

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DE TERAPIA FOTODINÂMICA E
EQUIPAMENTO A LASER PARA O CONTROLE DE**
Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Leonardo Aparecido Lima dos Santos
Biólogo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DE TERAPIA FOTODINÂMICA E
EQUIPAMENTO A LASER PARA O CONTROLE DE**
Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Discente: Leonardo Aparecido Lima dos Santos
Orientador: Prof. Dr. Alessandro Pelegri Minho

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias

S237a Santos, Leonardo Aparecido Lima dos
Avaliação de terapia fