade contra o carrapato *R. microplus* resistentes aos
33 piretróides e ao amitraz. Kulma et. al. (2017) avaliaram o efeito repelente de

1 três óleos essenciais para controle de fêmeas de *Ixodes ricinus* e mostraram
2 que o repelente sintético DEET apresentou maior efetividade que os repelentes
3 botânicos; óleo de laranja não apresentou efeito após 20 minutos da aplicação
4 enquanto lavanda e eucalipto repeliram 45% e 15% de carrapatos após 80
5 minutos, respectivamente.

6 Kumar et al., 2019 demonstraram ação tóxica do *Ageratum*
7 *conyzoides* sobre população de carrapatos *Rhipicephalus microplus*
8 resistentes. O fitoquímico foi capaz de induzir má formação dos oócitos,
9 extensa vacuolização citoplasmática e redução de grânulos de vitelo,
10 similarmente ao observado em tratamentos utilizando amitraz e coumafós.

11 Quanto à ação acaricida dos compostos botânicos, vários estudos
12 foram conduzidos para encontrar alternativas aos produtos sintéticos
13 empregando-os como potencializadores, sinergistas ou mesmo como agente
14 de controle isolado de carrapatos.

15 Martinez-Veslaquez et al. (2011) testaram óleo essencial de
16 sementes de cominho (*Cuminum cyminum*), pimenta Jamaica (*Pimenta dioica*)
17 e folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) em concentrações de 20% a 1,25%
18 em larvas de *R. microplus* com 10 dias de idade por meio do teste de pacote de
19 larvas obtendo 100% de mortalidade larval em todas as concentrações
20 testadas. Similarmente, óleo essencial de pimenta Jamaica produziram 100%
21 de mortalidade em todas as concentrações, exceto para 1,25%, óleo essencial
22 extraído de folhas de manjeriço não apresentou ação intoxicante para larvas
23 de *Rhipicephalus microplus*.

24 Ribeiro et al. (2010) avaliaram o óleo essencial extraído de
25 *Hesperozygis ringens* (Benth.) *Epling* (Lamiaceae) nas concentrações de 50
26 µL/ml e 25 µL/ml em carrapatos de boi *R. microplus* usando o teste de imersão
27 de adultos (TIA) e o teste de imersão de larvas (TIL) e observaram que tanto a
28 postura quanto a eclosão dos ovos foram significativamente inibidas em 95% e
29 30%, respectivamente.

30 Neste estudo, a eficácia do acaricida sintético Cipermetrina foi
31 comparada a óleos essenciais de neem e laranja adquiridos comercialmente e
32 formulados de forma a serem diluídos em água, da mesma forma que o
33 acaricida químico sintético disponível no mercado.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

2. Material e métodos

2.1. Comitê de ética

O estudo obteve autorização da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob número 01116/2017 2ª versão em maio/2017 (Anexo 1).

2.2 Carrapatos

Fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* gentilmente fornecidas pela EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande (MS), Brasil, foram cuidadosamente lavadas em água destilada e mantidas no laboratórios da Dexter Latina, em São José dos Pinhais-PR para oviposição, em condições controladas de temperatura a 28°C ($\pm 1,5^\circ\text{C}$), umidade relativa a 80% ($\pm 5\%$), monitorados através de termo higrômetro calibrado de acordo com o certificado ATCC n° 422/18 e fotoperíodo de 12 horas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD na sigla em inglês) aferida e calibrada de acordo com certificado ATCC n°C2348/18 modelo 0315F25 n° de série 16110353. As larvas foram utilizadas no bioensaio duas semanas após eclosão.

2.3. Óleos essenciais

O óleo de neem foi importado da empresa Indiana Parker Biotech, batelada 3013136 descrita como líquido marrom viscoso, pH 7,0 \pm 0,02, e densidade/gravidade específica de 0,84 g/L.

O óleo de laranja foi obtido no Mercado nacional da empresa DICA Comercial, batelada 0032/17, densidade 0,843 g/L, acidez 1,26980 g/L, índice de refração 0,9861 e percentual de aldeído 1,5906.

2.4. Cipermetrina

Cipermetrina com pureza 92% isomeria cis-trans 60:40, batelada IN9101002477 descrito como líquido amarelo viscoso a 25°C e peso molecular 416,2 g/mol, foi obtida da Empresa Dexter Latina.

2.5. Formulação dos acaricidas

1 Cipermetrina foi formulada a 15% e os óleos de neem e laranja a
2 12% cada na forma de concentrado emulsionável, justificado pelas
3 propriedades químicas dos óleos botânicos (i.a.) de solubilidade em água, foto
4 estabilidade e oxidação entre outras. As formulações foram diluídas para
5 obtenção das concentrações finais em microgramas de ingrediente ativo por
6 litro de água ($\mu\text{g i.a./L}$). As dosagens testadas estão descritas na tabela 1.

7
8 Tabela 1- Concentração final dos ingredientes ativos cipermetrina, óleo de
9 neem e óleo de laranja expressos em microgramas por litro ($\mu\text{g i.a./L}$).

Cipermetrina 15% ($\mu\text{g i.a./L}$)	Óleo de neem 12% ($\mu\text{g i.a./L}$)	Óleo de laranja 12% ($\mu\text{g i.a./L}$)
600	9.600	9.600
300	4.800	4.800
150	2.400	2.400
75	1.200	1.200

10 11 **3. Bioensaio**

12 Foi utilizado neste experimento o teste de pacote de larvas (TPL)
13 (Stone and Haydock, 1962), aprovado pela FAO – Food and Agriculture
14 Organization com leves modificações. Em resumo, inicialmente papéis filtro
15 foram cortados em retângulos de 75 x 85 mm, previamente identificados com
16 os nomes, concentração dos acaricidas e controles. Em seguida, os retângulos
17 de papel foram impregnados com 1000 μL de solução acaricida e os retângulos
18 controle com a mesma quantidade de água deionizada. Após impregnados, os
19 papéis foram mantidos em laboratório para secagem e depois de secos
20 dobrados na forma de envelope com suas extremidades presas com grampos
21 especiais, permanecendo apenas uma abertura superior para colocação das
22 larvas. Após 24 horas, entre 100 e 150 larvas foram colocadas com o auxílio de
23 um pincel nos pacotes pré-impregnados, os pacotes fechados foram mantidos
24 em estufa BOD por 24 horas em temperatura de 28°C ($\pm 1,5^{\circ}\text{C}$), e humidade
25 80% ($\pm 5\%$). Após o período de incubação, os pacotes foram abertos para a
26 contagem das larvas mortas e vivas. Para tanto, foi utilizado um tubo de
27 polietileno acoplado a uma pipeta Pasteur e bomba de vácuo para sucção das
28 larvas. Os resultados foram expressos em percentual de larvas vivas e mortas
29 em relação ao número total de larvas por pacote. As concentrações letais para

1 75%, 80%, 90% e 95% das larvas (CL75, CL80, CL90 e CL95,
2 respectivamente) foram calculadas utilizando o programa estatístico Tabela
3 Curve V3 (Florence, 1994).

4

5 **3.1. Análise estatística.**

6 O modelo Gompertz foi ajustado por regressões não lineares de
7 acordo com a equação abaixo que, de acordo com Draper e Smith (1998).

8 Equação:

$$Mortalidade = a \cdot e^{-e^{-b(Concentração - c)}}$$

9

10 Onde:

11 a: assíntota horizontal – valor máximo

12 b e c: taxa de redução e ajuste de parâmetros

13 e: constante de Euler (aproximadamente 2.718281)

14

15 O procedimento de Marquadt e os métodos dos mínimos
16 quadrados foram utilizados para análise dos dados, sendo que as curvas foram
17 ajustados pelo coeficiente de regressão R² e erro padrão da estimativa Syx
18 para verificar a variação dos valores médios estimados em relação aos
19 observados. As médias de mortalidade foram comparadas pelo método
20 ANOVA One-Way Tipo III ($\alpha = 0,05$), seguida pelo teste de Tukey de acordo
21 com Steel et al. (1997). Utilizou-se o programa AISN Software Inc., (Oregon,
22 US) para análise de dados para calculo das deses letais (CL50 a CL95) para os
23 compostos a base de cipermetrina e de óleos de neem e laranja.

24

25 **4. Resultados**

26 Houve mortalidade de larvas significativamente menor para a
27 Cipermetrina e tanto para óleo de neem quanto para o óleo de laranja houve
28 significância somente nas concentrações 600 µg i.a. e 9,600 µg i.a.,
29 respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0.05$) na
30 mortalidade de larvas para os óleos com as concentrações de 4.800, 2.400 e
31 1.200 µg i.a. Comparando-se a eficácia entre os compostos testados,
32 observou-se diferença significativa entre a cipermetrina e os óleos a 95% de

1 probabilidade ($p>0.05$). O grupo controle negativo apresentou menor
 2 percentagem de mortalidade que nos grupos tratados (Cipermetrina, neem e
 3 óleo de laranja) em todas as doses testadas. O resultado da mortalidade larval
 4 referente às aplicações das diferentes concentrações acaricidas está
 5 apresentado na Tabela 2.

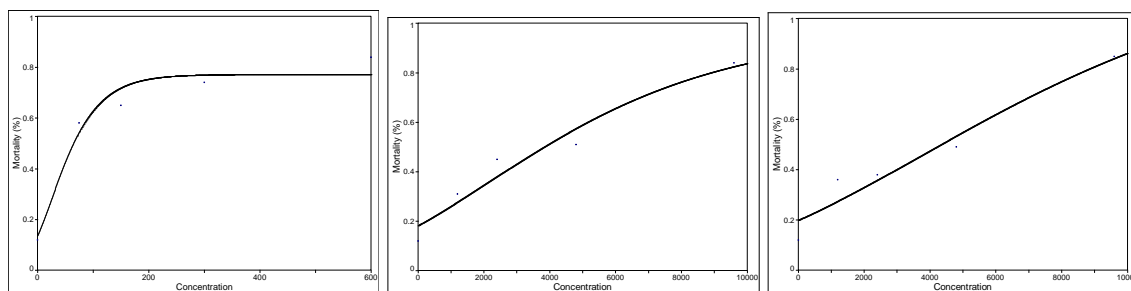
6 Tabela 2 – Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus*
 7 submetidas a diferentes concentrações de óleos de neem e laranja e
 8 cipermetrina pelo teste de pacote de larvas (TPL). Resultados estão expressos
 9 em média \pm desvio padrão.

Dose Concentração	Cipermetrina %	Dose Concentração	Óleo de Neem %	Óleo de Laranja %
Controle	12 \pm 7 ^a	Controle	12 \pm 7 ^a	12 \pm 7 ^a
600	84 \pm 5 ^{cA}	9,600	84 \pm 12 ^{bA}	85 \pm 7 ^{bA}
300	74 \pm 6 ^{bcB}	4,800	51 \pm 17 ^{aA}	49 \pm 12 ^{aA}
150	65 \pm 7 ^{abB}	2,400	45 \pm 10 ^{aA}	38 \pm 12 ^{aA}
75	58 \pm 15 ^{aB}	1,200	31 \pm 15 ^{aA}	36 \pm 13 ^{aA}

12 Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas entre as
 13 concentrações.

14 Letras maiúsculas diferentes significam diferenças significativas entre os ativos
 15 testados.

16
 17 As figuras 1, a, b e c ilustram os ajustes pelo modelo de Gompertz para os
 18 dados de mortalidade das larvas quando expostas por 24 horas no TPL a
 19 cipermetrina, óleo de neem, óleo de laranja, respectivamente para controle de
 20 carrapatos.



1 Figuras 1a, b e c- Efeito larvicida *in vitro* da Cipermetrina, óleo de neem e óleo
 2 de laranja sobre *Rhipicephalus microplus*
 3

4 De acordo com as concentrações letais listadas nas Figuras 1 a,
 5 pode-se observar que a curva representando a cipermetrina mostra uma
 6 mortalidade máxima de 84% e uma tendência linear indicando estabilização da
 7 mortalidade de larvas, logo, matematicamente não há correlação direta e o
 8 incremento da dose de ingrediente ativo não implicará em aumento da
 9 mortalidade. A CL50 para cipermetrina foi atingido com 50 µg de i.a. e CL75 foi
 10 obtido com a concentração de 193 µg, a concentração para obter mortalidade
 11 de 80% da população não pode ser alcançada estatisticamente, destacando a
 12 importância empírica do cálculo percentual e corroborando a necessidade de
 13 um modelo estatístico para evitar a equalização dos resultados sem
 14 extrapolação.
 15

16 Nas figuras 1b e 1c respectivamente, as mortalidades das larvas
 17 tratadas com óleos de neem e laranja mostram tendência de crescimento linear
 18 sugerindo correlação direta para aumento da mortalidade com o aumento da
 19 dosagem dos óleos essenciais.

20 Especificamente, para análise dos resultados do tratamento com
 21 óleo de neem temos as CL50, CL75, CL80 com respectivamente 3.829 µg,
 22 7.723 µg, 8.905 µg e de acordo com a Figura 2 a dosagem a ser utilizada para
 23 obter uma CL90 e CL95 deve ser respectivamente 12.725 µg e 17.645 µg. Para
 24 os resultados com óleo de laranja temos as CL50, CL75 e CL80 de
 25 respectivamente 4.344 µg, 8.000 µg e 8.848 µg e, de acordo com a figura 3, as
 26 dosagens para obtenção de CL90 e CL95 deveriam ser de 10.775 µg e 11.909
 27 µg, respectivamente. Os parâmetros estáticos estão apresentados na Tabela 3.
 28

1 Tabela 3 – Parâmetros estatísticos para mortalidade de larvas de carrapatos
 2 quando tratadas com cipermetrina, óleo de neem e óleo de laranja.

Parâmetros	Cipermetrina	Neem	Óleo de laranja
R^2	0,847	0,800	0,96
Syx	0,077	0,084	0,0894
Mortalidade máxima	84%	84%	85%
CL50	65 µg	3.829 µg	4.344 µg
CL75	193 µg	7.723 µg	8.000 µg
CL80	Não alcança 80% de mortalidade	8.905 µg	8.848 µg
CL90	Não alcança 90% de mortalidade	12.725 µg	10.775 µg
CL95	Não alcança 95% de mortalidade	17.645 µg	11.909 µg

3 R^2 : Coeficiente de determinação

4 Syx Erro padrão da estimativa

5. Discussão

7 A análise dos resultados referente ao tratamento com óleo de
 8 neem apresentou CL50, CL75, CL80 com respectivamente 3.829 µg, 7.723 µg,
 9 8.905 µg, similarmente ao resultado apresentado por Broglio-Micheletti et al.
 10 (2009) no teste de imersão de adultos, em que se avaliou a eficácia do extrato
 11 alcoólico a 2% (peso/volume) de sementes de *Annona muricata* L.
 12 (Annonaceae) (Graviola), flores de *Syzygium malaccensis* (L.) (Myrtaceae)
 13 (Jambo), folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) (Capim-Santo),
 14 folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) (Neem), e extrato hexânico na
 15 mesma concentração de *A. indica* (sementes) para controle de *R. (B.)*
 16 *microplus* em laboratório. O extrato de *A. muricata* mostrou maior poder
 17 acaricida, com eficácia de 100%, seguido pelo extrato de *S. malaccensis* (75 e
 18 59,24%) e *A. indica* (65 e 38,49%).

19 Ainda, para os resultados com o óleo de neem, a partir dos
 20 cálculos e análises estatísticas as dosagens a serem utilizadas para obter uma
 21 CL90 e CL95, devem ser respectivamente 12.725 µg e 17.645 µg. Estes
 22 autores utilizando o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas para extrato de
 23 neem (*Azadirachta indica*) sobre o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus)*
 24 *microplus* encontraram concentrações de 10% e 50% dos extratos aquoso e
 25 etanoico de neem, resultando em eficácia média entre 15,04% a 74,39%,
 26 respectivamente, dependendo da concentração e do solvente utilizado.

1 Existe uma lacuna na literatura científica para ensaios utilizando o
2 óleo de laranja no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando o
3 teste de pacote de larvas, havendo maior disponibilidade de informações para
4 testes de imersão de fêmeas ingurgitadas. Os resultados deste ensaio para as
5 CL50, CL75 e CL80, de respectivamente 4.344 µg, 8.000 µg e 8.848 µg e para
6 CL90 e CL95, de 10.775 µg e 11.909 µg, respectivamente, similarmente aos
7 resultados obtidos por Chungsamarnyart & Jansawan (1996) com óleo de
8 casca de *C sinensis* diluído em etanol 95% nas proporções 1:5, 1:10 e 1:15
9 (V/V) pela imersão de fêmeas ingurgitadas com anotação de alta atividade
10 larvicida a 1:10. Armugan et al., (2016) testaram extratos obtidos das cascas de
11 *C. sinensis* a 50%, 75% e 95% de concentração e obtiveram mortalidades de
12 95% a 98% (p< 0,05) em carrapatos de cães *Rhipicephalus sanguineus*.
13 Vinturelle et al., (2017) testaram o óleo de limão contra o carrapato de boi
14 *Rhipicephalus microplus* contendo limoneno (50,3%), β-pineno (14,4%) e γ-
15 terpineno (11,7%) como os principais componentes a atividade acaricida foi
16 avaliada nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0% (v / v) em teste de imersão de
17 fêmeas ingurgitadas por um minuto, obtendo CL90 dos óleos de *C. limonum* de
18 4,9%, o que permite por analogia inferir sobre a eficácia do óleo de laranja para
19 controle de carrapatos de boi.

20 O uso destes óleos essenciais pode ser também empregado na
21 forma de adjuvante, ou como solvente, cossolvente, veículo ou mesmo em
22 associação a moléculas químicas convencionais de eleição.
23

24 **6. Conclusões**

25 O presente estudo demonstra através dos resultados obtidos que
26 os óleos de neem e laranja apresentam potencial no controle de infestações
27 por carrapatos *Rhipicephalus microplus in vitro* no teste de pacote de larvas
28 nas dosagens de 12.725 µg e 17.645 µg/L para obtenção de controle de 95%
29 dos carrapatos (CL95).
30

31 **7. Referências**

32
33 Abdel-Shafy, S.; El-Khateeb, R. M.; Soliman, M. M.; Abdel-Aziz M.M. The
34 efficacy of some wild medicinal of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta*

1 *indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum*
2 (Ixodoidea: Ixodidae). Veterinary Parasitology, v. 30, n. 106, p. 89-96, 2002. PII:
3 S0 3 04 -4 0 17 (0 2)0 0 0 2 3 -7
4
5 Agnolin, CA.; Olivo C.J.; Parra C.L.C.; Aguirre P.F.; de Bem C.M.; Zeni S.;
6 Morel A.F. Eficácia acaricida do óleo de citronela contra o *Rhipicephalus*
7 (*Boophilus*) *microplus*
8 *Acaricidal efficacy against "Rhipicephalus (Boophilus) microplus" of citronella oil*
9 Revista Brasileira Saúde Produção Animal, Salvador, v.15, n.3, p.604-612
10 jul./set., 2014 <http://www.rbspa.ufba.br> ISSN 1519 9940
11
12 Benelli, G.; Pavela, R.; Canale, A.; Mehlhorn H. 2016. Tick repellents and
13 acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?
14 Parasitol. Res. 115, 2545-2560. DOI 10.1007/s00436-016-5095-1
15
16 Borges, L.M.F.; Sousa, L.A.D.; Barbosa, C.S. Perspectives for the use of plant
17 extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista
18 Brasileira de Parasitologia Veterinária. 20, (2),89-96.
19 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000200001>
20
21 Broglio-Micheletti S.M.F.; Dias N.S.; Valente E.C.N.; Souza L.A.; Lopes D.O.P.
22 Santos J.M. Action of extract and oil neem in the control of *Rhipicephalus*
23 (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in laboratory. Rev.
24 Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 44-48, jan.-mar. 2010. ISSN
25 0103-846X (impresso) / ISSN 1984-2961 (eletrônico).
26
27 Castro K.N.C.; Canuto K.M.; Brito E.S.; Costa-Junior L.M. Andrade I.M.;
28 Magalhaes J.A.; Barros D.M.A. *In vitro* efficacy of essential oils with different
29 concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
30 Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 27, n. 2, p. 203-210, apr.june
31 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-296120180015>

32

1 Chungsamarnnyart N.; Jansawan W. Acaricidal activity of Peel Oil of *Citrus* spp
2 on *Boophilus microplus*. Kanetsar J (Nat. Sci.) 30:112 – 177 (1996).

3 Eckstein C.; Campos A.K.; Lopes L.B.; Maluf J.M.; Soares E.J.; Kachiyama J.B.
4 *In vitro* efficacy of commercial acaricides indicate resistant populations of
5 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in northern region of Mato Grosso. Issue
6 ID: Sci. Elec. Arch. 9:1 (2016).

7 [http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=v
8 iew&path%5B%5D=210&path%5B%5D=pdf_75](http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=210&path%5B%5D=pdf_75)

9
10
11 Grisi L.; Leite R.C.; Martins J.R.; Barros A.T.; Andreotti R.; Cançado P.H.; León
12 A.A.; Pereira J.B.; Villela H.S. Reassessment of the potential economic impact
13 of cattle parasites in Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.
14 2014; 23(2):150-6. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>.

15
16 Jonsson, N. N.; Piper, E. K. Integrated Control Programs for Ticks on Cattle.
17 UQ Printery Australia, p. 135–136, 2007.

18
19 Kulma M.; Bubová T.; Kopecký O.; Rettich F. Lavender, Eucalyptus and Orange
20 essential oils as repellents against *Ixodes ricinus* females. Scientia agriculturae
21 bohémica, 48, 2017 (2): 76–81 doi: 10.1515/sab-2017-0014

22
23 Kumar A.K.G.; Fulara A.; Chigurea G.; Sharma A. K.; Nagara G.; Souza F.F.;
24 Bechara G.H.; Ghosh S. Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant
25 extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*.
26 Ticks and Tick-borne Diseases 10 (2019) 1085–1095.
27 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.003>

28
29 Lew-Tabor A.E.; Valle R M. (2016). A review of reverse vaccinology approaches
30 for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases. Ticks
31 Tick Borne Dis. 7(4), 573–585. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.12.012

32
33 Lima A.S.; Carvalho J.F.; Peixoto MG, Blank AF, Borges LMF, Costa Junior LM.

1 Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major
2 monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Medical and
3 Veterinary Entomology (2016) 30, 73–77 doi: 10.1111/mve.12140
4
5 Liu, Y.; Chen, G. S.; Chen, Y.; Lin, J. Inclusion complexes of azadirachtin with
6 native and methylated cyclodextrins: solubilization and binding ability.
7 Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 13, n. 12, p. 4037-42, 2005.
8 DOI:[10.1016/j.bmc.2005.03.051](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.03.051)
9
10 Martinez-Velazquez M.; Castillo-Herrera G.A.; Rosario-Cruz R.; Flores-
11 Fernandez J.M.; Lopez-Ramirez J.; Hernandez-Gutierrez R.; Lugo-Cervantes
12 E.C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from
13 *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle
14 tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res.
15 (2011) 108:481–487. doi 10.1007/s00436-010-2069-6
16
17 Ribeiro V.L.S.; Santos J.C.; Bordignon S.A.L.; Apel M.A.; Henriques A.T.; von
18 Poser G.L. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens*
19 (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Bioresource
20 Technology 101 (2010) 2506–2509 doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.016
21
22 Robbertsea L.; Barona S.; van der Merwea N.A.; Madderb M.; Stoltz W.H.;
23 Oliviera C.M. Genetic diversity, acaricide resistance status and evolutionary
24 potential of a *Rhipicephalus microplus* population from a disease controlled
25 cattle farming area in South Africa. Ticks Tick borne Diseases 7 (2016) 595–
26 603. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.018>
27
28
29

CAPÍTULO 3

Avaliação comparativa da eficácia “*in vivo*” e “*in vitro*” dos Óleos de Neem (*Azadirachta indica*) e Laranja (*Citrus sinensis*) no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).

Francinea Alves Fonceca Souza^{1,2*}; Gabriel Alcides Capucho de Lima¹; Karen Dunkel¹; Bianca Moreira da Silva²; Saulo Henrique Weber¹; Gervasio Henrique Bechara¹

¹ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil; ² Dexter Latina Indústria e Comércio de Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil; (^{2*}) souzafrancinea@gmail.com

Resumo

Rhipicephalus microplus, conhecido como carrapato do boi, é o principal ectoparasita de interesse econômico nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo responsável por sérias perdas na pecuária bovina advindas da espoliação, queda na produção de leite e carne, mortalidade, redução da natalidade e transmissão de patógenos responsáveis pela tristeza parasitária bovina, os hemoprotozoários (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) e riquetsias (*Anaplasma marginale*) e perda na qualidade do couro, entre outros. O controle desses ectoparasitas é feito principalmente com produtos químicos, no entanto, esse tipo de controle apresenta desvantagens, como o rápido desenvolvimento de resistência nos carrapatos, contaminação ambiental tanto pela sua baixa biodegradabilidade quanto pela toxicidade direta a organismos não alvo em solo, ar e águas, resíduos em produtos e subprodutos lácteos e cárneos, efeitos colaterais nos sistemas digestivo, respiratório, cutâneo e neurológico dos animais e aplicadores. Nesse contexto, produtos botânicos

² Avenida Senador Salgado Filho, 5195, 81570-000, Curitiba, Paraná, Brasil. 0051 +41 32991900 999732934, souzafrancinea@gmail.com

1 vêm sendo desenvolvidos para associação ou substituição dos acaricidas
2 químicos, como alternativa no controle de carrapatos. Neste estudo, ensaios
3 laboratoriais para pré-determinar as concentrações letais dos óleos de neem
4 (*Azadirachta indica*) e laranja (*Citrus sinensis*) pelo teste do pacote de larvas
5 (TPL) indicaram como melhores dosagens as concentrações 18.000 µg do
6 ingrediente ativo (i.a.) e 12.000 µg i.a., respectivamente. Estas concentrações
7 foram utilizadas em formulações do tipo concentrado emulsionável (CE),
8 posteriormente empregadas em testes a campo na forma de spray direto em 24
9 bovinos distribuídos em três grupos de animais cada. No teste a campo, as
10 curvas dose-resposta foram comparadas entre óleo de neem, óleo de laranja e
11 controle negativo (não tratado). As variáveis analisadas foram o número de
12 carrapatos aderidos ao corpo do animal em um, cinco e sete dias após o
13 tratamento. O tempo de queda *Knock down* 50 (KD50) da curva foi analisado e
14 revelou haver diferença significativa entre os grupos controle e tratamento,
15 sendo 8,38 horas o KD50 para o óleo de neem e 9,36 horas para o óleo de
16 laranja. Conclui-se que os óleos de neem e laranja como moléculas botânicas
17 acaricidas possuem potencial para uso na forma de concentrado emulsionável
18 para controlar carrapatos *R. microplus* em condições de campo como método
19 de manejo ecologicamente correto a fim de se diminuir ou até mesmo evitar
20 possíveis resistências dos carrapatos às aplicações de acaricidas sintéticos.

21

22 *Palavras-chave:* Carrapatos, acaricidas botânicos, óleo de neem, óleo de
23 laranja, Azadirachtin, controle de carrapatos.

24

25 **1. Introdução**

26 *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) é a espécie de
27 carrapato de maior importância econômica em países tropicais e subtropicais
28 com perdas anuais estimadas entre US\$ 22 e 30 bilhões de dólares (Lew-
29 Tabor e Rodriguez Valle, 2016), sendo US\$3,24 bilhões de dólares apenas no
30 Brasil (Grisi et al., 2014). Na Índia, o custo para o controle de carrapatos e de
31 doenças por eles transmitidas tem sido calculado em aproximadamente
32 US\$498,7 milhões/ano segundo Minjauw e McLeod (2003). Estima-se que cada
33 fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus microplus* é responsável por perdas de 8,9

1 $\pm 2,1$ mL na produção de leite, redução em ganho de peso vivo em $1,0 \pm 0,38$ g
2 e de peso vivo equivalente a 0,081 Milijoule (MJ) em perdas de energia
3 metabolizável por infestação de carrapatos (Jonsson et al., 1998, 2001).

4 Existem várias formas de controle de carrapatos tais como o
5 vacinal, genético pelo cruzamento de raças, biológico e botânico entre outros,
6 porém a mais amplamente utilizada é pelo emprego de produtos químicos
7 sintéticos com ação acaricida. No entanto, estes produtos apresentam vários
8 inconvenientes sendo a seleção à resistência possivelmente o maior deles.
9 Ademais, os acaricidas sintéticos podem causar intoxicações aos animais
10 tratados, teratogenicidade e mutagenicidade; há casos em que a persistência
11 ou bioacumulação dos produtos químicos em leite e tecidos demande tempos
12 de carência estendidos. Ambientalmente, os acaricidas sintéticos podem atingir
13 organismos não alvo ao serem pulverizados, ou pelo descarte de águas de
14 banheiras de imersão. Ainda, quando persistentes ou lixiviáveis os acaricidas
15 químicos alteram a microbiota em águas e solo. Nas últimas décadas diversos
16 estudos têm mostrado o uso de extratos botânicos como potenciais acaricidas.
17 Neste sentido, Ribeiro et al. (2010) demonstraram o efeito letal do óleo
18 essencial de *Hesperozygis epling* em concentrações entre 20 $\mu\text{L/ml}$ e 0,625
19 $\mu\text{L/ml}$ para larvas de *R. (B.) microplus* usando o teste de imersão de larvas
20 (TIL). Martinez-Velazquez et al. (2011) mostraram o efeito tóxico dos óleos
21 essenciais das pimentas *Cuminum cyminum* e *Pimenta dioica* ao causar
22 mortalidade de 100% em todas as concentrações testadas em larvas de *R.*
23 *microplus*. Em contrapartida, o óleo essencial de *Ocimum basilicum* não
24 mostrou toxicidade para esta espécie de carrapato. Matos et al. (2017) em
25 estudos utilizando extratos secos e frescos de *Aloe arborescens* Mill em
26 ensaios *in vitro* com fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* confirmaram a
27 presença de componentes com atividade acaricida e indicaram seu uso como
28 uma alternativa no controle de carrapatos. Agnolin et al. (2014) utilizaram óleo
29 de citronela 8,6% em experimento *in vivo* (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)
30 obtendo eficácia acima de 95% para carrapatos do boi. Mollong et al. (2018)
31 utilizando o teste de pacotes de larvas (TPL) com extrato cru de óleo essencial
32 de *C. anisata* em óleo vegetal de palmeira kernel (v/v) e flumethrin observaram

1 100% de mortalidade em larvas, todavia a toxicidade foi dose dependente e o
2 óleo pode ser benéfico no controle de carrapatos.

3 Kumar et al. (2016) reportaram a eficácia comparativa de dois
4 produtos herbais comerciais indianos, Zerokeet e Erina-EP, duas novas
5 fitoformulações em desenvolvimento chamadas de NBA/12/B2 e NAC-01 e
6 Butox, o produto químico mais agressivo do mercado anti-carrapaticida. A
7 eficácia máxima foi observada para NBA/13/B/2 (82,4–91,3 %), seguido de
8 NAC-01 (62,3–94,6 %), Zerokeet (41,8–75,4 %), Erina-EP (4,7–14,8 %) e uma
9 menor eficácia, de 1,5–6,2 %, foi observada para o Butox Vet. Em colaboração
10 recente com o grupo do Prof. Ghosh análise histoquímica demonstrou uma
11 ação tóxica do *Ageratum conyzoides* sobre carrapatos *R. (B.) microplus*
12 resistentes ao induzir má formação de oócitos, extensa vacuolização e redução
13 de grânulos de vitelo, similarmente ao observado em tratamentos utilizando
14 amitraz e coumafós (Kumar et al., 2019).

15 Singh et al. (2018) utilizando o bioensaio TIL relataram para o
16 produto botânico comercial Essentria® IC-3 concentrado, contendo óleo
17 Rosemary (10%), geraniol (5%) e óleo de hortelã (2%), com ação pelo bloqueio
18 de octopamina, uma atividade larvicida sobre cepas suscetíveis e resistentes
19 do *Rhipicephalus microplus*. Os valores de CL50 e CL95 para Essentria® IC-3
20 contra cepas suscetíveis foi calculado em 0,647% (0,59–0,69) e 1,033% (0,94–
21 1,19), respectivamente, no entanto, valores de CL50 e CL95 para outras cepas
22 sofreram variações de 0,597–1,674% e 0,927–2,236%, respectivamente.

23 Neste estudo, foram realizados ensaios laboratoriais para
24 determinação de concentrações letais dos óleos de neem (*Azadirachta indica*)
25 e laranja (*Citrus sinensis*) empregando-se o teste do pacote de larvas (TPL) e
26 posteriormente a concentração definida dos óleos de neem (*Azadirachta indica*)
27 e laranja (*Citrus sinensis*) foram testados em bovinos taurinos a campo em seu
28 potencial acaricida contra o carrapato *Rhipicephalus microplus* em formulações
29 do tipo concentrado emulsionável (CE).

31 **2. Materiais e método**

32 O estudo obteve autorização da Comissão de Ética em Pesquisa
33 no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob número 01116/2017, 2ª versão em

1 maio/2017 (Anexo 1).

2

3 **2.1. Teste in vitro**

4 **2.1.1. Carrapatos**

5 Fêmeas ingurgitadas da espécie *R. (B.) microplus* foram
6 coletadas dos bovinos, lavadas com água destilada e mantidas para oviposição
7 em condições controladas de temperatura ($28^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$), humidade relativa
8 ($80\% \pm 5\%$) e fotoperíodo (12:12 horas) em estufa com demanda biológica de
9 oxigênio (DBO). As larvas eclodidas foram mantidas nas mesmas condições
10 pelo período de duas semanas até o momento de seu uso no teste do pacote
11 de larvas.

12

13 **2.1.2. Óleos essenciais**

14 Os óleos essenciais foram obtidos de fontes comerciais, sendo o
15 óleo de neem proveniente da Neemoil (Parker BiotCEh) lote 3013136 e óleo de
16 laranja da empresa DICA Comercial lote 0032/17.

17

18 **2.1.3 Formulações**

19 Todos os componentes foram formulados na forma de
20 concentrado emulsionável (CE), cipermetrina foi utilizada como controle
21 positivo na concentração de 20% m/m, óleo de neem a 22,5% m/m e óleo de
22 laranja a 15% m/m de óleo essencial. O uso da formulação CE justifica-se
23 pelas propriedades químicas dos ingredientes ativos em relação a sua
24 solubilidade em água entre outras. Os concentrados foram diluídos em água
25 para a obtenção de calda com as concentrações em microgramas de
26 ingrediente ativo ($\mu\text{g i.a.}$) por litro expressas como apresentadas na Tabela 1.

27

28 *Tabela 1 – Concentrações de ingredientes ativos em microgramas ($\mu\text{g i.a.}$)*

Cipermetrina 20% ($\mu\text{g a.i.}$)	Óleo de Neem 22,5% ($\mu\text{g a.i.}$)	Óleo de laranja 15% ($\mu\text{g a.i.}$)
800	18.000	12.000
400	9.000	6.000
200	4.500	3.000
100	2.250	1.500

2.1.4. Bioensaio para o teste do pacote de larvas (TPL)

O teste do pacote de larvas (Stone and Haydock, 1962) foi realizado em quadruplicata para cada diluição (acaricidas e controle) como preconizado pela Food and Agriculture Organization – FAO (2004), com pequenas modificações. Em resumo, papéis filtro foram cortados em retângulos de 75 x 85 mm, previamente identificados com os nomes, concentração dos acaricidas e controles. Em seguida, os retângulos de papel foram impregnados com 1000 µl de solução acaricida e os retângulos controle com a mesma quantidade de água deionizada. Após impregnados, os papéis foram mantidos em laboratório para secagem e depois de secos foram dobrados na forma de envelope com suas extremidades presas com grampos especiais, permanecendo apenas uma abertura superior para colocação das larvas. Após 24 horas, entre 100 e 150 larvas foram colocadas com o auxílio de um pincel nos pacotes pré-impregnados, que tiveram a extremidade superior fechada com grampos. Os pacotes fechados foram mantidos em estufa BOD por 24 horas em temperatura de 28°C (±1,5°C), e humidade 80% (±5%). Após o período de incubação, os pacotes foram abertos e suas extremidades foram fixadas com alfinetes para a contagem das larvas mortas e vivas. Para tanto, foi utilizado um tubo de polietileno acoplado a uma pipeta Pasteur e bomba de vácuo para sucção das larvas. Os resultados foram expressos em percentual de larvas vivas e mortas em relação ao número total de larvas por pacote. As concentrações letais para 50%, 90% e 95% das larvas (CL50, CL90 e CL95, respectivamente) foram calculadas utilizando o programa estatístico Tabela Curve V3 (Florence, 1994).

2.1.5. Análise estatística para o ensaio *in vitro* (TPL).

Utilizou-se o programa Software AISN Inc. Para todos os ingredientes ativos, o modelo Gompertz (Eq. 1) foi ajustado por regressões não lineares, que, de acordo com Draper e Smith (1998), são aquelas em que pelo menos uma das derivadas parciais depende de algum parâmetro do modelo.

Eq. 1:

$$Mortalidade = a \cdot e^{-e^{-b(Concentração - c)}}$$

Onde:

- 1 a: assíntota horizontal – valor máximo
2 b e c: taxa de redução e ajuste de parâmetros
3 e: constante de Euler (aproximadamente 2.718281)

4 O procedimento de Marquadt e os métodos dos mínimos
5 quadrados foram utilizados, a qualidade do ajuste foi confirmada pelo
6 coeficiente de determinação que mede a qualidade do ajuste na linha de
7 regressão R^2 e erro padrão da estimativa Syx para verificar a variação dos
8 valores médios estimados em relação aos observados. As médias de
9 mortalidade foram comparadas pelo método ANOVA One-Way Tipo III ($\alpha =$
10 0,05), seguida pelo teste de Tukey de acordo com Steel et al. (1997), quando
11 se observou homogeneidade de variância (teste de Levene). Para o ensaio
12 campo a análise estatística inicial é a mesma diferenciando-se apenas quando
13 não houver observação de homogeneidade em que teste de Bonferroni seria
14 utilizado para comparar as médias.
15

16 **2.2. Teste a campo**

17 **2.2.1. Bovinos e contagem de carrapatos**

18 Foram utilizados para o ensaio 24 bovinos machos da raça Red
19 Angus, com idade média de 4 meses e peso entre 350 kg e 400 kg,
20 naturalmente infestados com *Rhipicephalus microplus* e mantidos em piquetes
21 simples na Fazenda Felipe, município de Porto Amazonas-PR (coordenadas -
22 25,5451790 e -49,9464040), com temperatura média de 24° nos dias 0 e 1,
23 22°C no dia 5 e 19°C no dia 7. Os animais foram aleatoriamente distribuídos
24 em três grupos com 8 animais cada e pulverizados com soluções de óleos de
25 neem ou de laranja e um grupo de animais foi mantido como controle negativo,
26 não tratado.

27 A contagem dos carrapatos no corpo dos animais foi estimada
28 com base na média de três contagens consecutivas de fêmeas de
29 *Rhipicephalus microplus* totalmente ingurgitadas, variando de 4,5 e 8,0 mm de
30 comprimento, localizadas no lado direito do corpo de cada animal, de acordo
31 com a técnica de Wharton e Utech (1970).

32

33 **2.2.2. Óleos essenciais**

1 Os óleos essenciais foram obtidos de fontes comerciais, sendo o
2 óleo de neem proveniente da Neemoil (Parker BiotCEh) lote 3013136 e óleo de
3 laranja da empresa DICA Comercial lote 0032/17.

4 5 **2.2.3 Formulações**

6 Os óleos essenciais de neem e laranja foram formulados como
7 concentrados emulsionáveis (CE) respectivamente a 22,5% e 15,0%. Diluições
8 seriadas foram preparadas para obtenção de caldas para pulverização com
9 concentrações de óleo de neem, respectivamente a 2.250, 4.500, 9.000 e
10 18.000 µg de ingrediente ativo (i.a.) e óleo de laranja a 1.500, 3.000, 6.000 e
11 12.000 µg i.a., conforme Tabela 4.

12
13 *Tabela 4 – Concentrações de ingrediente ativo em microgramas (µg i.a.) na*
14 *calda de tratamento para pulverização a campo.*

Óleo de Neem 12 % (µg a.i.)	Óleo de laranja 15% (µg a.i.)
18.000	12.000
9.000	6.000
4.500	3.000
2.250	1.500

15 16 **2.2.4. Bioensaio para teste a campo**

17 Foram utilizados 24 bovinos que foram divididos em tres grupos,
18 sendo um grupo o controle, que foi pulverizado somente com agua, outro grupo
19 com 8 animais pulverizado com solução contendo oleo de neem e o terceiro
20 grupo contando também com 8 animais e pulverizados com a solução contendo
21 o óleo de de laranja. Para a pulverização foram utilizados 80 ml de concentrado
22 emulsionavel por litro de água, obtendo solução com 18000 µg i.a. e 12000 µg
23 i.a., respectivamente para os óleos de neem e de laranja. A pulverização foi
24 feita de forma individual em piquetes utilizando-se pulverizador costal manual
25 pulverizando cada animal com cerca de 1,5 L de calda. Após tratados, os
26 bovinos foram inspecionados por palpação para verificação se a pelagem se
27 encontrava completamente molhada e após isso foram mantidos em piquete
28 por aproximadamente 1 hora para secagem da calda.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

2.2.5. Análise estatística para o ensaio *in vivo* (ensaio a campo).

Utilizou-se o programa Software AISN Inc. Para todos os ingredientes ativos, o modelo Gompertz (Eq. 1) foi ajustado por regressões não lineares, que, de acordo com Draper e Smith (1998), são aquelas em que pelo menos uma das derivadas parciais depende de algum parâmetro do modelo.

Eq. 1:

$$Mortalidade = a \cdot e^{-e^{-b(Concentração-c)}}$$

Onde:

- a: assíntota horizontal – valor máximo
- b e c: taxa de redução e ajuste de parâmetros
- e: constante de Euler (aproximadamente 2.718281)

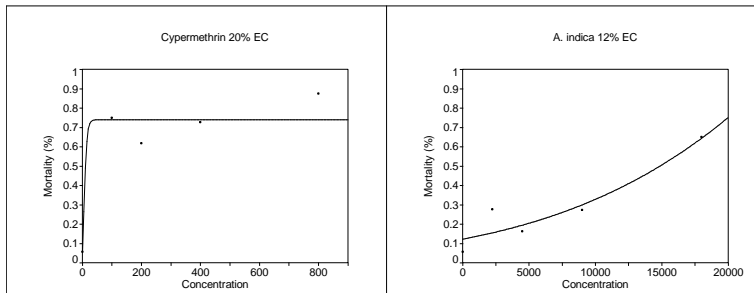
O procedimento de Marquadt e os métodos dos mínimos quadrados foram utilizados, a qualidade do ajuste foi confirmada pelo coeficiente de determinação que mede a qualidade do ajuste na linha de regressão R² e erro padrão da estimativa Syx para verificar a variação dos valores médios estimados em relação aos observados. As médias de mortalidade foram comparadas pelo método ANOVA One-Way Tipo III (α = 0,05), seguida pelo teste de Tukey de acordo com Steel et al. (1997), quando se observou homogeneidade de variância (teste de Levene).

3. Resultados

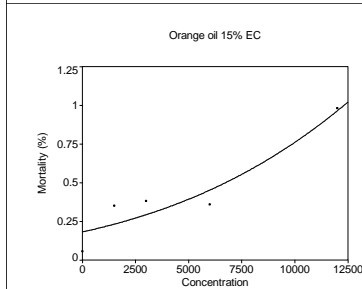
3.1. Resultados do TPL

Os resultados de mortalidade de larvas nos testes de laboratório apresentaram mortalidade percentual de 73,9%, 100% e 100% para a cipermetrina, óleos de neem e laranja, respectivamente nas maiores dosagens propostas (Tabela 3 e Figuras 1A, B e C). A concentração letal do ingrediente ativo cipermetrina não alcançou 90% na dosagem de 800 µg e por este motivo não foi utilizada nos ensaios a campo.

1



2



3 Figuras 1 A, B e C – Mortalidade larval para Cipermetrina 20% CE, Óleo de
 4 Neem (*A. indica*) 12% CE e Óleo de laranja 15% CE respectivamente de
 5 acordo com a concentração.

6

7 Tabela 2 – Parâmetros estatísticos entre moléculas no TPL

Parâmetro	Cipermetrina	Neem	Óleo de laranja
R ²	0,674	0,590	0,591
Syx	0,129	0,101	0,153
Mortalidade máxima	0,739	1,000	1,000
CL50 (µg)	10,27	14,881	6744
CL90 (µg)	-	22,434	11,405
CL95 (µg)	-	23,182	11,869

8 R²: Coeficiente de determinação

9 Syx: Estimativa do desvio padrão

10 CL: Concentração letal

11

12 Tabela 3 – Mortalidade percentual de *Rhipicephalus microplus* submetidos a
 13 Cipermetrina, neem e óleo de laranja para TPL. Resultados são expressos em
 14 média ± desvio padrão.

Dose	Cipermetrina	Dose	Óleo de neem	Dose	Óleo de laranja
Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Controle	14.35±4.77	Controle	14.35±4.77	Controle	14.35±4.77

800	100.00±0.00	18,000	100.00±0.00	12000	100.00±0.00
400	100.00±0.00	9,000	100.00±0.00	6000	100.00±0.00
200	100.00±0.00	4,500	97.90±2.41	3000	100.00±0.00
100	99.48±1.12	2,250	94.82±5.54	1500	100.00±0.00

1

2 3.2. Resultados do teste a campo

3 De acordo com ANOVA, foi observada interação significativa entre
 4 os tratamentos e os dias, razão pela qual as médias dos grupos em cada dia e
 5 as médias dos dias em cada grupo foram comparadas. As diferenças entre as
 6 médias na queda dos carrapatos podem ser observadas na Tabela 5 e Figuras
 7 4 e 5.

8

9 *Tabela 4 – Resultado referente ao número de carrapatos aderidos ao corpo dos*
 10 *bovinos (knock down) Rhipicephalus microplus submetidos ao Óleo de neem,*
 11 *Óleo de laranja e grupo controle. Resultados são expressos em média ± desvio*
 12 *padrão.*

13

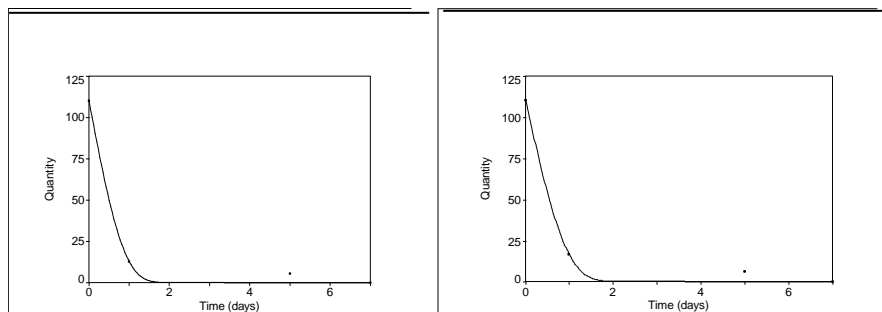
Grupo	Dia 0	Dia 1	Dia 5	Dia 7
Controle	110,00 ± 0,00aA	110,00 ± 0,00aA	134,00 ± 25,63aA	134,00 ± 25,63aA
Neem	110,00 ± 0,00aA	12,75 ± 5,78bB	5,38 ± 3,34bC	0,00 ± 0,00bD
Orange	110,00 ± 0,00aA	16,25 ± 6,32bB	6,13 ± 6,45bC	0,00 ± 0,00bC

14

15 Letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas $p < 0,01$ entre os
 16 dias testados. Letras maiúsculas diferentes significam diferenças significativas
 17 $P < 0,01$ entre os óleos testados.

18

19



20 *Figuras 4 e 5 – Queda de carrapatos de acordo com o tempo de ação do Óleo*
 21 *de neem e do Óleo de laranja, respectivamente.*

1

2 *Tabela 5 – Parâmetros estatísticos entre moléculas para o acaricida com óleo*
3 *de neem, de laranja aplicados em bovinos para teste a campo.*

Parâmetros	Óleo de neem	Óleo de laranja	
R^2	0.989	0.986	5
S_{yx}	5.379	6.129	6
Mortalidade máxima	100%	100%	7
KD50	8h23min	9h36min	8
KD90	24h58min	26h51min	9
KD95	29h01min	31h12min	10
			11

12 R^2 : Coeficiente de determinação

13 S_{yx} : Erro padrão da estimativa

14

15 **4. Discussão**

16 Os resultados demonstram que óleo de neem CE 22,5% induz
17 significante mortalidade de larvas usando o TPL, similarmente ao resultado
18 apresentado por Broglio-Micheletti et al. (2010) quando avaliaram o efeito de
19 extratos orgânicos de plantas e óleo emulsificado de *Azadirachta indica* A. Juss
20 (Meliaceae) (neem) no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus*
21 *microplus* em laboratório. Estes autores demonstraram o potencial de controle
22 de *Rhipicephalus microplus* com mortalidades de $20 \pm 6.4\%$ a $96 \pm 4.0\%$, e
23 atuação sobre a oviposição com potencial na redução das massas de ovos.
24 Broglio-Micheletti et. al. (2009) avaliaram em laboratório pelo teste de imersão
25 de adultos, a eficácia do extrato alcoólico a 2% (peso/volume) de sementes de
26 *Annona muricata* L. (Annonaceae) (Graviola); flores de *Syzygium malaccensis*
27 (L.) (Myrtaceae) (Jambo); folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf
28 (Poaceae) (Capim-Santo); folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)
29 (Neem); e extrato hexânico na mesma concentração de *A. indica* (sementes)
30 para controle de *R. (B.) microplus* em laboratório. O extrato de *A. muricata*
31 mostrou maior poder acaricida, com eficiência de 100%, seguido pelo extrato
32 de *S. malaccensis* (75 e 59,24%) e *A. indica* (65 e 38,49%). Houve 100% de

1 redução na eclosão das larvas quando extrato da semente de *A. muricata* foi
2 usado.

3 Santos et. al (2012) avaliaram in vitro pelo teste de imersão de
4 fêmeas ingurgitadas em extratos aquoso e alcoólico de folhas frescas de neem
5 (*Azadirachta indica*) 10% e 50% e óleo essencial de cravo (*Syzygium*
6 *aromaticum*) 2.5% e 5% contra carrapatos *Rhipicephalus microplus*. Os
7 resultados médios obtidos para o neem foram de 15,04% a 74,39%,
8 dependendo da concentração e solvente utilizado, e a eficácia média do óleo
9 essencial de cravo foi 97,15 e 99,4%, respectivamente.

10 Eckstein et al. (2016) estudaram in vitro a eficácia de acaricidas
11 comerciais em seis populações de *Rhipicephalus microplus* através do teste de
12 imersão de adultos anotando as eficácias mínimas e máximas obtidas para
13 cada produto, tendo sido respectivamente de 1,1% e 94,71% para
14 Cipermetrina, 99,15% e 100% para Cipermetrina + chlorpyrifos + Citronela,
15 8,93% e 100% para Amitraz, 18,99% e 100% para Trichlorfon e 13,68% e
16 100% para neem.

17 Neste ensaio observou-se influência significativa dos produtos
18 testados e o tempo decorrido após sua aplicação para o número de carrapatos
19 destacados. Com isso pode-se inferir que a quantidade de carrapatos varia de
20 acordo com o tempo (Tabela 5), tendo metade dos carrapatos se destacado de
21 seus hospedeiros em cerca de 8 horas após a aplicação de neem e de
22 aproximadamente 9 horas para aplicação do óleo de laranja, alcançando 95%
23 de queda em 29 e 31 horas, respectivamente.

24 Não houve diferença significativa nas quantidades de carrapatos
25 destacados entre os produtos testados, mas estes apresentaram ocorrências
26 estatisticamente menores que o controle. Vale ressaltar um aumento no
27 número de carrapatos encontrados nos animais pertencentes ao grupo
28 controle, o que reforça a eficiência do neem e da laranja no controle de
29 carrapatos neste estudo.

30 Com base nos resultados acima e o acréscimo no número de
31 carrapatos desprendidos a partir do primeiro dia de aplicação, similarmente ao
32 reportado por Al-Rajhy et al. (2003), o óleo de neem pode ser considerado um
33 potente acaricida que afeta a alimentação, desenvolvimento e ecdise das

1 larvas em diferentes ordens e a baixas concentrações. Todavia, neem CE e
2 óleo de neem CE, respectivamente nas concentrações de i.e. 5000mg litre⁻¹,
3 apresentaram efeitos quase nulos quando testados em carrapatos de camelos
4 *Hyalomma* spp, corroborado por Abdel-Shafy e A. Zayed (2002) ao usarem
5 extrato comercial de sementes de Neem Azal F (Trifolio-M GmbH, Germany)
6 contendo 5% de neem para avaliar o efeito acaricida sobre os estágios de
7 ovos, imaturos e adultos de *Hyalomma anatolicum excavatum*, concluindo que
8 o produto comercial Neem Azal F apresentou efeito significativo no controle
9 usando concentrações econômicas de 1,6 e 3,2%.

10 Radhika et al. (2018) avaliaram monocrotofós e neem combinados
11 em proporções de 10% (10: 90), 20% (20: 80), 30% (30: 70), 40% (40: 60) e
12 50% (50: 50) em condições de laboratório para determinar a eficácia das
13 propriedades pesticida, repelente, atrativo, estimulante de consumo,
14 desenvolvimento e reprodução, observando um efeito sinergista do óleo de
15 neem associado ao monocrotofós no controle de *Spodoptera litura*. A técnica
16 de Malian emprega extração aquosa empírica de sementes de neem provendo
17 preparações inseticidas com cerca de 200 mg L⁻¹ azadiractina A, e ensaios
18 realizados com cigarrinhas *Macrostelus quadripunctulatus* e mariposa *S.*
19 *littoralis* mostraram que o extrato de neem foi tão efetivo quanto o produto
20 comercial a base de azadiractina A (Boursier et al., 2011). Merece destaque a
21 escassez de ensaios sobre controle de carrapatos utilizando óleo essencial de
22 laranja. Dentre os poucos artigos encontrados na literatura, Chungsamarnnyart
23 & Jansawan (1996) ao testarem óleo de casca de *Citrus sinensis* diluído em
24 etanol 95% nas proporções 1:5, 1:10 e 1:15 (V/V) no bioensaio da imersão de
25 fêmeas ingurgitadas verificaram alta atividade larvicida na diluição 1:10.
26 Vinturelle et al. (2017) testaram o óleo de limão contra o carrapato de boi
27 *Rhipicephalus microplus* contendo limoneno (50,3%), β -pineno (14,4%) e γ -
28 terpineno (11,7%) como os principais componentes; a atividade acaricida foi
29 avaliada nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0% (v / v) em teste de imersão por
30 um minuto de fêmeas ingurgitadas, obtendo CL90 dos óleos de *C. limonum* de
31 4,9%. Armugan et al. (2016) testaram extratos obtidos das cascas de *C.*
32 *sinensis* a 50%, 75% e 95% de concentração e obtiveram mortalidades de 95%
33 a 98% (P< 0,05) em carrapatos de cães *Rhipicephalus sanguineus*, o que

1 permite por analogia associar sua possível eficácia para o carrapato do boi
2 *Rhipicephalus microplus*
3

4 **5. Conclusões**

5

6 Os resultados obtidos no presente estudo mostram relevante
7 eficácia dos óleos de neem e laranja a 22,5% e 15%, respectivamente na forma
8 de concentrados emulsionáveis no controle de larvas de *Rhipicephalus*
9 *microplus* em ensaios laboratoriais e no controle de carrapatos a campo em
10 bovinos naturalmente infestados. Como o controle de carrapatos é baseado em
11 técnicas de manejo apropriadas, o uso de acaricidas botânicos de forma
12 isolada ou associado a outras formas de controle mostram-se como uma
13 promissora ferramenta ao bem-estar animal e alternativa viável técnica,
14 econômica e ambientalmente para se evitar mecanismos naturais de seleção
15 de carrapatos resistentes aos produtos, ao mesmo tempo em que mitiga
16 intoxicações, contaminações cruzadas e danos ambientais. Estudos
17 complementares relacionados à toxicologia, segurança e eficácia alimentar
18 devem ser realizados a fim de refletir a melhor prática para consumo de
19 subprodutos bovinos.

20 Há ainda a necessidade de estender o experimento a diferentes
21 raças e regiões antes da indicação do uso de acaricidas botânicos no rebanho
22 bovino como alternativa de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

23 **6. Referencias**

24

25 Abdel-Shafy S.; Zayed A.A. In vitro acaricidal effect of plant extract of neem
26 seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma*
27 *anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 106
28 (2002) 89–96. Short communication. www.elsevier.com/locate/vetpar. PII: S0 3
29 04 -4 0 17 (0 2)0 0 0 2 3 -7
30

31 Al-Rajhy D.H.; Alahmed A.M.; Hussein H.I.; Kheir S.M. Acaricidal effects of
32 cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma*
33

1 *dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Pest Management Science Pest Manag Sci*
2 59:1250–1254 (online: 2003). DOI: 10.1002/ps.748

3
4 Armugan V.; Sundraraj Y.A.; Saled I. The effect of *Citrus sinensis* peel extract
5 against *Rhipicephalus sanguineus* (Carrapato de cão). *Malays. Appl. Biol.*
6 (2016) 45(2): 119-123.

7
8 Boursier C.M.; Bosco D.; Coulibaly A.; Negre M. Are traditional neem extract
9 preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A? *Crop*
10 *Protection* 30 (2011) 318e322. doi:10.1016/j.cropro.2010.11.022.

11
12 Broglio-Micheletti¹ S.M.F.; Valente E.C.N.; Souza L.A.; Dias N.S.; Araujo
13 A.M.N. Plant extracts in control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
14 (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in laboratory. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*,
15 Jaboticabal, v. 18, n. 4, p. 44-48, out.-dez. 2009. ISSN 1984-2961

16
17 Broglio-Micheletti S.M.F.; Dias N.S.; Valente E.C.N.; Souza L.A.; Lopes D.O.P.;
18 Santos J.M. Action of extract and oil neem in the control of *Rhipicephalus*
19 (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in laboratory. *Rev.*
20 *Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 44-48, jan.-mar. 2010. ISSN
21 0103-846X (impresso) / ISSN 1984-2961 (eletrônico).

22
23 Chungsamarnnyart N.; Jansawan W. Acaricidal activity of Peel Oil of *Citrus* spp
24 on *Boophilus microplus*. *Kanetsar J (Nat. Sci.)* 30:112 – 177 (1996).

25
26 Eckstein C.; Campos A.K.; Lopes L.B.; Maluf J.M.; Soares E.J.; Kachiyama J.B.
27 *In vitro* efficacy of commercial acaricides indicate resistant populations of
28 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in northern region of Mato Grosso. Issue
29 ID: *Sci. Elec. Arch.* 9:1 (2016).
30 http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=210&path%5B%5D=pdf_75

31
32 Grisi L.; Leite R.C.; Martins J.R.; Barros A.T.; Andreotti R.; Cançado P.H.; León
33 A.A.; Pereira J.B.; Villela H.S. Reassessment of the potential economic impact

1 of cattle parasites in Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.
2 2014; 23(2):150-6. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>.
3
4 Kumar A.G.K.; Sharma A.K.; Kumar S.; Ray D.D.; Rawat A.K.S.; Srivastava
5 S.; Ghosh S. Comparative in vitro anti-tick efficacy of commercially available
6 products and newly developed phyto-formulations against field collected and
7 resistant tick lines of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. J Parasit Dis (Oct-
8 DCE 2016) 40(4):1590–1596 doi 10.1007/s12639-015-0736-3
9
10 Kumar A.K.G.; Fulara A.; Chigurea G.; Sharma A. K.; Nagara G.; Souza F.F.;
11 Bechara G.H. Ghosh S. Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant
12 extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*.
13 Ticks and Tick-borne Diseases 10 (2019) 1085–1095.
14 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.003>.
15
16 Lew-Tabor, A.E.; Valle R.M. (2016). A review of reverse vaccinology
17 approaches for the development of vaccines against ticks and tick- borne
18 diseases. Ticks Tick Borne Dis. 7(4), 573–585. doi:
19 10.1016/j.ttbdis.2015.12.012
20
21 Matos A.C.; Ribeiro C.M.; Scarminio I.S.; Afonso S.; Vidotto O. Phytochemical
22 analysis and acaricidal activity of *Aloe arborescens* Mill. extracts against
23 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.
24 38, n. 5, p. 3113-3122, set./out. 2017. doi: 10.5433/1679-
25 0359.2017v38n5p3113
26
27 Jonsson N. N.; Piper E. K. Integrated Control Programs for Ticks on Cattle. UQ
28 Printery Australia, p. 135–136, 2007.
29
30 Radhika S.; Sahayaraj K.; Senthil-Nathan S.; Hunter W.B. Individual and
31 synergist activities of monocrotophos with neem based pesticide, Vijayneem
32 against *Spodoptera litura*. Physiological and Molecular Plant Pathology 101
33 (2018) 54-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.05.004>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
31
32

Ribeiro V.L.S.; Santos J.C.; Bordignon S.A.L.; Apel M.A.; Henriques A.T.; von Poser G.L. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bioresource Technology* 101 (2010) 2506–2509 doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.016

Santos A.V.; Oliveira R.A.; Albuquerque G.R. Efeito *in vitro* do extrato de nim (*Azadirachta indica*) e óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 34(2):111-115, abr/jun 2012.

Martinez-Velazquez M.; Castillo-Herrera G.A.; Rosario-Cruz R.; Flores-Fernandez J.M.; Lopez-Ramirez J.; Hernandez-Gutierrez R.; Lugo-Cervantes E.C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* (2011) 108:481–487. doi 10.1007/s00436-010-2069-6

Vinturelle R.; Mattos C.; Meloni J.; Nogueira J.; Nunes M.J.; Vaz Jr. IS,7,8 Rocha L, Lione V, Castro CH,2 e das Chagas EF. In Vitro Evaluation of Essential Oils Derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Hindawi Biochemistry Research International* Volume 2017, Article ID 5342947, 9 pages <https://doi.org/10.1155/2017/5342947>

CAPÍTULO 4

Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*.

ARTICLE IN PRESS

Ticks and Tick-borne Diseases xxx (xxxx) xxx-xxxx

Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/tbdis

Original article

Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*

Ajith Kumar K.G.^{a,1}, Ashutosh Fular^a, Gajanan Chigure^{a,2}, Anil Kumar Sharma^a, Gaurav Nagar^a, Francinea F. Souza^b, Gervasio H. Bechara^b, Srikant Ghosh^{a,*}

^a Parasitology Laboratory, Division of Parasitology, ICAR Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, 241222, UP, India
^b Graduate Program in Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 80215-901, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Ageratum conyzoides
Amitraz
Coumaphos
Histology
Oogenesis
Rhipicephalus microplus

ABSTRACT

The present experiment was conducted to evaluate and compare the impact of *Ageratum conyzoides* plant extract (ACE) with routinely used synthetic acaricides i.e., amitraz and coumaphos on the oogenesis of engorged adult females of *Rhipicephalus microplus* tick. On the day of dropping from the host, parasitic ovary of *R. microplus* appeared white in colour, horseshoe shaped, hollow tubular organ with immature oocytes predominantly in dorsal groove. Different developmental stages of oocytes (I-V) present simultaneously and asynchronously. Oocytes showed gradual increase in size, deep brown colored with accumulation of eggs in oviduct during 24–72 hours of development. At LC₅₀ concentration a highly significant ($p < 0.001$) cessation of egg laying after exposure to amitraz and ACE while significant reduction ($p < 0.01$) of egg laying in coumaphos treated ticks was observed. Upon dissection of treated ticks, uterus and oviduct packed with eggs, which failed to pass out was observed. The histo-architectural alterations including presence of extensive vacuolation, alteration of oocyte morphology, deformation of chorion and disorganization of yolk granules were observed in the treated ovaries. Histochemically, low level of storage or synthesis of essential elements viz., proteins, polysaccharides and lipids in treated oocytes responsible for reduction of fertility and inhibition of progress of vitellogenesis was observed.

1. Introduction

The cattle tick, *Rhipicephalus microplus* (Carnegie, 1888) is the most economically important tick species of tropical and sub-tropical countries of the world, causing estimated global annual losses of US\$ 22 to 30 billion (Law-Tabor and Rodriguez Valle, 2016) and US\$3.4 billion during 2012 in Brazil (Grisi et al., 2014). In India, the cost of management of ticks and tick borne diseases (TTBDs) has been estimated as US\$ 498.7 million/annum (Majumdar and McLeod, 2003). The *R. microplus* is reported from almost all the states of India and is responsible for transmission of babesiosis and anaplasmosis in cattle (Ghosh and Anshumanmit, 2007), low productivity (Rodriguez and Leite, 2013) and reduction in value of leather (Blowen, 2003). It is estimated that each engorging female of *R. microplus* is responsible for a loss of 8.9 ± 2.1 ml milk and 1.0 ± 0.38 g live weight gain which is equivalent to 0.081 MJ metabolizable energy losses per tick infestation (Jenson et al., 1998, 2001).

In spite of some well-known drawbacks of use of chemicals viz., environmental pollution, residues in milk and meat; selection and establishment of acaricide resistant ticks; acaricides are still remaining a primary tool in tick management platform. Currently, use of four classes of chemical acaricides viz., organophosphates, pyrethroids, formamidines and macrocyclic lactones, is the mainstay of tick management programme in India. However, in recent years use of amitraz and ivermectin is comparatively increased due to inefficiency of OP and SP group of acaricides. The use of amitraz has been reported since 1971 (Palmer et al., 1971) for the control of ticks.

Amitraz is a triazapentadiene compound belongs to formamidines pesticide family and is used in veterinary medicine, agricultural and in horticultural practices throughout the world since 1974. It hydrolyzes

* Corresponding author.
E-mail address: sgosh@icvri.res.in (S. Ghosh).
¹ Department of Veterinary Parasitology, College of Veterinary and Animal Sciences, Pookode, Kerala Veterinary And Animal Sciences University, Wayanad -673576, Kerala, India.
² Department of Veterinary Parasitology, College of Veterinary and Animal Sciences, Parbhani, Maharashtra Animal and Fishery Sciences University, Maharashtra, India.

<https://doi.org/10.1016/j.tbdis.2019.06.003>
Received 21 December 2019; Received in revised form 17 May 2020; Accepted 2 June 2020
1877-9568/ © 2019 Published by Elsevier GmbH.

Please cite this article as: Ajith Kumar K.G., et al., Ticks and Tick-borne Diseases, <https://doi.org/10.1016/j.tbdis.2019.06.003>

into two metabolites such as 2, 4-dimethylformamide (DMF) and N-(2, 4-dimethylphenyl)-N-methylformamide (DMFM). These metabolites are further metabolized to 2, 4-dimethylaniline (DMA) and ultimately to 4-amino-3-methylbenzoic acid, which is the major metabolite found in the urine and liver (Arnonson et al., 1988; Jones, 1990). In arthropods, it acts as an octopamine agonist resulting in hyperpolarization in establishing amitraz resistance was proposed. In the presence of amitraz in susceptible ticks, reduced Ca^{+2} entry inhibits glutamate release which in turn maintains Mg^{+2} block thus further reduces Ca^{+2} entry via NMDA receptors, leading to constant excitation and paralysis Baran et al. (2018).

Coumaphos is an organophosphorus pesticide having the chemical name of o-ester of 3-chloro-7-hydroxy-4-methylcoumarin and o,o-dithiophosphorothioate (Martin, 1973). The inhibition of AChE by organophosphates occurs by means of a chemical reaction in which the serine hydroxyl moiety at the active site of the enzyme is phosphorylated in a manner analogous to the acetylation of AChE. The serine hydroxyl moiety, once blocked by the phosphorylated fraction, is no longer able to participate in the hydrolysis of acetylcholine and continuous signaling leads to paralysis and death (Folstein, 1990). Resistance to organophosphates in insects showed relatively rapid reversion upon cessation of selection pressure (Yu, 2008). In a recent study, coumaphos, which was practically withdrawn from veterinary use in India around 20 years ago due to its ineffectiveness, was found effective against ticks (Chigore et al., 2018).

An Indian *R. microplus* has developed resistance to multiple acaricides (Singh et al., 2010; Sharma et al., 2012; Singh and Rath, 2014; Kumar et al., 2011, 2014; Chigore et al., 2018; Nandi et al., 2018). Identification of new molecules having different mode of action alone or in synergy in the presence of additives/inhibitors is one of the key research areas.

To develop a sustainable tick management strategy in the present complicated scenario, attempts have been made to identify plants with strong antitick activity with success (Srivastava et al., 2008; Ghosh et al., 2015; Adenubi et al., 2016; Avraam et al., 2017). *Ageratum conyzoides* Linn. (Family: Asteraceae), is a common annual herbaceous weed widely distributed. A number of medicinal properties of this weed have been reported earlier viz. as analgesic, antioxidant, hepatoprotective, blood booster, antitumor and used for the treatment of high blood pressure, fever, diabetes, pneumonia, wounds and burn, microbial infections, arthritis, headache, inflammation, dyspepsia, pain, asthma, spasms, gynecological diseases, leprosy and numerous infectious and skin diseases (Khan et al., 2004; Memut et al., 1993; Jagotta et al., 2003; Kambej and Saktja, 2008; Its et al., 2007, 2009). It is reported that the multi-functional activities of the plants are possibly due to synergistic properties of phyto-constituents present in the solvent guided extracts (Rindolt, 1969; Durodola, 1977; Sultana et al., 2012). In our earlier study, the ethanolic extract of the plant was found 76.7–90% efficacious against acaricide-resistant field ticks and its active fraction and subfraction contained 6,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran (Preococins II, ageratochromene) as the major chemical component (Kumar et al., 2016). The antitick activity of Preococins II has previously been demonstrated using engorged females (Booth et al., 1986; Ribeiro et al., 2011).

A great deal of literature documented inhibition of egg-laying (Estrada-Pena and Achar, 1999; Costo-Baydiger et al., 2015) and hatching (Haque et al., 2014) properties of amitraz and coumaphos (Ravindra et al., 2018). However, until now limited or no information is available on impact of these compounds on cellular alteration and cytochemical changes in ovarian developmental process. With an objective to establish the possible mode of action of the identified anti-tick plant extract of *A. conyzoides* (ACE), the present study was conducted to evaluate and compare the impact of the ACE with routinely used synthetic acaricides on the oogenesis of *R. microplus*.

2. Material and methods

2.1. Ticks

The colony of reference acaricide-susceptible IVRI line-I of *R. microplus* (Reg. No. NBAIL/IVRI/BM/1/1998) maintained in the Entomology laboratories, Division of Parasitology, ICAR-IVRI were reared on disease-free cross-bred male calves as per the protocol standardized in the laboratory (Ghosh and Achharianambi, 2007). A total of 120 freshly dropped, fully engorged adults were collected. The collected ticks were washed thoroughly with tap water, dried on soft absorbent paper and divided into six groups each consisting of 20 ticks. Necessary permission (F.25/8/2016-CPCSEA) from Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experimentation on Animals (CPCSEA), the regulatory authority monitoring animal experimentation was taken.

2.2. Treatment of ticks

Technical grade amitraz 99.98% and coumaphos 99.8% pure were purchased from AcraStandard Inc. U.S.A. The extract of aerial parts of *A. conyzoides* (ACE) was prepared in 95% ethanol (Kumar et al., 2016). The LC_{50} concentration of amitraz, coumaphos (Kumar et al., 2014) and ACE (Kumar et al., 2016) were determined earlier using reference IVRI-I strain and the values were 0.038%, 0.007% and 8.91% respectively.

The adult immersion test (AIT) as per the protocol standardized in the laboratory was adopted for treatment of ticks (Sharma et al., 2012). Briefly, the ticks ($n = 20$ for each drug) were exposed to LC_{50} concentration of amitraz, coumaphos and the extract while control ticks ($n = 20$ for each group) were exposed to 10% methanol for synthetic acaricides and 10% ethanol plus 2% tween 20 for ACE. All the ticks were immersed for 2 min and then transferred to the petri dishes padded with Whatman filter paper no 1. After 24 h, ticks were transferred to the glass vials capped with cotton cloth and were kept in BOD incubator maintained at 28 °C and 85 ± 5% RH. The biological parameters were monitored up to 14 days and the ticks that did not oviposit were considered as dead. The mortality of ticks was recorded regularly by observing loss of motility and pedal reflex after exposing to light. The ticks that survived were reared subsequently for generating the data on inhibition of oviposition. The inhibition of oviposition was determined (Stödel, 1980).

Reproductive Index = Egg mass/Engorged tick weight

Percentage inhibition of oviposition (%IO)

$$= \frac{RI(\text{control}) - RI(\text{treated}) \times 100}{RI(\text{control})}$$

The entomological data were statistically analyzed using GraphPad Prism 5 software. To compare experimental data with control set, one way ANOVA using Tukey's test was performed.

2.3. Processing of ticks for histological and histochemical studies

The group of ticks treated with amitraz, coumaphos and ACE were dissected after 48 h of treatment to collect the ovaries as per the laboratory standardized protocol. Briefly, ticks were anesthetized using thermal shock by keeping at 4 °C for 10 min and then fixed on the dissection plate filled with paraffin. Dissection was done under dissecting microscope (Olympus microscope BX53). After cutting of both sides, dorsal cuticle was gently lifted from the anterior end and detached the attachments from visceral organs with a teasing needle. Then ovary was gently lifted and transferred to chilled phosphate buffered saline, washed twice and then transferred to the relevant fixative for sectioning and staining.

Three fixatives viz., 4% paraformaldehyde for 24 h (H&E and Bromo phenol blue staining for cellular architecture and detection of proteins,

respectively), 10% calcium formaldehyde or formal calcium and Bouin's solution for 12 h (for the detection of lipids and neutral polysaccharides, respectively), were used. Prior to dehydration in alcohol, tissues were cut into small pieces of 4 mm size and then dehydrated in increasing strength of ethanol (70, 80, 90 and 95%) for 15 min. each at room temperature while tissues fixed in formal calcium were dehydrated in chilled ethanol at 4 °C to prevent the loss of lipid during dehydration. Infiltration and embedding of ovarian tissue were done with JB-4 Embedding Kit (Sigma-Aldrich, USA). The tissues were then transferred to polyethylene embedding BEEM[®] (Polysciences, Inc., USA) capsules previously filled with resin containing a catalyst. After closing the cap of embedding capsule, transferred to vacuum desiccators fixed at not more than 15 psi, filled with ice to provide a temperature of 2–8 °C required for exothermic reaction during resin polymerization. After polymerization, tissues were sectioned (3 µm) using ultra-microtome (Leica EM UC7) and stained with hematoxylin and eosin, following routine staining procedures.

For histochemical study, tissue fixed in 4% paraformaldehyde was stained with Bromophenol Blue for detection of protein. For lipids, Baker's staining was adopted. Polysaccharides were stained simultaneously with Periodic acid–Schiff (PAS)/ Alcian Blue.

2.4. Bromophenol blue staining (Pearse, 1985) for detection of protein

The 4% paraformaldehyde fixed ovary sections were stained with bromophenol blue for 2 h at room temperature (RT) and then, immersed in 0.5% acetic acid for 5 min. After washing with running water for 15 min, sample was quickly immersed in tertiary butyl alcohol for 5 s and then left to dry at RT, mounted in DPX and examined under microscope (Olympus BX53).

2.5. Baker's staining (Baker, 1946) for detection of lipids

Lipids content was detected as per the protocol of Sampieri et al. (2013). The formal calcium fixed tissue sections were immersed in calcium dichromate for 18 h, washed in distilled water and dipped in hematoxylin solution for 5 h. After giving a final wash in distilled water the slides were dried on a hot plate set at low temperature and immediately mounted with glycerin jelly, examined under light microscope and photographed.

2.6. Alcian blue/PAS staining (Junqueira and Junqueira, 1983) for acid and neutral polysaccharides

Sections prepared from Bouin's fixed tissue were rehydrated by immersing in distilled water, transferred to 1% Alcian blue in 3% acetic acid for 30 min. After washing in distilled water, slides were transferred to 1% PAS solution for 5 min and again washed for 10 min in distilled water. The slides were immersed in Schiff reagent for 15 min., washed in running water and allowed to dry at RT, examined under light microscope and photographed.

3. Results

3.1. Gross architecture of ovary of untreated and treated *R. microplus* ticks

Ovary of *R. microplus* was a hollow hornshoe shaped tubular organ (Fig. 1a, b) opening distally into oviducts and was of pascotic type. At the time of dropping from the host, ovary appeared white in colour (Fig. 1a). Most of the immature oocytes were present in dorsal groove, which was situated along the entire longitudinal axis of ovary (Fig. 1b). Ovarian wall was lined by a single layer of epithelial cell to which oval to round oocytes of various sizes and shapes are attached. Different developmental stages of oocytes are processed simultaneously and asynchronously. Oocytes area is attached to ovary by a stalk called pedicel or funicle formed by a group of epithelial cells. Pedicel cells

were cylindrical or pyramidal in shape. Gradual increase in size and deep brown colour was noticeable during 24 to 48 h of development with the accumulation of eggs in the oviduct towards the end of oviposition (Fig. 1c, d).

After treatment of engorged females with amitraz, coumaphos and ACE, a significantly high percentage of ticks were not able to lay eggs on fourth day of treatment while normal laying pattern was observed in untreated ticks. A significantly ($p < 0.001$) low egg mass production (17.2 ± 4.0 mg) in the survived ticks was recorded with 90.7% inhibition of oviposition as compared to control (Table 1). Upon dissection of treated ticks, packed uterus and oviduct with eggs, which failed to pass out (Fig. 1e–g) was noticed. Slower development of oocytes (more number of immature oocytes in treated ticks in comparison to untreated ticks) was observed at 24 and 48 h of oviposition.

3.2. Cellular profile of untreated ovary (H&E staining)

Type I oocyte: smallest, round to elliptical shaped with a mean size of 42.92 ± 2.4 µm \times 28.1 ± 2.7 µm. Germinal vesicles (23.93 ± 0.67 µm) were at the center with ring shaped nucleoli. Frequently, two nucleoli with maximum of four nucleoli (4.1 ± 0.41 µm) were seen in some cases. Cytoplasm was agranular and basophilic in nature and was delimited by a thin plasmic membrane. Nucleus to cytoplasmic ratio was highest compared to other type of oocytes (Fig. 2a).

Type II oocyte: oocytes were elliptical, larger (mean 61.0 ± 4.8 µm \times 44.4 ± 2.6 µm) than type I, with fine granulation dispersed throughout the cytoplasm. A central germinal vesicle (21.64 ± 1.84 µm) with one or two nucleoli (3.95 ± 0.63 µm) was evident. Nucleus to cytoplasmic ratio was decreased greatly as compared to type I (Fig. 2b).

Type III oocyte: round or roughly elliptical, mean size of 93.53 ± 6.8 µm \times 67.34 ± 4.02 µm was observed with higher dominance at 48 h of dropping. Cytoplasm contained coarser granulation distributed homogeneously. Germinal vesicle moved towards the ovarian wall at a pole next to the oocyte pedicel junction. Germinal vesicle frequently contained one or two nucleoli. Chorton deposition was evident with mean thickness of 0.7 ± 0.06 µm at the external surface of plasmic membrane surrounding the oocyte (Fig. 2c).

Type IV oocyte: predominant at 48 h of dropping having the mean size of 113.0 ± 9.94 µm \times 98.50 ± 9.3 µm. Cytoplasm contained both large and small yolk granules. Larger yolk granules were seen at the periphery while small yolk granules at central region. Germinal vesicle was evident however, due to presence of large amount of yolk granules distributed throughout the cytoplasm it was not easily visible and if it is present, located at pole next to oocyte pedicel junction. Thick chorton (1.28 ± 0.1 µm) was present around the oocyte (Fig. 2d).

Type V oocyte: Oocyte with largest germinative cell (228.10 ± 13.8 µm \times 197.2 ± 7.2 µm), rounded in shape and germinal vesicle is not visible due to the presence of big and numerous, rounded or hexagonal cytoplasmic granules. The chorton was thick (2.55 ± 0.08 µm) and fully deposited surrounding the oocyte (Fig. 2e). The oocyte V began to appear at 48 h of dropping.

3.3. Cellular profile of treated ovary

Amitraz: damaged plasmic membrane with vacuolations at the periphery of type I and II oocytes was observed (Fig. 2f, g). A large area of vacuolations occupying periphery as well as oocyte pedicel junction was present in type III oocytes (Fig. 2h). Some of the yolk granules of type IV oocyte were negative to hematoxylin and vacuolations were seen at oocyte pedicel junction (Fig. 2i). Morphological alteration i.e. wavy chorton and vacuolations around almost all yolk granules were seen in type V oocyte (Fig. 2j).

Coumaphos: in type I oocytes vacuolations were observed at the periphery (Fig. 2k) while in type II oocytes these vacuolated areas were prominent near germinal vesicles (Fig. 2l). Most of the yolk granules of

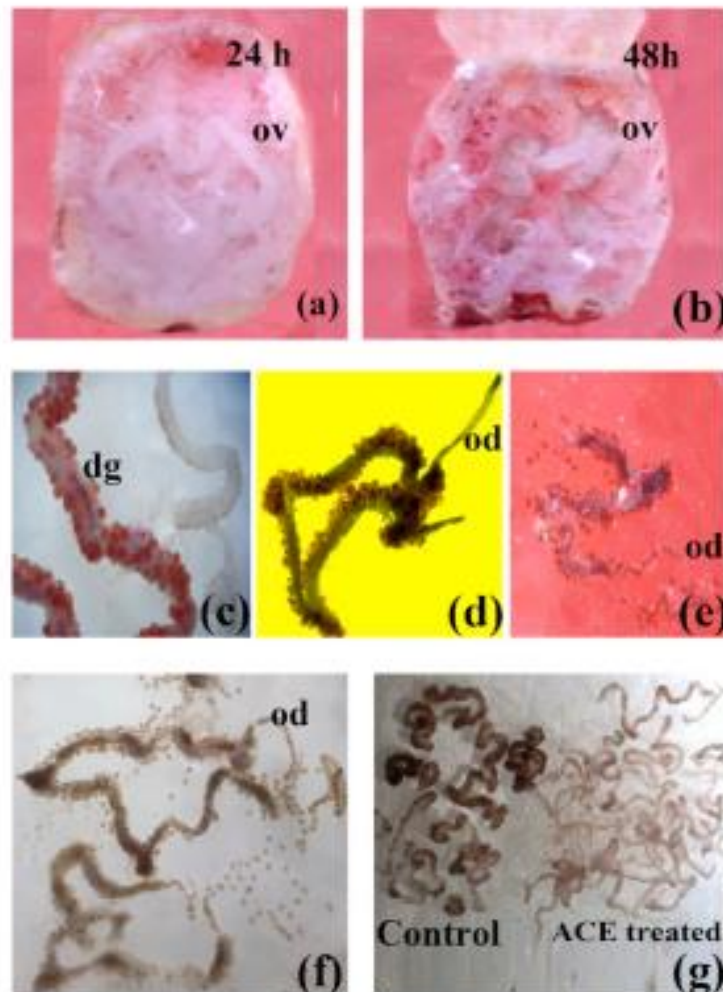


Fig. 1. Gross view of ovary of normal and treated *R. microplus* ticks. a- ovary after 24 h of dropping; b- ovary after 48 h; c- ovary showing dorsal groove; d- ovary with oviduct; e- fully packed ovary and oviduct with eggs which failed to pass out in untreated ticks at 72 h; f- fully packed ovary and oviduct with eggs that failed to pass out in omeprazole treated ticks at 72 h; g- presence of large number of immature oocytes in ACE treated ticks at 48 h in comparison to control ticks at 48 h. ov- ovary; od- oviduct; dg- dorsal groove.

type III oocytes were weakly stained with H&E and vacuolations were present around some yolk granules (Fig. 2m). A large area of vacuolations at the oocyte pedicle junction and near the germinal vesicle was a characteristic feature of type IV oocytes (Fig. 2n). The cell boundaries of type V oocytes became irregular and chorion exhibited many infoldings (Fig. 2o).

ACE: Oocyte with irregular margins and decrease in nuclear cytoplasmic ratio was noted in some primary oocytes (Fig. 2p). Vacuolations near the germinal vesicles in both type II and III oocytes and more prominently pedicle coils of type III were observed (Fig. 2q, r). Extensive vacuolations around each of yolk granule and near germinal vesicle were seen in type IV oocytes (Fig. 2s). Deformed and vacuolated oocytes were the major impact in all ACE treated tick ovary (Fig. 2t).

The comparative drug induced alteration in different stages of oocytes is presented in Table 2.

3.4. Comparative localization of proteins, lipid and polysaccharides in untreated and in treated ovaries

3.4.1. Proteins

Untreated oocytes

Type I oocytes: cytoplasm was weakly stained; germinal vesicle was negative to the test while nucleolus was strongly positive (Fig. 3a).

Type II oocytes: strongly positive fine yolk granules distributed homogeneously throughout the cytoplasm. Similar to type I oocytes, germinal vesicle was weakly positive while nucleolus was strongly

Table 1
Comparative analysis of reproduction parameters of *R. microplus* after treatment with amitraz, coumaphos and ACE.

Drug	LC50 (%)	Egg masses (mg) (Mean ± SE)	Reproductive Index (Mean ± SE)	% inhibition of oostipitation
Amitraz	0.038	32.0 ± 3.2 ^a	0.223 ± 0.03 ^a	51.7
Coumaphos	0.007	17.7 ± 1.7	0.472 ± 0.02 ^b	14.0
ACE	8.00	17.2 ± 4.0 ^a	0.04 ± 0.00 ^c	90.7
Control	-	60.5 ± 6.2	0.581 ± 0.02	-

^a significant at $p < 0.05$.

^b significant at $p < 0.01$.

^c significant at $p < 0.001$.

positive (Fig. 3b).

Type III oocytes: strongly positive coarse granulation distributed throughout the cytoplasm, germinal vesicle and cytoplasm was weakly positive while nucleolus was strongly positive (Fig. 3c).

Type IV & V oocytes: like type III, strongly positive large and small yolk granules with strongly positive chorion was visible, while germinal vesicle was moderately stained (Fig. 3d, e).

Treated oocytes

Amitraz: no alterations in protein profile in cytoplasm of type I oocytes (Fig. 3f). The yolk granules of type II and III oocytes were moderately positive in comparison to strongly positive untreated oocytes (Fig. 3g, h). Unlike in untreated ticks, in advanced developmental stages, majority yolk granules were weakly positive to the test (Fig. 3i, j), indicating loss of protein content after treatment with amitraz.

Coumaphos: no changes in type I oocytes in comparison to control was noticed (Fig. 3k). A small cytoplasmic area negative to the test was located especially around the germ vesicle and next to pedicel was observed in type II and III oocytes (Fig. 3l, m). As observed in amitraz treated ticks, loss of intense granulation in comparison to strongly

stained untreated type IV and V oocytes was observed in this group of ticks (Fig. 3n, o).

ACE: like amitraz and coumaphos treated group of ticks, cytoplasm of different developmental stages of oocytes stained weakly (Fig. 3p, q). Yolk granules of type III oocytes were weakly stained in comparison to corresponding control oocytes indicating less proteins content in vitellogenic oocytes (Fig. 3r). A large area of weakly stained yolk granules near germinal vesicle and completely negative stained area at periphery of type IV oocytes was found as observed in amitraz and coumaphos treated groups. The chorion was weakly positive compared to strongly positive in untreated group (Fig. 3s). Yolk granules and chorion were weakly positive compared to strongly positive control group (Fig. 3t).

3.4.2. Ispis

Untreated oocytes

Type I oocytes: moderately positive cytoplasm was the characteristic feature (Fig. 4a).

Type II oocytes: fine and moderately positive, homogeneously distributed granulations were detected. Germinal vesicle was strongly positive (Fig. 4b).

Type III oocytes: coarse yolk granules distributed throughout the cytoplasm were moderately positive while germinal vesicle was strongly positive (Fig. 4c).

Type IV oocytes: the cytoplasm with small and strongly positive yolk granules in the center and larger granules were located mainly in the peripheral region (Fig. 4d).

Type V oocytes: the entire cytoplasm of oocytes V stages were filled with strongly positive stained granules (Fig. 4e).

Treated oocytes

Amitraz: the cytoplasm of type I oocytes and yolk granules of type II oocytes were strongly positive in comparison to moderately positive control (Fig. 4f, g). No changes in staining pattern in type III oocytes of treated and control group of ticks were observed. Germinal vesicle was strongly positive (Fig. 4h). Most of the type IV oocytes were highly

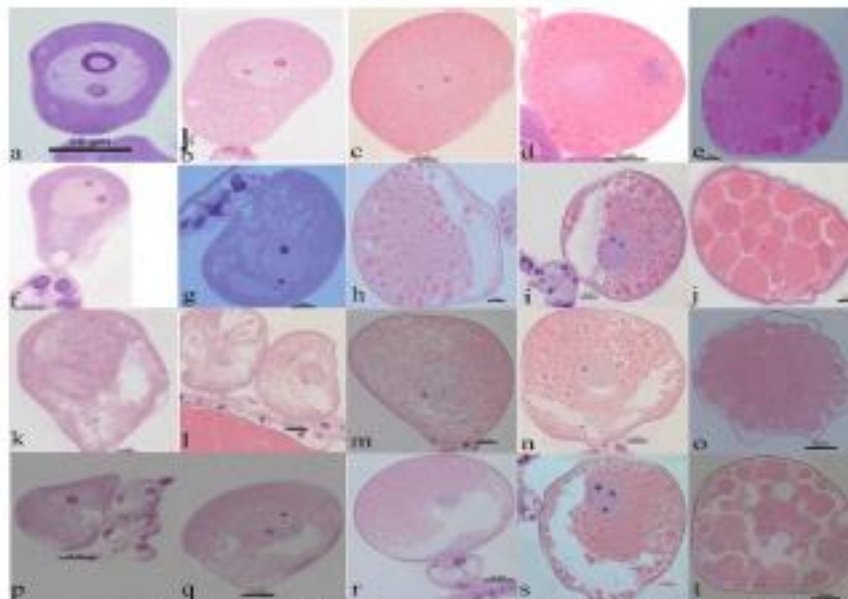


Fig. 2. Drug induced comparative cellular changes in the oocytes I–V of ticks. Figs. a–e: untreated, f–j: amitraz treated, k–o: coumaphos treated and; p–t: ACE treated *R. microplus* following H&E staining.

Table 2. Summary of cellular alterations in different stage of *R. microplus* oocyte after 48h treatment with amitraz, coumaphos and ACE in comparison to untreated oocytes.

Oocyte	Untreated	Amitraz	Coumaphos	ACE
I	Stained, round to elongated, light nucleus & cytoplasmic ratio	Damaged plasma membrane, vacuolation at oocyte periphery	Vacuolation at the periphery of oocyte	Vacuolation at periphery, oocyte pedicle junction
II	Fine granulation in cytoplasm, a central germinal vesicle with 1 or 2 nucleoli, no cytoplasmic vacuolation	Damaged plasma membrane, vacuolation at oocyte periphery	Vacuolation near germinal vesicle	Vacuolation mainly at the periphery of oocyte
III	Coarse granulation evident at certain depth in cytoplasm vacuolation	Vacuolation at oocyte periphery, oocyte pedicle junction	Vacuolation around some yolk granules	Vacuolation at periphery, oocyte pedicle junction
IV	Cytoplasm with large and small yolk granules, larger yolk granules at the periphery, small yolk granules at central region.	Vacuolation at oocyte pedicle junction	Vacuolation at the oocyte pedicle junction and near the germinal vesicle	Extensive vacuolation associated with yolk granules and near germinal vesicle
V	Large peripheral cell, large nucleus surrounded or being marginal cytoplasmic granules, complete deposition of thick chorion.	Many chorion and vacuolation around almost all yolk granules	Irregular red, chorion exhibited many foldings	Detachment with fold and bulges of chorion

deformed and were largely negative to Bakers staining consequent to the loss of granules (Fig. 4i). The type V oocytes were moderately positive with negatively stained vacuolated areas in comparison to the strongly positive untreated oocytes (Fig. 4j).

Coumaphos: moderately positive cytoplasm in type I oocyte (Fig. 4k) and fine, strongly positive, homogeneously distributed granulation was detected in type II oocyte (Fig. 4l). In both type I and II oocytes, nucleolus was strongly positive. In type III oocytes, yolk granules were weakly positive compared to moderately positive control and amitraz treated group (Fig. 4m) while in type IV oocytes peripheral granules were either weakly or moderately positive but central granules were strongly positive (Fig. 4n). The type V oocytes with weakly positive yolk granules as detected in amitraz treated group but contrast to strongly positive control group were observed (Fig. 4o).

ACE: a large strongly negative vacuolated area around germinal vesicle of type I oocyte was observed compared to moderately stained in control and coumaphos treated and strongly positive amitraz treated groups (Fig. 4p). Moderate to strongly positive granulation was found in type II oocyte. The nucleolus of type II oocyte was strongly positive as seen in the control, amitraz and coumaphos treated groups (Fig. 4q). The yolk granules of type III oocytes were moderately positive compared to strongly positive granules of control and amitraz treated groups (Fig. 4r). Most of the peripheral granules of type IV oocytes were moderately positive, while in the control group strongly positive granules were observed (Fig. 4s). The yolk granules of type V oocytes presents moderate to strongly positive granulation with large negatively stained vacuolated areas (Fig. 4t).

3.4.3. Polysaccharides

Untreated oocytes

Type I oocyte: cytoplasm was weakly positive (slight magenta in colour) for neutral polysaccharides while germinal vesicle, nucleoli and pedicel cells were alcianophilic (bluish-green), positive for acid polysaccharides (Fig. 5a).

Type II oocyte: in comparison to type I oocyte, the cytoplasmic granulation was strongly positive for neutral polysaccharide while germinal vesicle, nucleoli and pedicel cells were alcianophilic (Fig. 5b).

Type III, IV, V oocytes: strongly PAS positive granules were distributed throughout the cytoplasm and chorion was moderately alcianophilic (Fig. 5c-e).

Treated oocytes

Amitraz: The staining characters were almost similar to that of control except in areas around the vacuolation. The cytoplasm of type I oocyte was weakly positive while type II oocytes showed moderate positivity compared to strongly positive control group (Fig. 5f, g). There were large PAS negative areas around the vacuolation in type III oocytes compared to control group (Fig. 5h). The type IV and V oocytes presented similar reactions pattern as observed in the control group except few yolk granules showed negative reaction in vacuolated areas in type IV oocytes (Fig. 5i, j).

Coumaphos: The type I oocyte appeared weakly positive to PAS as seen in control and in amitraz treated group of ticks (Fig. 5k). The type II oocytes showed moderately positive with thin granulation as seen in amitraz treated group in contrast to strongly positive control group (Fig. 5l). The type IV and V oocytes exhibited vacuolated areas negative to the test near the germ vesicle and towards the oocyte pedicle junction (Fig. 5n, o). The carbohydrate deficient areas were mainly concentrated around the vacuolated areas.

ACE: the cytoplasm of type I and II oocytes were moderately positive compared to the control group. The vacuolated areas especially near the germ vesicle and pedicel were negative to the test (Fig. 5p, q). Largest cytoplasmic areas negative to the test was due to the presence of vacuoles in type III oocyte (Fig. 5r). The type IV oocytes presented yolk granules with moderate to strongly positive reaction and small vacuoles that were negative to the test in a region near the cell periphery

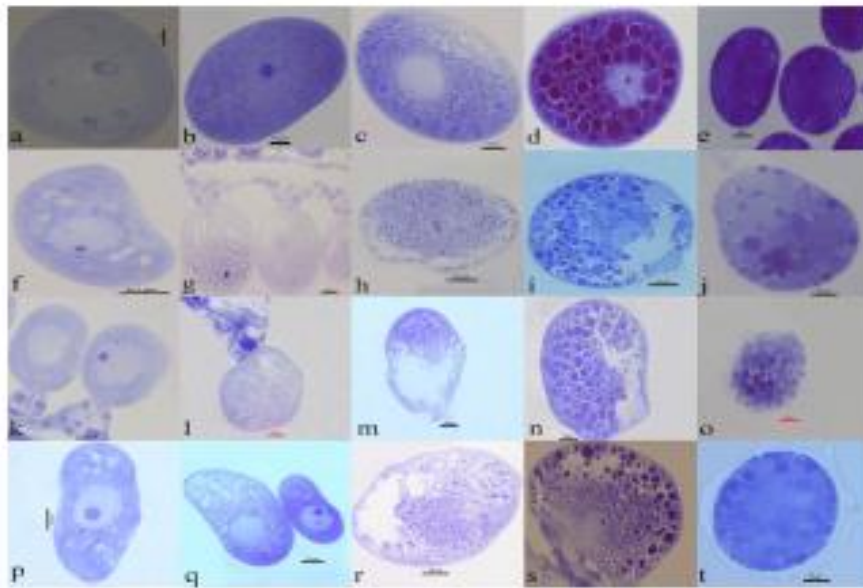


Fig. 3. Drug-induced comparative cellular changes in the oocytes I-V of ticks. Figs. a-e: untreated, f-j: amitraz treated, k-o: coumaphos treated and; p-t: ACE treated *E. microplus* following EFD staining.

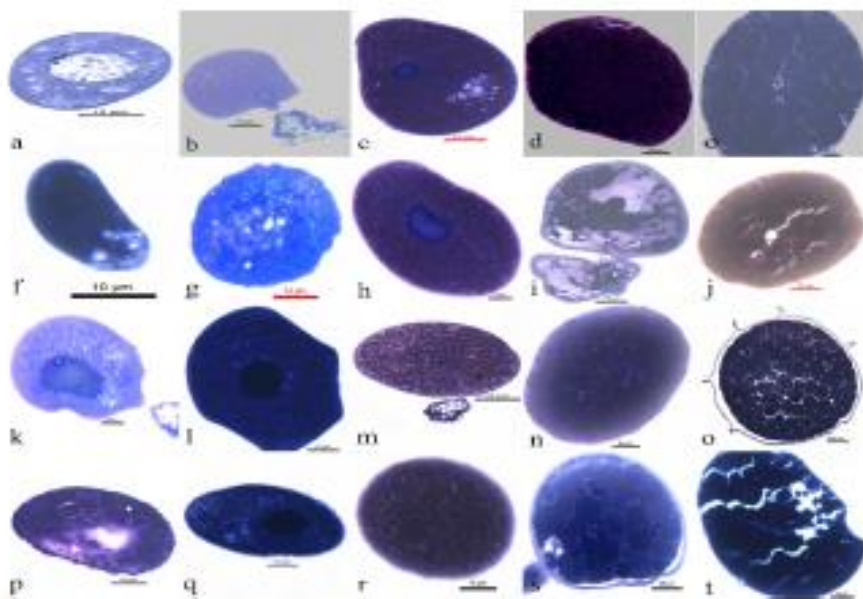


Fig. 4. Drug-induced comparative cellular changes in the oocytes I-V of ticks. Figs. a-e: untreated, f-j: amitraz treated, k-o: coumaphos treated and; p-t: ACE treated *E. microplus* following Baker staining.

(Fig. 5a) were detected. Yolk granules of type V oocytes were weakly positive and large area negative to the test was seen in more than half portion of the oocytes as seen in coumaphos treated group (Fig. 5i) indicating severe reduction in carbohydrate content in yolk granules.

The comparative profile of proteins, lipid and polysaccharides of different stages of ovary treated with amitraz, coumaphos and ACE is given in Table 3.

Table 2
Comparative histochemical characteristics of different stages of R. microplus coxites after 48 h treatment with acaricides, coumaphos and ACE in comparison to untreated coxites.

	I	II	III	IV	V
Protein					
Control	Cy: weakly positive, GV: negative, Nix: strongly positive	Yg: black strongly positive, GV: negative, Nix: strongly positive	Cy: and GV: weakly positive, Nix: strongly positive, Yg: strongly positive	Yg: Dapre & small and chitinase: strongly positive	Yg: Dapre & small and chitinase: strongly positive
Azintra	Cy: weakly positive, GV: negative, Nix: strongly positive	Yg: black moderately positive	Yg: black moderately positive	Yg: Dapre & small and chitinase: weakly positive	Yg: Dapre & small and chitinase: weakly positive
Coumaphos	Cy: weakly positive, GV: negative, Nix: strongly positive	Small cytoplasmic negative area around the GV and next to the pedicel	Small cytoplasmic negative area around the GV and next to the pedicel	Yg: Dapre & small and chitinase: weakly positive	Yg: Dapre & small and chitinase: weakly positive
ACE	Small vacuolated area negative to test	Small vacuolated area negative to test	GV: weakly positive	Weakly moderately and large vacuolated area	Weakly moderately and large vacuolated area
Lipid					
Control	Cy: moderately positive,	Yg: few, moderately positive, GV: strongly positive	Yg: coarse, moderately positive, GV: strongly positive	Yg: Dapre & small: strongly positive	Yg: Dapre & small and chitinase: strongly positive
Azintra	Cy: strongly positive	Yg: few, strongly positive	Yg: coarse, moderately positive, GV: strongly positive	Highly defined, large vacuolated area negative to test	Yg: Moderate positive, vacuolated area negative to test
Coumaphos	Cy: moderately positive	Yg: few, moderately positive, GV: strongly positive	Yg: coarse, weakly positive	Yg: weak / moderately positive at periphery, strongly positive at central	Yg: weakly positive
ACE	Cy: Negative, vacuolated area around GV	Yg: few, moderate to strongly positive	Yg: coarse, weakly positive	Yg: weak / moderately positive at periphery	Large vacuolated area negative to test
Polysaccharides					
Control	Cy: strongly positive; GV: black strongly at-limphatic	Cy: strongly positive; GV: black strongly at-limphatic	Yg: strongly PAS positive	Yg: strongly PAS positive	Yg: strongly PAS positive
Azintra	Cy: weakly positive	Yg: weakly positive	Yg: weakly positive at Coxite	Yg: negatively stained vacuolated area weakly positive	Yg: weakly positive
Coumaphos	Cy: weakly positive	Weakly positive	Weakly positive	Yg: negative to case at outer area	Large negatively stained vacuolated area
ACE	Weakly positive	Weakly positive	Weakly positive	Yg: negative to case at outer area	Large negatively stained vacuolated area

Cy = Cytoplasm, Yg = Yolk Granules, GV = Germinal Vesicle.

In arthropods, lipids, followed by proteins and polysaccharides are deposited in the oocyte in sequence in the form of yolk granules (Ramsammy, 1968). In all the treated ovaries, reduced lipid contents was seen mainly at advanced stages while in ACE treated ovaries it was more prominently in type III–V oocytes. The reduced level of carbohydrates and lipids along with other components inhibited the hatching of treated eggs. On the contrary, Sampieri et al. (2013) reported a compensatory increase in lipid content when there was a reduction in carbohydrate in ticks treated with rictolinic ester. However, in the present study, compensatory increase of lipids was observed in type I and II oocytes of ACE treated ticks only.

The major yolk protein vitellin (Vn) is processed from vitellogenin (Vg). The Vg is produced in both fat body and midgut in a number of tick species. Following synthesis, Vg is released into the haemolymph and taken up into the developing oocytes by receptor-mediated endocytosis, where Vg is further processed and stored (Smith and Kaufman, 2013). This conversion of vitellogenin into vitellin probably occurs due to enzyme action, as well as other processes that require more energy (Sampieri et al., 2013).

In the present study, cytoplasm of both control and treated type I oocytes was weakly positive for protein as opposed to Sampieri et al. (2013) who reported type I oocytes were negative to the test. However, they reported positivity in type I oocytes when ticks treated with rictolinic acid ester owing to the increased activity of these compounds to neutralize the toxic components arising from esters. In all the treatment groups, protein contents of the yolk granules in advanced stages of oocytes (type IV and V) was reduced with highest reduction was noted in amitraz treated group.

Ricardo et al. (2007) reported that the incorporation or production of carbohydrates started in type II oocytes having pedicel cells and hemolymph as exogenous sources. In the present study, processing of the type II–IV oocytes from ACE, amitraz and coumaphos treated individuals indicated that the compounds might have acted on hydrolysis of polysaccharides and subsequent delayed the synthesis and/or incorporation of carbohydrates. Similar inhibition of carbohydrate was observed in oocytes of *R. sanguineus* treated with rictolinic ester from cauter oil (Sampieri et al., 2013).

In conclusion, the presence of malformed oocytes with extensive vacuolation and reduced yolk components due to ACE, amitraz and coumaphos treatment was noticed. Thus, the present study showed that ACE can be used in suitable delivery mode for the management of multi-acaricide resistant tick population.

Conflict of interest

Authors have no conflict of interest.

Acknowledgement

The authors are grateful to Indian Council of Agricultural Research, New Delhi for funding through National Agricultural Science Fund [Grant number NASF/ABA-6015/2016-17/357 and NPHDFARA/BSA-4004/2013-14].

References

Aiswari, O.T., Patra, F.O., McCaw, L.J., East, J.N., Nakao, V., 2016. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: a review. *S. Afr. J. Bot.* 105, 178–193.

Aronson, C.E., Powner, T.E., Davis, L.E., 1988. *Veterinary Pharmacological Biology*, 4th ed. Veterinary Medicine Publishing Co., Lenexa, KS, pp. 905–906.

Arbush, B., Veen, R., Raj, M.A., Rao, K.S., Srikanta, C., Prasad, T.N.V.K.V., 2017. In vitro evaluation of acaricidal activity of novel green silver nanoparticles against deltamethrin resistance *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vel. Parasitol.* 207, 130–136.

Baker, J.R., 1946. The histochemical recognition of lipids. *Q. J. Microsc.* 87, 441–470.

Barni, S., Baroni, B.A., Black, M., Holzner, M.J., van Driem, E.M., Forzi, J., Maritz-Olivier, C., 2018. Differentially expressed genes in response to amitraz treatment suggests a proposed model of resistance to amitraz in *R. decoloratus* ticks. *Int. J.*

Parasitol. *Drug Drug Resist.* 8, 363–371.

Bhowar, S., 2003. Role of vector-borne in the care and management during harvest of milk in species Kolkata, India. *Proceedings of National Seminar on Livestock Industry in Today's Perspective* 62–64.

Booth, T.F., Soadia, D.J., Hart, R.J., 1986. The effects of procaine treatment on egg wax production in *Gem's* organ and egg viability in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): an ultrastructural study. *Exp. Appl. Acarol.* 2, 187–198.

Booth, T.F., 1980. Effects of ibuprofen and adrenergic drugs on oviposition in the cattle tick *Rhipicephalus* evidence for octopamine innervation of the oviduct. *Exp. Appl. Acarol.* 7, 259–264.

Brogio-Miranda, S.M.F., Dias, N.S., Valente, R.C.N., de Souza, L.A., Lopes, D.O.P., dos Santos, J.M., 2010. Ação do estirno e óleo de rinha no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Cassini, 1857) (Acari: Ixodidae) em lactanteiro. *Rev. Bras. Parasitol.* Vol. 16, 46–50.

Carvalho, F.H., Recco-Pereira, S.M., 2007. A Glicia. *Monografia*, São Paulo, pp. 200–210.

Chakravarty, G.M., Sharma, A.K., Kumar, S., Pinar, A., Sagar, S.V., Nagar, G., Ghoshal, D., Saravanan, B.C., Kumar, R., Ghosh, S., 2018. Role of metabolic enzymes in conferring resistance to synthetic pyrethroids, organophosphates, and phencyclamine compounds in *Rhipicephalus microplus*. *Int. J. Acarol.* 44, 35–34.

Carlo-Baydar, R., Miranda-Miranda, U., Padilla, V.N., Duenas-Valencia, F., Reynard, E., 2012. Potentiation of lymphatic/occlusory function inhibits oviposition in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Invertebr. Pathol.* 54, 628–633.

Carlo-Baydar, R., Miranda-Miranda, U., Ferralbio-Ferreira, M., Padilla, V.N., Reynard, E., 2015. Adrenergic ligands that block oviposition in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* affect ovary contraction. *Sci. Rep.* 5, 15790.

Dasari, S.K., Bectara, D.H., de Oliveira, P.R., Nogueira, E.T., Sabin, K.C., Camargo-Maitan, M.J., 2004. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vel. Parasitol.* 125, 379–385.

Dasari, S., Bectara, C.H., Oliveira, P.R., Camargo-Maitan, M.J., 2010. Anatomical and ultrastructural changes on ovary of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Exp. Parasitol.* 126, 462–470.

Demaria, J.J., 1977. Anticarcinogenic property of crude extracts from a larval wound healing nemato-Ageratum conjugatum. *J. Planta Med.* 22, 388–390.

Diwan-Pena, A., Anwar, F., 1999. Comparison of an amitraz-impregnated collar with topical administration of ivermectin for prevention of experimental and natural infections by the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 115, 1706–1803.

Evans, P.D., Cox, J.D., 1988. Action of formetanilol pyridine on octopamine receptors. *Nature* 207, 60–62.

Faria, S., Romão, R., Cruzet, A., Nolan, T., 2014. Disruption of arabinoside signaling reveals novel components with distinct inhibitory effects on oncogenic proliferation, locomotor function and survival. *Sci. Rep.* 4, 5228.

Ferreira, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Inviron. Health Perspect.* 87, 245–254.

Ghosh, S., Achaitanand, P., 2007. Laboratory rearing of *Thelazia annulosa* free *Hyalomma anisulium anisulium* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 43, 127–146.

Ghosh, S., Thwait, S.S., Srivastava, S., Sharma, A.K., Nagar, G., Kumar, S., Kumar, R., Rawat, A.K.S., 2015. In vitro acaricidal properties of *Sonchus oleraceus* fruit and *Datura innoxiosa* leaf extracts against acaricide resistance (VRV-1) and resistant (VRV-2) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 39, 60–74.

Giri, L., Laha, R.C., Mariti, J.R., Barua, A.T., Anandoti, R., Chakrabarti, P.H., Laha, A.A., Panda, J.R., Ghosh, S.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in India. *Rev. Bras. Parasitol.* Vol. 20, 150–156.

Haque, M., Jyoti, Singh N.K., Raha, S.S., 2014. Effect of various acaricides on hatchability of eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Humand Res. Int.* 1–5.

Ha, S.O., Ehn, O.J., Ben, E.K., Hipo, O.J., 2007. Haematological properties of staminal extract of *Ageratum conyzoides* (goat weed) in albino rats. *Niger. J. Physiol. Sci.* 22, 83–87.

Ha, S.O., Aqunyung, E.O., Umoh, E.J., Ben, E.K., Usif, S.O., 2009. Acetaminophen induced hepatic toxicity: protective role of *Ageratum conyzoides*. *Pakistan J. Nutr.* 8, 928–932.

Jagella, C.C., Sitawakar, A., Rao, S.K., Helliganekar, P.M., 2003. Evaluation of the molluscicidal effect of *Ageratum conyzoides* Linn. Extract in vitro exposed to different doses of gamma radiation. *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 1153–1158.

Jones, H.D., 1990. Xylono/amitraz a pharmacologic review and profile. *Vel. Parasitol.* 22, 446–448.

Jones, N.N., Mayer, D.L., Mairiaux, A.L., 1998. Production effects of cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Vel. Parasitol.* 78, 65–77.

Jones, N.N., Davis, R., Webb, M.D., 2001. An analysis of the economic effects of cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Acad. Vet. J.* 70, 828–831.

Junqueira, L.C.H., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Monografia* sobre a citologia e histologia. São Paulo, Santos.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2013. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 12th ed. Rio de Janeiro.

Kandaj, A., Saha, A.K., 2008. *Ageratum conyzoides* L.: a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Int. J. Green Pharm.* 2, 57.

Kumar, S., Pinar, A., Sharma, A.K., Kumar, R., Thwait, S.S., Chaitanet, P., Ray, D.D., Rawat, A.K.S., Ghosh, S., 2011. Deltameth resistant status in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from different agro-climatic zones of India. *Vel. Parasitol.* 181, 274–281.

Kumar, S., Sharma, A., Ray, D.D., Ghosh, S., 2014. Determination of deltamethrin dose and evaluation of amitraz resistance status in different field isolates of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in India. *Exp. Appl. Acarol.* 62, 413–422.

Ahlu Kesar, K.G., Tripathi, A.H., Kumar, R., Gupta, S., Sharma, A.K., Nagar, C., Tiwari, S.S., Kumar, R., Rawat, A.K.S., Srivastava, S., Kumar, S., Choudh, S., 2016. Characterization and efficacy of phytoextracts from *Ageratum conyzoides* for acaricidal properties against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infesting cattle and humans in India. *Trop. Dis. Trop. Med.* 7, 342–349.

Lago, T.C., Montanari, R.M., Ferracane, S.A., de Oliveira Monteiro, C.M., de Oliveira Souza, S., Souza, T., Zerbeto, V., Catson, F., de Silva Maia, R., Dawson, E., 2013. Activity of essential oil of *Lippia zizanioides* Cavazz. (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Heterologia*, *Res.* 112, 863–865.

Law-Tan, A.E., Rodriguez Valio, M., 2016. A review of reverse osmosis application for the development of vaccines against tick and tick-borne diseases. *Tick. Tick Borne Dis.* 7, 573–585.

Martin, H.L., 1972. *Oryzophiloplasma caryophagi*. The Scientific Prehistory of Crop Protection. Edward Arnold, Ontario, pp. 242–246.

Mercet, C., Lemaly, C., Zollo, P.H., Enkato, J.H., Bostelo, J.M., 1993. Arsenic plants of tropical central Africa. Part X: Chemical composition of the essential oils of *Ageratum conyzoides* Mill. and *Ageratum conyzoides* L. from Cameroon. *Flavour Fragr. J.* 8, 1–4.

Mishra, B., McLeod, A., 2003. The impact of tick and tick-borne disease on the livelihood of small ruminant and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. *Tick-borne Diseases and Poverty* (p. 124). Research Report, DFID Animal Health Programme. Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Birmingham, UK.

Nandi, A., Sagar, S.V., Chakrav, C., Prasad, A., Sharma, A.K., Nagar, C., Kumar, S., Saravanan, R.C., Choudh, S., 2018. Determination and validation of discriminating concentration of lavender against *Rhipicephalus microplus*. *Vel. Parasitol.* 230, 30–34.

Oliveira, P.F., Canargo-Machias, M.I., Bichara, C.H., 2007. Visiogénesis in the tick *Amblyomma aurarum* (Coen, 1844) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol.* 101, 134–136.

Oliveira, P.F., Bichara, C.H., Canargo-Machias, M.I., 2008. Evaluation of cytosolic effect of pyrethrin on ovules of semi-engorged *Rhipicephalus angatus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Poos. Chem. Toxicol.* 45, 2469–2482.

Palmer, E.H., Mccarthy, J.F., Ezzi, A., Harbison, J.H., 1971. A new chemical group of cattle acaricides. *Proceed. 3rd Int. Cong. Acarol. Progress.* 467–469.

Pechaino, R., Vespato, A., Izquierdo, M.D., Santos, R.C.V., Barreira, D., Vazquez, H.A., Ciruela, J.L., Isalgon, A.A., Sotillo, L.M., Da Silva, A.S., 2016. In vitro effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *J. Adv. Res.* 7, 1029–1034.

Puente, A.L.R., 1982. *Histochemistry: theoretical and applied*. Churchill Livingstone, 2nd ed. 440.

Pirak-Kovács, K., Koczogh-Ayayin, M., Hagişan, A., 2009. Acaricidal effect of *Polygonum maritimum* and *Fuzipyrac glaberrima* essential oils against adult stage of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in vitro. *Vel. Parasitol.* 162, 346–349.

Pinto-Osorio, M.C., Cárdenas-Arauz, R.A., Arango-Hoyos, V.H., Vialaquero-Sánchez, A.M., Muñoz-Cruzado, M.A., Rueda-Napante, P., Arango, E., Alca-Hortado, F., 2014. Assessment of acute oral and topical toxicity of 2-ethyl-cyanoacrylate with activity against *Rhipicephalus microplus* in rats. *Res. Vet. Sci.* 1–10.

Ramirez, P.S., 1966. Origin and distribution of glycogen during visogénesis of the nymphs of *Rhipicephalus*. *J. Insect Physiol.* 14, 1225–1230.

Ravichandran, R., Jayathirani, G., Ambikumar, K.K., Nishi, A.R., Gunasekaran, L., Latha, D.R., Arulita, A., Srinivasa, K., Saritha, N., Udayan, D., Krishna, T.P.A., Divya, T.M., Julius, S., Ajithkumar, K.C., Sreeni, N.N., Choudh, S., 2018. In vitro efficacy of essential, nonessential, and natural oils against engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* and *Hemaphysalis bispinosa* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 75, 241–253.

Ribeiro, V.L.S., dos Santos, J.C., Bastião, S.A., Agui, M.A., Harekrishna, A.T., von Pauer, C.J., Agui, M.A., 2011. Acaricidal properties of the essential oil and procaine II obtained from *Celastrus speciosus* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vel. Parasitol.* 179, 100–108.

Ribeiro, V.L.S., Oliveira, P.F., Bichara, C.H., Canargo-Machias, M.I., 2007. Ultrastructure detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma citri* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) during the visogénesis process. *Thromb. Haem.* 30, 203–215.

Rodriguez, D.S., Lobo, R.C., 2013. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation of suckling milk production on a dairy farm. *Arg. Jms. Med. Vet. Zool.* 45, 1570–1572.

Rodríguez-Vasquez, R., López-González, I., Jorgensen, R., Latorre, P., Zertea, M., Reynard, E., 2006. Uridylate construction in *Drosophila* is modulated by a neural network that is both orthopentameric and glutamatergic. *J. Cell. Physiol.* 200, 183–190.

Rosa, C.C., Fungini, K.C., Bichara, C.H., Canargo-Machias, M.I., 2013. Neurotoxic induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus angatus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. *Poos. Chem. Toxicol.* 48, 825–830.

Rosoff, S.V., 1950. Chemical composition of the leaf of *Ageratum conyzoides*. *Rev. Invest. Quim. Soc. 40*, 303–304.

Saha, K.C., Bichara, C.H., Menon, E.T., Oliveira, P.H., Desmet, S.B., Canargo-Machias, M.I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructure studies of the ovary of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Gmelin, 1807) (Acari: Ixodidae). *Vel. Parasitol.* 128, 209–211.

Sampath, R.R., Aravali, A., Fungini, K.C., Chikri, C.O., Bichara, C.H., de Carvalho, P.L., Menon, P.H., Canargo-Machias, M.I., 2013. Effect of riboflavin acid ester from cotton oil (*Gossypium hirsutum*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus angatus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vel. Parasitol.* 101, 315–322.

Satoh, A., Prives, E.J., Kaufman, W.R., 2008. Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on the oogenesis in the female tick *Amblyomma hebraeum*. *J. Insect Physiol.* 54, 1175–1180.

Sharma, A.K., Kumar, R., Kumar, S., Nagar, C., Sagar, S.S., Dhaqui, M.L., Rawat, A.K.S., Ray, D.D., Choudh, S., 2012. Determination and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India. *Vel. Parasitol.* 184, 337–345.

Shylu, N.K., Nagu, M., Jyoti, S.S., 2010. Studies on acaricidal resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* against synthetic pyrethroids by using transgenic test with a diuretic activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 120, 207–208.

Shylu, N.K., Ravi, S.S., 2014. In vitro resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to four populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Punjab districts of India. *Vel. Parasitol.* 204, 230–238.

Sinha, A.D., Kaufman, W.R., 2013. Molecular characterization of the vitellogenin receptor from the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 1123–1141.

Srinivasa, K.P., Gunasekaran, L., Jayathirani, G., Divya, H.L., Aravali, V., Ajith Kumar, K.C., Nishi, S.M., Choudh, S., 2015. Histochemistry of the ovary of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* during pre and post-engorgement period. *Sci. World J.* 1–4. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/126264>

Srivastava, R., Choudh, S., Manick, D.B., Adhikaram, P., Stegaa, P.S., Prasad, K.N., Swarna, D., 2008. Efficacy of *Arachnoides indica* against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol.* 138, 140–152.

Standa, W., 1980. The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 51, 147–152.

Srinivas, M., Verma, P.K., Babu, S., Prasad, S., Das, M.A., 2012. Quantitative analysis of total phenolic, flavonoid and tannin contents in acetone and n-hexane extracts of *Ageratum conyzoides*. *Int. J. Chem. Toxicol.* 4, 986–990.

Xuan, T.D., Steinhilber, T., Hong, N.H., Kwon, T.D., Min, C.J., 2004. Assessment of phytochemical action of *Ageratum conyzoides* L. (dairy goat wool) on weevils. *Crop Prot.* 23, 911–922.

Yu, S.J., 2008. *Insecticide resistance: The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), pp. 203–230.

CAPÍTULO 5

TESTE *IN VITRO* SOBRE O CONTROLE DE LARVAS DO CARRAPATO DO CÃO *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* SUBMETIDAS AO ESPINOSADE E INDOXACARBE

(*IN VITRO* TEST ON THE CONTROL OF *Rhipicephalus sanguineus* DOG TICK LARVAE SUBMITTED TO SPINOSAD AND INDOXACARB)

SOUZA, Francinea Alves Fonseca^{1,2}.; SILVA, Bianca Moreira¹.; WEBER, Saulo Henrique².; BECHARA, Gervásio Henrique².

1.Dexter Latina Industria e Comercio de Produtos Químicos, São José dos Pinhais-PR, Brasil.

2.Escola de Ciências da Vida, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR, Curitiba-PR, Brasil.

RESUMO

O carrapato do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, é um ectoparasita hematófago obrigatório pertencente ao filo Artropopoda, classe Aracnida, família Ixodidae e subfamília Rhipicephalinae. De distribuição cosmopolita, é a espécie de carrapato mais comumente encontrada em cães domésticos, sendo vetores de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Rickettsia rickettsii*, dentre outros biopatógenos. Atualmente, os carrapatos têm sido controlados por acaricidas químicos e, em menor escala por meio de produtos botânicos, biológicos e vacinas. Neste estudo avaliou-se de forma comparativa pelo teste do pacote de larvas (TPL), a eficácia entre quatro concentrações do ingrediente ativo (i.a.) de espinosade (20, 40, 80 e 120 µg i.a.) e indoxacarbe (70, 140, 280, 420 µg i.a.) no controle do carrapato do cão *R. sanguineus sensu lato*. A mortalidade larval induzida pelo espinosade foi significativamente maior do que a do Indoxacarbe nas concentrações a partir de 40,0 µg i.a., todavia este último necessita ser testado a fim de verificar se há eficácia acima de 90% em concentrações mais elevadas.

Palavras-chave: Pacote de larvas; controle de carrapato; acaricida químico

1 ABSTRACT

2 The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* is a mandatory hematophagous
3 ectoparasite belonging to the phylum Artropoda, class Aracnida, family
4 Ixodidae and subfamily Rhipicephalinae. Of cosmopolitan distribution, it is the
5 tick species most found in urban dogs, being vectors of *Babesia canis*, *Ehrlichia*
6 *canis*, *Hepatozoon canis* and *Rickettsia rickettsii*, among other biopathogens.
7 Currently, ticks have been controlled by chemical mites and, to a lesser extent,
8 by botanical, biological and vaccine products. Recently, we compared the larval
9 pack test (LPT) comparatively, the effectiveness between four concentrations of
10 the active ingredient (a.i.) of spinosad (20, 40, 80 and 120 µg a.i.) and
11 indoxacarb (70, 140, 280, 420 µg a.i.) in the control of the tick of the dog *R.*
12 *sanguineus*. Larval mortality induced by spinosad was significantly higher than
13 that of Indoxacarb at concentrations above 40.0 µg a.i., however the latter
14 needs to be tested at higher concentrations to achieve efficacy above 90%.
15 Key words: Larval packet test, tick control, chemical acaricide

16

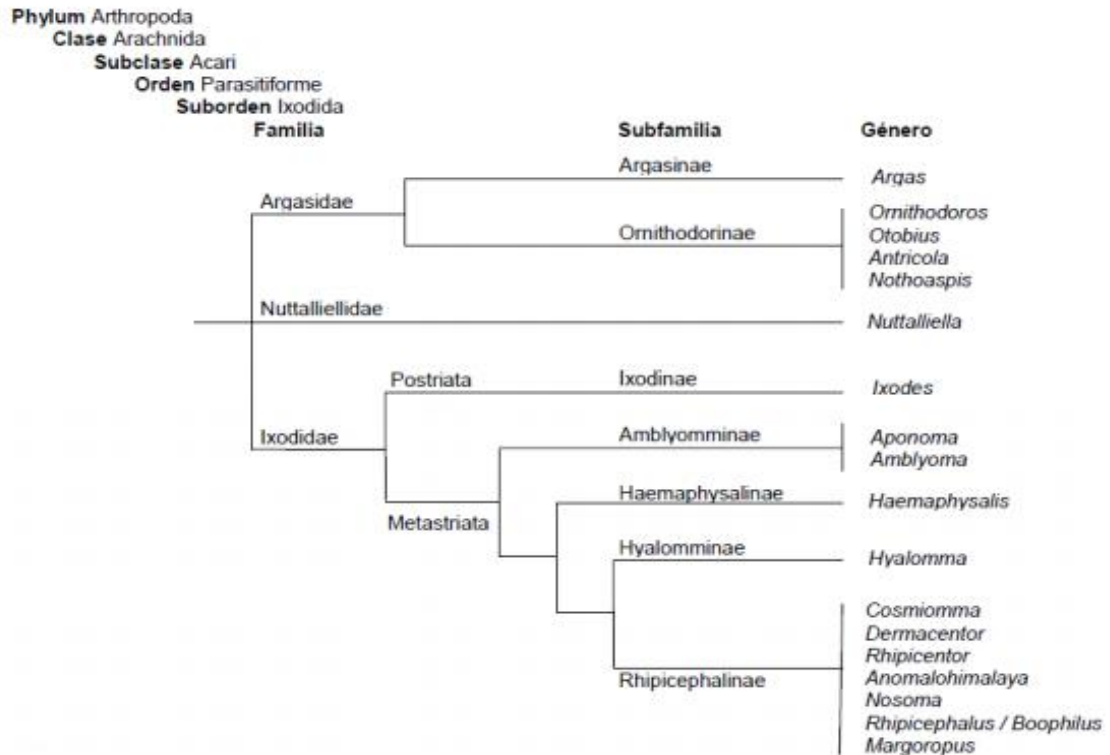
17 1. INTRODUÇÃO

18

19 Atualmente existem mais de 900 espécies de carrapatos
20 descritas. Taxonomicamente, os carrapatos pertencem ao Filo Artrópoda,
21 classe Aracnida, subclasse Acarina, ordem Parasitiforme e subordem Ixodida,
22 que está dividida em três famílias: Argasidae (carrapatos de carapaça mole)
23 com 177 espécies distribuídas nas subfamílias Argasinae e Ornithodorinae,
24 Ixodidae (carrapatos de carapaça dura) com 692 espécies, e por último a
25 família Nuttalliellidae, representada somente por uma espécie e sem interesse
26 sanitário (Figura 1). Os carrapatos representam o segundo grupo mais
27 importante de vetores de patógenos dentro do filo Artrópoda, ficando atrás
28 somente dos mosquitos (família Culicidae) na transmissão de doenças ao
29 homem e outros animais. Carrapatos são parasitas obrigatórios e tem o sangue
30 de vertebrados como sua única fonte de alimento. Exceto pelo carrapato
31 marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*), estes ectoparasitas infestam uma
32 grande variedade de hospedeiros, logo, além do *R. sanguineus*, uma grande
33 variedade de espécies de carrapatos podem infestar os cães, como por

1 exemplo os pertencentes aos gêneros *Dermacentor* sp e *Ixodes* sp. De
 2 importância zoonótica considerável, os carrapatos são vetores de diversas
 3 doenças infecciosas, como a febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*), doença de
 4 Lyme (*Borrelia burgdorferi*), erliquiose canina (*Ehrlichia canis*), anaplasmoze
 5 canina (*Anaplasma platys*), babesiose (*Babesia canis*), hemoplasmoze canina
 6 (*Mycoplasma haemocanis*) e hepatozoonose (*Hepatozoon canis*).

7
 8



9 Morfologicamente, machos e fêmeas de *R. sanguineus* medem de
 10 3 a 5 mm em jejum e apresentam o idiossoma marrom escuro e escudo sem
 11 ornamentação, em ambos os sexos os espinhos das coxas são similares,
 12 exceto o da coxa IV do macho que é maior; a base dorsal do idiossoma é
 13 hexagonal e tanto os palpos como o hipostômio são curtos, e apresentam
 14 dentição 3/3. *Rhipicephalus microplus* é um carrapato monoxeno e tem os
 15 bovinos como principal hospedeiro, pode parasitar outros animais compartilhem
 16 o ambiente como equinos e ovinos (Garcia et al., 2019). Ainda com relação aos
 17 bovinos, os animais de raças taurinas (*Bos taurus*) e seus cruzamentos são os
 18 mais afetados por essa espécie de carrapato (Veríssimo et al., 1997).

19

1



2 Figura 2. Grau de infestação de *R. sanguineus* em pavilhão auricular de cão
3 (Szabo e Bechara, 1991 - UNESP Jaboticabal)

4

5 Em áreas rurais, diferentes espécies do gênero *Amblyomma*
6 infestam cães que têm acesso a áreas de matas e florestas. Na região
7 Sudeste, as espécies de *Amblyomma* mais frequentemente encontradas em
8 cães são *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. cajennense*⁶. Na região Sul destacam-se
9 as espécies *A. tigrinum* e *A. aureolatum*, embora pelo menos outras quatro
10 espécies de *Amblyomma* já tenham sido relatadas em cães (Freire, 1972). Na
11 região Norte, a espécie *A. oblongoguttatum* foi relatada como a de maior
12 ocorrência, seguida por *A. ovale* e *A. cajennense*.

13 Dentro do gênero *Rhipicephalus*, a espécie *Rhipicephalus*
14 *sanguineus*, conhecida como carrapato marrom ou vermelho (Figura 4), é a
15 mais comumente encontrada em cães domésticos. A fêmea pode ovipor de
16 1500 a 4000 ovos (Figura 3) e é o principal responsável pela transmissão da
17 bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina e de
18 protozoários do gênero *Babesia*, agentes etiológicos da babesiose canina. Em
19 humanos, o parasitismo por *R. sanguineus* foi descrito pela primeira vez no
20 Brasil por Dantas-Torres et al. (2006), relatando que apenas carrapatos
21 machos adultos parasitavam o homem. Apesar do parasitismo por *R.*
22 *sanguineus* ser encontrado em cães em todo o Brasil, este tipo de achado
23 afirma o comportamento alimentar plurivalente e a possibilidade de parasitismo
24 humano por esta espécie de carrapato neste país.

1

2



3 Figura 3. Oviposição de *Rhipicephalus sanguineus*. a: Fêmeas ovipondo em
4 condições de laboratório (temperatura 26 ° C, umidade relativa, 80%). b:
5 Detalhe da imagem anterior, mostrando os ovos recém-postos. Dantas-Torres,
6 2010.

7

8



9

10 Figura 4. Estágios imaturos e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*. A: larva
11 (meio de Hoyer; bar = 400 µm). B: ninfa (meio de Hoyer; bar = 0,5 mm). C:
12 fêmea (bar = 1 mm). D: macho (bar = 1 mm). Dantas-Torres, 2010.

13

14

15

16

Além do impacto causado nos cães pela babesiose e erliquiose, as infecções zoonóticas como doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), a anaplasmoose granulocítica (HGA) (*Anaplasma phagocytophilum*), transmitida

1 por *Ixodes* spp., febre maculosa brasileira (*Rickettsia rickettsii*), transmitida por
2 parasitos no gênero *Amblyomma*, devem ser monitoradas, mapeadas e
3 controladas por meios profiláticos, curativos e pelo manejo integrado,
4 quebrando-se o ciclo parasito-hospedeiro.

5

6 **1.1 ERLIQUIOSE**

7

8 Erliquiose canina é uma doença causada por infecção de células
9 mononucleares e foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em Belo
10 Horizonte - MG. O agente etiológico da doença é a riquetsia (*Ehrlichia spp*), um
11 parasita intracelular obrigatório de células hematopoiéticas maduras ou
12 imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, transmitido por
13 carrapatos. *Ehrlichia equi*, *E. risticii*, *E. platys* *E. ewingii*, *E. minasensis* *E. canis*
14 são as espécies que naturalmente infectam cães, sendo *E. canis* o agente
15 causador do quadro clínico mais severo. A infecção é do tipo transtendial
16 devido a característica trióxena dos carrapatos que pode ocorrer em todos os
17 estágios evolutivos, seja ele uma larva, ninfa ou adulto. Entretanto, não ocorre
18 transmissão transovariana, embora já tenha sido encontrado *E. canis* em
19 ovários de *R. sanguineus*. A doença apresenta três fases: aguda, subclínica e
20 crônica. A fase aguda se inicia de uma a três semanas após a infecção e
21 perdura por duas a quatro semanas. Na fase aguda as riquetsias se replicam
22 nos leucócitos e são disseminadas pelo fluxo sanguíneo acometendo baço,
23 fígado e linfonodos, com os sinais clínicos de febre anorexia, depressão,
24 linfadenopatia e trombocitopenia. Nesta fase os exames bioquímicos
25 demonstram hiperbilirrubinemia, principalmente por betaglobulinemia, aumento
26 das enzimas alaninaminotransferase, fosfatase alcalina e das bilirrubinas,
27 decorrentes do comprometimento hepático. A fase subclínica ocorre de seis a
28 nove semanas e, cães imunocompetentes podem eliminar os parasitas pelo
29 sistema imune, outros cães no entanto, podem permanecer com a doença por
30 anos, parecendo saudáveis devido aos sinais mais brandos da doença e assim
31 evoluindo para a fase crônica com maior suscetibilidade às infecções
32 secundárias. Essa fase assume as características de uma doença auto imune,
33 sendo como principal característica a instalação de hipoplasia de medula

1 óssea, resultando em anemia aplásica, uma doença severa e que se não
2 tratada pode levar o animal a morte.

3

4 **1.2 BABESIOSE**

5

6 A Babesiose é uma doença parasitária provocada pelo
7 desenvolvimento de hematozoários do gênero *Babesia*, destacando-se a
8 *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*, que são as duas espécies infectantes em
9 cães envolvidas em casos diagnosticados no Brasil. Assim como na erliquiose,
10 a transmissão ocorre durante a fixação e alimentação de carrapatos Ixodídeos
11 do gênero *Rhipicephalus* quando o sangue contendo esporozoítos é inoculado
12 nos cães domésticos e, em decorrência da reprodução dos protozoários no
13 interior das hemácias ocorre a ruptura destas células. O rompimento das
14 hemácias parasitadas causa anemia pela perda de hemoglobina levando ao
15 quadro de hemoglobinúria e bilirrubinemia. A fração indireta da bilirrubina, em
16 grande quantidade gera uma hepatoesplenomegalia pela sobrecarga do fígado,
17 causando icterícia, congestão hepática e esplênica. Clinicamente são
18 observados quadros agudos com anorexia, apatia, diarreia, pneumonia, febre,
19 hemoglobinúria, anemia branda a grave e icterícia, sendo que esta última nem
20 sempre está presente, com curso de 3 a 10 dias. A evolução da doença pode
21 causar a morte ou a lenta recuperação, que pode levar mais de um mês. Em
22 alguns casos, pode haver o aparecimento de sintomas neurológicos, com
23 extrema apatia ou agressividade, paralisia, desequilíbrio e ataxia. Em casos de
24 infecções concomitantes de *B. canis* e *E. canis*, o cão demonstra severa
25 anemia normocítica normocrômica, decorrentes da destruição de eritrócitos
26 maduros e pelo impedimento da eritropoiese, desenvolvendo quadro grave com
27 óbitos, sobretudo em cães mais jovens.

28

29 **1.3 CONTROLE DE CARRAPATOS**

30

31 Os carrapatos podem permanecer em jejum vários meses,
32 apresentam condições de sobrevivência em todas as estações do ano, podem
33 entrar em diapausa em climas mais extremos e, em períodos de escassez de

1 alimento, podem permanecer em jejum por vários meses e há inimigos naturais
2 porém não são em quantidade suficiente para um adequado controle
3 populacional natural, fazendo com que seu controle natural seja difícil; estes
4 fatores favorecem a infestação e justificam o controle por intervenção humana.
5 Feromônios, iscas atrativas, vacinas, controle biológico feito por fungos
6 entomopatogenicos e compostos botânicos entre outros, vem sendo testados,
7 mas o controle de carrapatos em cães é basicamente químico, pelo uso de
8 fármacos sintéticos (ecto e endectoparasiticidas) originários de diferentes
9 grupos químicos e basicamente possuem ação intoxicante sobre os carrapatos.
10 Podem ser empregados isoladamente ou em associações de moléculas do
11 mesmo grupo químico ou de grupos químicos diferentes. A associação entre
12 moléculas permite potencializar, estender o tempo de ação ou causar
13 sinergismo para prover um controle mais duradouro e efetivo dos parasitos,
14 levando em consideração a toxicidade dos fármacos para os animais,
15 diferentes formas de absorção (tópica ou sistêmica) e mecanismos de ação
16 sobre os carrapatos. Não obstante sua eficácia, ação residual e facilidade de
17 aplicação, fármacos sintéticos podem apresentar efeitos colaterais como
18 comprometimentos hepáticos, dermatológicos e até nervosos decorrentes de
19 intoxicações, entre outros. Além disso, o uso excessivo ou prolongado de
20 certos fármacos pode levar a tolerância e a resistência cruzada ou adquirida.

21 A eficácia do controle químico de carrapatos engloba uma série
22 de ações que vão além da aplicação do ectoparasiticida. Logo que se evidencia
23 a presença dos parasitos no ambiente ou no animal deve-se iniciar uma série
24 de atividades para contenção dos carrapatos tanto no ambiente quanto nos
25 animais. Estas medidas devem ser expressas na forma de protocolo pelo
26 médico veterinário e ter rápida e real adesão pelo proprietário ao protocolo de
27 tratamento recomendado, inclusive protocolos de monitoramento, tratamentos
28 preventivos e profiláticos. Neste capítulo serão levados em consideração as
29 moléculas em uso e não serão abordados compostos como organoclorados,
30 carbamatos e fosforados devido a supressão de seu uso.

31 Um efetivo controle químico deve levar em consideração a via de
32 administração, dosagem e farmacocinética do fármaco além de grau de
33 infestação, condições fisiológicas e mórbidas dos animais, raça, idade, peso,

1 pelagem, entre outros. Quanto à forma farmacêutica, os fármacos podem ser
2 disponibilizados como shampoo, loções, cremes, talcos, comprimidos, soluções
3 de aplicação cutânea direta, injeções, coleiras, sprays, entre outros.

4 A seguir são descritos os principais acaricidas sintéticos em uso
5 no controle de ácaros na agropecuária nacional.

6 7 **1.3.1 Amitraz**

8 Composto utilizado desde o final dos anos 60, tem ação
9 octopaminérgica que é semelhante à ação adrenérgica em mamíferos ao
10 causar estimulação de monoamina oxidase e da proteína G pela ligação aos
11 receptores de octopamina, induzindo a síntese de cAMP e cGMP com
12 alteração da fisiologia intracelular.

13 14 **1.3.2 Piretróides e permetrinas**

15 Compostos sintéticos obtidos a partir de piretrinas, são
16 amplamente utilizados em várias formulações e em combinações com outras
17 substâncias por possuírem efeito "*Knockdown*" promovendo queda rápida dos
18 parasitas que passam por estados de hiper excitação inicial, desorientação e
19 repelência, que pode ser seguida por morte. Todavia, caso a dosagem não seja
20 suficiente os estágios de paralisia e repelência cessam e a reinfestação é
21 iminente. Permetrinas tem ação de contato e ingestão, ou seja, podem ser
22 aplicadas diretamente sobre os insetos ou podem ser ingeridas quando se
23 alimentam do sangue do hospedeiro. Por ação lipofílica são distribuídas ao
24 longo do sistema nervoso do inseto causando alterações na voltagem dos
25 canais de sódio e potássio e desarranjo iônico levando as alterações nervosas
26 que podem ser de inquietação, hiper excitação e parada respiratória com
27 consequente morte.

28 29 **1.3.3 Neonicotinóides ou cloronicotinil guanidinas**

30 Representados por imidacloprido, nitenpirao e dinotefurano, agem
31 como agonistas de substâncias nicotínicas pós-sinápticas receptores de
32 acetilcolina, principalmente em neurônios motores, induzindo despolarização
33 da membrana nervosa, causando espasmos e paralisia dos insetos. Esta ação

1 receptora específica em insetos explica sua segurança para mamíferos.
2 Possuem efeito residual de cerca de um mês e menor espectro de ação que
3 podem ser ampliados pela associação a moxidectina, ivermectina, permetrina e
4 piriproxifeno.

5 **1.3.4 Fenilpirazóis (fipronil e piriprol)**

6 Moléculas lipofílicas e fotoestáveis introduzidas e amplamente
7 utilizadas na medicina veterinária a partir da década de 1990 na forma de um
8 spray de álcool para uso em cães e gatos, agem pela ligação aos receptores
9 GABA e glutamato, inibindo a abertura dos canais de íons cloro, com
10 consequente hiperatividade neuronal. GABA e glutamato são
11 neurotransmissores que exercem um efeito inibitório sobre a atividade
12 muscular em insetos e ácaros. Assim como os neonicotenoídeos possuem
13 especificidade para artrópodes resultando em uma boa margem de segurança
14 para os animais tratados, cuidadores e aplicadores.

15

16 **1.3.5 Semicarbazona (metaflumizona)**

17 Age por contato, possivelmente através de reações de redox, seja
18 através de interações com o ADN e da inibição da síntese do ADN, atuando
19 como antagonista dos canais de Na⁺, bloqueando a entrada deste íon e
20 resultando em inibição da atividade nervosa com paralisia e morte dos insetos,
21 similarmente aos piretroides. Em formulações para cães é associado ao
22 amitraz para aumentar o espectro de ação em pulgas e carrapatos.

23

24 **1.3.6 Lactonas macrocíclicas (avermectinas, milbemicinas)**

25 Inicialmente utilizadas como ectoparasiticidas em gado em
26 meados de 1980, são drogas antiparasitárias endectocidas com ação sobre
27 nematoides internos, artrópodes e ácaros. São obtidas pela fermentação da
28 bactéria *Streptomyces actinomycete* e possuem ação mimetizadora do GABA
29 para ligação nos canais de cloro dependentes de glutamato, afetando
30 principalmente os gânglios nervosos faríngicos nos nematoides, levando à
31 interrupção da alimentação e morte dos insetos por inanição. Possuem ainda
32 ação subletal em fêmeas por interrupção da oviposição.

33

1 **1.3.7 Lactonas macrocíclicas do grupo espinosina**
2 **(espinosade e espinetoram)**

3 Compostos obtidos pela fermentação aeróbica do actinomiceto
4 *Saccharopolyspora spinosa* e pela extração extracelular das espinosinas A e D
5 principalmente, embora muitos outros compostos são derivados dessa
6 fermentação. Agem pela ligação e estimulação dos receptores nicotínicos de
7 acetilcolina levando ao estímulo neuronal pós-sináptico. A apresentação
8 farmacológica comercialmente disponível para espinosade é na forma de
9 comprimidos palatáveis em cães com ação pulicida iniciada cerca de 30
10 minutos após a ingestão e com atividade máxima dentro de 4 horas.

11
12 **1.3.8 Oxadiazinas (Indoxacarbe)**

13 Considerados como inseticidas de 5ª geração, atuam
14 principalmente através da ingestão pelos insetos, com ação no seu trato
15 gastrointestinal onde necessita ser bioativado para causar bloqueio nos canais
16 de Na⁺ com inibição da atividade nervosa, paralisia e morte dos insetos.
17 Comercialmente, estão disponíveis formulações para controle de pulgas em
18 cães e gatos na forma de spot-ons, e a associação do indoxacarbe a
19 permetrina foi feita no intuito de eliminar carrapatos.

20
21 **1.3.9 Closantel e nitroxinil**

22 Compostos que não possuem ação no sistema nervoso, agem por
23 inibição da fosforilação oxidativa. Utilizados como anti-helmínticos,
24 especialmente nematódeos gastrointestinais e podem ser eficazes contra
25 artrópodes hematófagos. O butóxido de piperonil, um inibidor da oxidase,
26 utilizado como sinergista para piretróides encontrados em algumas formulações
27 inseticidas / acaricidas, é pouco empregado em fármacos de uso veterinário.

28
29 **1.3.10 Isoxazolinias**

30 Classe mais recente de medicamentos, oferece efeito sistêmico e
31 prolongado, promovendo espectro amplo de eficácia para diversos gêneros e
32 espécies de artrópodes. Atualmente, existem três fármacos com aprovação
33 para uso em cães: fluralaner, afoxolaner e sarolaner.

1

2 **2. RELATO DE EXPERIÊNCIA**

3 Recentemente, avaliamos de forma comparativa pelo teste do
4 pacote de larvas (TPL), a eficácia entre quatro concentrações do ingrediente
5 ativo (i.a.) de espinosade (20, 40, 80 e 120 µg i.a.) e indoxacarbe (70, 140, 280,
6 420 µg i.a.) no controle do carrapato do cão *R. sanguineus*. Larvas
7 provenientes da colônia de carrapatos mantidas na Universidade Federal de
8 Uberlândia-MG foram utilizadas duas semanas após sua eclosão de massas de
9 ovos. A mortalidade média foi comparada pelo teste de Tukey e os resultados
10 expressos na média percentual de mortalidade larval foram os seguintes:
11 espinosade 20,0 µg i.a. (86%), 40,0 µg i.a. (96%), 80,0 µg i.a. (99%) e 120,0 µg
12 i.a. (100%); Indoxacarbe 70,0 µg i.a. (61%), 140,0 µg i.a. (68%), 280,0 µg i.a.
13 (67%) e 420,0 µg i.a. (87%). A mortalidade larval induzida pelo espinosade foi
14 significativamente maior ($p < 0,05$) do que a do Indoxacarbe. Pode-se concluir
15 que o espinosade apresentou eficácia nas concentrações a partir de 40,0 µg
16 i.a., no entanto, o Indoxacarbe deve ser testado em concentrações mais altas
17 para alcançar eficácia acima de 90%.

18

19 **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

20

21 O médico veterinário tem disponível uma série de moléculas com
22 ação sobre os carrapatos, permitindo eleger fármacos com diferentes modos
23 de ação, formas farmacêuticas, vias de administração e biodisponibilidades.
24 Além disso, os compostos carrapaticidas sintéticos têm efeito inicial rápido e, a
25 associação entre moléculas, tempo de uso, vazão sanitário e tratamento no
26 ambiente, permitem estender o prazo de inocuidade carrapaticida nos cães por
27 meses e em casos urbanos até o controle permanente da infestação.
28 Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas podem ainda incorporar vacinas,
29 medicamentos, promotores de crescimento e suplementos alimentares para
30 mitigar danos causados por doenças transmitidas por carrapatos (DTCs) em
31 animais e humanos, que associados as novas tecnologias disponíveis em
32 controle e diagnósticos garantem a assertividade do tratamento.

33

1 **4. REFERENCIAS**

2

3 ARAGÃO H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do**
4 **Instituto Oswaldo Cruz** 31:759-843, 1936.

5

6 BERALDO H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O Amplo Perfil
7 Farmacológico e Usos Clínicos. **Química Nova**, Vol. 27, No. 3, 461-471, 2004.

8

9 BEUGNET F.; FRANC M. Insecticide and acaricide molecules and/or
10 combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. **Trends in**
11 **Parasitology**, July 2012, Vol. 28, No. 7.
12 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.04.004>

13

14 CHANDRA S.; Gemma C.; Ma BURLEIGH A.; BROWN G.; NORRIS J. M.;
15 WARD M. P.; EMERY D.; ŠLAPETA J; The brown dog tick *Rhipicephalus*
16 *sanguineus sensu* Roberts, 1965 across Australia: Morphological and molecular
17 identification of *R. sanguineus* .l. tropical lineage. **Ticks and Tick-borne**
18 **Diseases**. Volume 11, Issue 1, January 2020, 101305.
19 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101305>

20

21 COLES T. B.; DRYDEN M.W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks
22 infesting dogs and cats. **Parasites & Vectors** 2014, 7:8.
23 <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/8>

24

25 DANTAS-TORRESF.; FIGUEREDO L.A. e BRANDÃO-FILHO S. P. **Revista da**
26 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(1):64-67, jan-fev, 2006.
27 *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing
28 humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*
29 39(1):64-67, jan-fev, 2006

30

31 DANTAS-TORRES, F., LATROFA, M.S., ANNOSCIA, G., GIANNELLI, A.,
32 PARISI, A.; OTRANTO, D. 2013. Morphological and genetic diversity of

1 *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds.
2 **Parasitology Vectors** 6, 213. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6213>.
3
4 DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M.S.; RAMOS, R.A.N.; LIA, R.P.; CAPELLI,
5 G.; PARISI, A.; PORRETTA, D., URBANELLI, S., OTRANTO, D., 2018.
6 Biological compatibility between two temperate lineages of brown dog ticks,
7 *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasitology Vectors**
8 [11https://doi.org/10.1186/s13071-018-2941-2](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2941-2). 398-310.
9
10 GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. da S.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R.
11 Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.
12 ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). Carrapatos na cadeia
13 produtiva de bovinos. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p. il. color.
14
15 JONES, E.O.; GRUNTMEIR, J.M.; HAMER, S.A.; LITTLE, S.E. 2017.
16 Temperate and tropical lineages of brown dog ticks in North America.
17 **Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports** 7, 58-61.
18 <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.01.002>.
19
20 LABRUNA, M.B.; FUGISAKI, E.Y.M PINTER, A.; DUARTE, J.M.B.; SZABÓ,
21 M.J.P. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae)
22 under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, n. 3,
23 p. 305-316, 2003.
24
25 LOW, V.L.; PRAKASH, B.K. 2018. First genetic characterization of the brown
26 dog tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* in Peninsular Malaysia.
27 **Experimental and Applied Acarology**. 75, 299-307.
28 <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0279-2>.
29
30 MENDONÇA, C.C.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T. V. Erliquiose
31 canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados.
32 **Bioscience Journal**. v.21, n.1, p.167-174, 2005.
33

1 MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F.A.; RICHTZENHAIN, L.J.;
2 LABRUNA, M.B. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus*
3 *sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropical.** 117, 51 -55.
4 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>.
5
6 NAVA, S.; BEATI, L.; VENZAL, J.M.; LABRUNA, M.B., SZABO, M.P.J.;
7 PETNEY, T.; SARACHO BOTTERO, M.N.; TARRAGONA, E.L.; DANTAS-
8 TORRES, F.; SILVA, M.M.S., MANGOLD, A.J., GUGLIELMONE, A.A.;
9 ESTRADA-PENA, A. 2018. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806):
10 Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and
11 molecular characterization. **Ticks and Tick Borne Diseases.** 9, 1573—1585.
12 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001>.
13
14 OLIVEIRA P.R.; CALLIGARIS I.B.; Cristina ROMA G.C.; BECHARA G.H.;
15 PIZANO M.A.; MATHIAS M.I.C. Potential of the insect growth regulator,
16 fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806)
17 (Acari: Ixodidae): Determination of the LD95 and LD50. **Experimental**
18 **Parasitology** 131 (2012) 35–39.
19 <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.023>
20
21 OTRANTO D; DANTAS-TORRES F. Canine and feline vector-borne diseases in
22 Italy: current situation and perspectives. **Parasitology Vectors.** 2010; 3:2.
23
24 PAROLA P. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe.
25 **Comparative Immunology, Microbiology, and Infectious Diseases** 27:297-
26 304, 2004.
27
28 RAOULT D.; ROUX V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging
29 infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews** 10:649-719, 1997.
30
31 SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE, A. S., 1973. Transmission of
32 *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in**
33 **Veterinary Science.** 14, 112—114.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

SILVA M.C.L., SOBRINHO R.N., LINHARES G.F.C. Avaliação in vitro da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus*, colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia, Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, 1:143-148, 2000. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0278-3>
Disponível em:< <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/244/216>

SRIVASTAVA S.C.; VARMA M.G.R. The culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology** 1964, 1:154-157.

WALKER, A.R., BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J.L., ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK I.; Latif; A.A., PEGRAM, R.G., PRESTON, P.M., 2003. Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species. 1st ed. **Bioscience Reports**, Edinburgh, Scotland.

WALKER, J.B.; HORAK, I.; KEIRANS, J.E., 2005. The Genus *Rhipicephalus* (Acardi, Ixodidae): a Guide to the Brown Ticks of the World, 2nd ed. **Cambridge University Press**, New York, USA.

ZEMTSOVA, G.E., APANASKEVICH, D.A., REEVES, W.K., Hahn, M., SNELGROVE, A., LEVIN, M.L, 2016. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. **Experimental Applied Acarology** 69, 191—203. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0035-4>.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso dos carrapaticidas sintéticos à campo são amplamente utilizados e seus efeitos adversos conhecidos por induzir à resistência aos ácaros, presença de resíduos em carne e leite, ação tóxica aos animais e aplicadores, danos ambientais por contaminação em solo e cursos d'água, bem como ação em organismos não-alvo. Os extratos de plantas ou fitoquímicos são uma alternativa ao uso dos acaricidas sintéticos, sendo uma alternativa plausível devido sua constituição com presença de moléculas bioativas potencialmente tóxicas para os carrapatos além de serem mais rapidamente biodegradados e em metabólitos não tóxicos e apresentarem baixa toxicidade a mamíferos.

Os extratos obtidos a partir de sementes de neem em diferentes solventes apresentaram eficácia e se mostraram promissores para o controle *R. microplus*, inclusive com formulações comerciais já disponíveis em países como a Índia. Em contrapartida, extratos obtidos a partir de cascas de laranja (*Citrus sinensis*) ainda não são numerosos, bem estabelecidos e específicos para controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, como os ensaios feitos com neem. Os extratos relatados na grande maioria dos testes disponíveis são obtidos em pequenas quantidades e através de diferentes técnicas de extração, diluição e solvência, o que dificulta a linearidade comparativa e repetibilidade efetiva dos resultados *in vitro*.

A presente tese mostra resultados da ação dos produtos botânicos adquiridos comercialmente e formulados a partir de óleos de neem e laranja em concentrações comercialmente viáveis e passíveis de diluição em água em dosagens que atingiram as concentrações letais de 95% de mortalidade de larvas em laboratório e queda de 95% em 29 e 31 horas para óleos de neem e laranja, respectivamente quando pulverizados à campo em gado da raça Red Angus naturalmente infestado com carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Além disso, observou-se que não houve reinfestação do gado pelo período de 7 dias após a aplicação.

1 O controle de carrapatos à campo é um desafio aos médicos veterinários,
2 técnicos, produtores e demais agentes envolvidos no manejo. O tratamento é
3 na maioria das vezes curativo devido a dificuldade na imunização do rebanho e
4 o problema sanitário iminente a infestação, por isso o uso racional, estratégico
5 e eficaz de acaricidas em práticas de manejo são fundamentais e deve-se levar
6 em conta os possíveis danos destas praticas aos aplicadores, meio ambiente e
7 desenvolvimento de resistencia, neste cenário os óleos de neem e laranja
8 apresentam-se como ferramentas promissoras no uso, rotatividade, associação
9 ou substituição de moléculas sintéticas. Extrapolações e estudos em outras
10 raças, regiões e épocas do ano são essenciais para traçar o perfil de eficácia e
11 toxicológico dos óleos de neem e laranja, bem como para consolidar a dose
12 utilizada.

13

14

15

16

17

REFERÊNCIAS

- 1
2
3 Abdel-Shafy, S.; El-Khateeb, R. M.; Soliman, M. M.; Abdel-Aziz M.M. The
4 efficacy of some wild medicinal of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta*
5 *indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum*
6 (Ixodoidea: Ixodidae). Veterinary Parasitology, v. 30, n. 106, p. 89-96, 2002. PII:
7 S0 3 04 -4 0 17 (0 2)0 0 0 2 3 -7
8
9 Andreotti R, Garcia MV, Cunha RC, Barros JC. Protective action of *Tagetes*
10 *minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus*
11 (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. Veterinary Parasitology
12 197 (2013) 341– 345
13
14 Armugan V, Sundraraj YA, Saled I. The effect of *Citrus sinensis* peel extract
15 against *Rhipicephalus sanguineus* (Dog tick). Malays. Appl. Biol. (2016) 45(2):
16 119-123.
17
18 Bala AY, Bunza MDA, Abdullahi K. In vitro toxicity effect of *Citrus*
19 *sinensis* (Orange) peel extract on two common tick species of cattle in Sokoto.
20 Nigerian Journal of Parasitology, Vol. 32 [1] March 2011, pp. 87-91.
21
22 Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Mehlhorn, H., 2016. Tick repellents and
23 acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?
24 Parasitol. Res. 115, 2545-2560. DOI 10.1007/s00436-016-5095-1.
25
26 Boursier CM, Bosco D, Coulibaly A, Negre M. Are traditional neem extract
27 preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A? Crop
28 Protection 30 (2011) 318e322. doi: 10.1016/j.cropro.2010.11.022.
29
30 Chungsamarnnyart N, Jansawan W. Acaricidal activity of Peel Oil of *Citrus* spp
31 on *Boophilus microplus*. Kanetsar J (Nat. Sci.) 30:112 – 177 (1996).
32
33 Costa-Júnior LM, Miller RJ, Alves PB, Blank AF, Li AY, Pérez de León AA.
34 Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals

1 against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus*
2 (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Parasitology* 228 (2016) 60–64
3 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.028>.
4

5 Giglioti R, Forim MR, Oliveira HN, Chagas ACS, Ferrezini J, Brito LG, Falcoski
6 TORS, Albuquerque LG, Oliveira MCS. In vitro acaricidal activity of neem
7 (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations
8 against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* 181 (2011) 309– 315.
9 doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.053
10

11 Habeeb SM, Abdel-Shafy S e Youssef AEA. Light, Scanning Electron
12 Microscopy and SDS-PAGE Studies on the Effect of the Essential Oil, *Citrus*
13 *sinensis* Var. *balady* on the Embryonic Development of Camel Tick *Hyalomma*
14 *dromedarii* (Koch, 1818) (Acari: Ixodidae). *Pakistan Journal of Biological*
15 *Sciences*. Volume 10 (8): 1151-1160, 2007. DOI: 10.3923/pjbs.2007.1151.1160
16 .

17 Jonsson, N. N.; Piper, E. K. *Integrated Control Programs for Ticks on Cattle*.
18 UQ Printery Australia, p. 135–136, 2007.
19

20 Kumar P, Mishra S, Malik A & Satya S. Insecticidal Evaluation of essential oils
21 of *Citrus sinensis* L. (Myrtales:Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L.
22 (Diptera: Muscidae). *Parasitology Research*. Volume 110, 1929–1936(2012).
23

24 Kumar AGK, Sharma AK, Kumar S, Ray DD, Rawat AKS, Srivastava S, Ghosh
25 S. Comparative in vitro anti-tick efficacy of commercially available products and
26 newly developed phyto-formulations against field collected and resistant tick
27 lines of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Parasit Dis* (Oct-DCE 2016)
28 40(4):1590–1596 doi 10.1007/s12639-015-0736-3
29

30 Kumar AKG, Fulara A, Chigurea G., Sharma A K, Nagara G, Souza FF,
31 Bechara GH, Ghosh S. Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant
32 extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*.

1 Ticks and Tick-borne Diseases 10 (2019) 1085–1095.
2 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.003>
3
4 Landau, S.Y., Provenza, F.D., Gardner, D.R., Pfister, J.A., Knoppel, E.L.,
5 Peterson, C., Kababya, D., Needham, G.R., Villalba, J.J., 2009. Neemtree
6 (*Azadirachta indica* Juss.) extract as a feed additive against the American dog
7 tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 165, 311–317.
8 LIU, Y.; CHEN, G. S.; CHEN, Y.; LIN, J. Inclusion complexes of azadirachtin
9 with native and methylated cyclodextrins: solubilization and binding ability.
10 *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 12, p. 4037-42, 2005.
11
12 Manuel JJ, Favela-Hernández, González-Santiago O, Ramírez-Cabrera MA,
13 Esquivel-Ferriño PC e Camacho-Corona MR. Chemistry and Pharmacology of
14 *Citrus sinensis*. *Molecules* 2016, 21, 247; doi:10.3390/molecules21020247
15
16 Matos AC; Ribeiro CM; Scarminio IS; Afonso S; Vidotto O. Phytochemical
17 analysis and acaricidal activity of *Aloe arborescens* Mill. extracts against
18 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.
19 38, n. 5, p. 3113-3122, set./out. 2017. doi: 10.5433/1679-
20 0359.2017v38n5p3113
21
22 Pazinato R, Volpato A, Baldissera MD, Santos RCV, Baretta D, Vaucher RA,
23 Giongo JL, Boligon AA, Stefani LM, Silva AS. In vitro effect of seven essential
24 oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Journal of*
25 *Adv. Research* (2016)7, 1029–1034 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2016.05.003>
26
27 Pereira Junior AM, Camargo-Mathias MI, Daemon E, Peconick A P, Lima-
28 Souza JR, Oliveira PR, Braga AS, Lara LJ e Remedio RN. Efficacy of carvacrol
29 on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1
30 887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction. *Natural Product*
31 *Research Formerly Natural Product Letters* ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427
32 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>
33

- 1 Santos AV, Oliveira RA, Albuquerque GR. EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO
2 DE NIM (*Azadirachta indica*) E ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO (*Syzygium*
3 *aromaticum*) SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Med.
4 Vet., 34(2):111-115, abr/jun 2012
5
- 6 Singh NK, Robert J. Miller RJ, Klafke GM, Goolsby JA, Thomas DB, de Leond
7 AAP. In-vitro efficacy of a botanical acaricide and its ativo ingredients against
8 larvae of susceptible and acaricide-resistant strains of *Rhipicephalus*
9 (*Boophilus*) *microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne*
10 *Diseases* 9 (2018) 201–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017>
11
- 12 Zaffar, H., Irshad U., Pervez A., Naqvi T. A. Mode of action, toxicity and
13 biodegradation of organochlorinated pesticides: A mini review. *Journal of*
14 *Applied Environmental and Biological Sciences*, 6(8)1-6, 2016 © 2016, Text
15 Road Publication ISSN: 2090-4274
16

ANEXO (S)

A. Parecer de aprovação da CEUA- PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 27 de abril de 2017.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01116/2017 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO ORIENTADOR: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA EFICÁCIA "IN VITRO" DE ECTOPARASITICIDAS EM ASSOCIAÇÃO A REGULADORES DO CRESCIMENTO NO CONTROLE DOS CARRAPATOS DO CÃO, *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* E DO BOI, *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPTUS*.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Gervásio Henrique Bechara

EQUIPE DE PESQUISA

Claudia Turra Pimpão, Francinea Alves Fonseca de Souza, Ana Letícia Cancio do Amaral, Maria Cecília Planaro Moraes

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO

Escola de Ciências da Vida – Medicina Veterinária - PIBIC

VIGÊNCIA DO PROJETO	03/2017 a 03/2018	QUANTIDADE DE ANIMAIS	2.160 teleoginas e 72.00 larvas (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>) 2.160 teleoginas e 72.00 larvas (<i>Rhipicephalus b. microptus</i>)
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Rhipicephalus b. microptus</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Fêmeas	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Variável / 300mg	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Animais de Proprietários Particulares	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de **27.04.2017**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. *O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo. Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar qualquer alteração no protocolo de pesquisa e o relatório final a esta CEUA.*

Atenciosamente,
Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

1 B. Normas da REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA
2 INSTRUÇÕES AOS AUTORES “BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY
3 PARASITOLOGY” REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA
4 VETERINÁRIA.

5 **APRESENTAÇÃO**

6 A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de
7 divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem
8 como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e
9 Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade
10 trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de
11 pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico
12 oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de
13 todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.
14

15 **POLÍTICA EDITORIAL**

16 Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão
17 caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de
18 animais em geral. O(s) autor(res) deverá(ão) anexar uma carta,
19 responsabilizando-se por todo o processo de tramitação e originalidade do
20 artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos
21 à publicação em outros periódicos. Trabalhos com número excessivo de
22 autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação
23 ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os
24 autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de
25 resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita.
26 Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito
27 acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver
28 agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou
29 sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou
30 infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do
31 trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do
32 Corpo Editorial e/ou do Relator ad-hoc. Nesse processo, o editor-chefe e os
33

1 editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações
2 necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos
3 emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 2 revisores
4 anônimos, sendo um estrangeiro, selecionados pelo editor-chefe. Em caso de
5 pareceres contrários, o artigo será enviado a um terceiro revisor. A Revista
6 Brasileira de Parasitologia Veterinária atribui a seus artigos as categorias de:
7 Artigos Completos, Comunicação Breve e Artigos de Revisão, sendo este
8 último escrito por especialistas e condicionado a solicitação por convite do
9 editor-chefe. Revisões não solicitadas não serão aceitas, mas o tópico da
10 revisão pode ser sugerido, previamente, ao editor-chefe ou editores científicos
11 assistentes.

12 **Submissão de trabalhos:**

13 O artigo a ser submetido deve passar por revisão do inglês, pelos revisores
14 credenciados pela RBPV (<http://rbpv.org.br/guia-do-autor>). Junto ao trabalho
15 submetido anexar o certificado de revisão de inglês. Os pesquisadores deverão
16 assumir os custos da revisão. Caso um dos coautores seja estrangeiro nativo
17 da língua inglesa, este deverá revisar o inglês do trabalho e enviar um ofício à
18 RBPV.

20 **Taxa de publicação:**

21 Após o aceite do artigo, será cobrada as seguintes taxas de publicação:
22 R\$ 500,00 (associados do CBPV em dia com as anuidades);
23 R\$ 1000,00 (não-associados do CBPV). R\$ 300,00 (autores estrangeiros).

25 **Dados bancários para depósito:**

26 Nome: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária/ Revista
27 Banco do Brasil (001)
28 Agência: 0269-0
29 Conta Corrente: 28848-9

30 **Para autores estrangeiros:**

31 SWIFT BRASBRRJRPO
32 IBAN 001026900000288489
33

1 Endereço: Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural. CEP:
2 14884-900.

3 Jaboticabal – SP, Brasil.

4 **Processo de avaliação pelos pares**

5 O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas
6 Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator ad-hoc. Os artigos
7 submetidos serão avaliados por, no mínimo, 2 revisores anônimos, sendo um
8 estrangeiro, selecionados pelo editor-chefe. Em caso de pareceres contrários,
9 o artigo será enviado a um terceiro revisor. O relator deverá preencher o
10 formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão
11 (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). Tendo recebido a avaliação de
12 pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá (ão) os
13 formulários de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. O
14 avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário. Após o aceite
15 pelos revisores ad-hocs, porém antes da resposta aos autores, o artigo passará
16 pela análise final de um dos Editores Científicos Assistentes. Lembrando que, o
17 Editor Científico Assistente possui autonomia para sugerir correções e/ou
18 rejeitar a publicação do artigo, mesmo com a aprovação dos relatores. Após
19 diagramação e editoração, os editores científicos assistentes e a editora-chefe
20 da revista, fazem as correções finais.

22 **Transferência de direitos autorais:**

23 Ao ser submetido, o artigo deve vir acompanhado de um ofício, em que o autor
24 se responsabiliza por todo o processo de tramitação e originalidade do
25 trabalho.

27 **ÉTICA**

28 Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às
29 normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
30 (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de
31 protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e
32 Bem-Estar Animal.

APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS

1 Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas: Os trabalhos
2 devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal
3 e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé
4 da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os
5 trabalhos deverão ser apresentados em fonte “Times New Roman”, tamanho
6 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e
7 espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a
8 categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 17 páginas, quando
9 da diagramação final. Para a categoria Comunicação Breve, o trabalho não
10 deverá exceder 6 páginas, quando da diagramação final. As tabelas e
11 ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final
12 do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo
13 após as referências bibliográficas. Os trabalhos submetidos deverão ser
14 revisados por um dos revisores de língua inglesa credenciados pela RBPV, de
15 escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser
16 organizados obedecendo à seguinte sequência: Título Original, Título
17 Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo
18 (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão,
19 Conclusões (ou combinação destes três últimos), Agradecimentos (facultativo)
20 e Referências Bibliográficas. As Comunicação Breve obedecem à sequência
21 acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto
22 corrido. Para essa categoria, o artigo submetido só será aceito desde que
23 possua alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de
24 importância evidente, atribuindo ao Editor-chefe a continuidade da submissão
25 ou não.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

30 O título “cheio” e o subtítulo (se houver) não devem exceder 18 palavras. Não
31 deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras
32 em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com:
33

1 Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de
2 citação em nomes científicos.

3 **Autor(es)/Filiação**

4 Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os
5 autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes
6 próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório,
7 Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e
8 País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do
9 autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado,
10 nessa ordem.

12 **Referências bibliográficas**

13 As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil
14 consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados
15 em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para consulta em
16 sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes:
17 <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto
18 devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e
19 datas, exatamente como aparecem nas referências.

21 **“Abstract” e Resumo**

22 Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem
23 deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações
24 de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas
25 entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect
26 Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do
27 trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O
28 abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos
29 seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

30 **Keywords e Palavras-chave**

31 As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São
32 limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo.

Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão.

Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias

1 digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se
2 a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao
3 invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

4 **Conclusões**

5 As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e
6 discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será
7 necessário.

8 **Agradecimentos**

9 Quando necessário, limitados ao indispensável.

10 **Referências bibliográficas**

11 A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e,
12 posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma
13 referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas
14 letras 'a', 'b', 'c', etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos
15 devem ser abreviados conforme Index Medicus -
16 <http://www2.bq.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

17 **Livros**

18 Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

19 **Capítulo de livro**

20 Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS,
21 Threlfall WR.

22 *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders;
23 2007. p. 667-680.

24 **Artigo de periódico**

25 Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of *Rhipicephalus*
26 (*Boophilus*) *microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in
27 Lages State of Santa Catarina Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1):13-16.

28 **Tese e Dissertação**

29 Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do*
30 *município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade
31 Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

32 **Documento eletrônico**

Centers for Disease Control and Prevention. Epi Info [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação
Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação
Paim e Souza (2011) ou (PAIM & SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de 'et al.' e o ano de publicação

Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Obs. Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Prova Gráfica.

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitas para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.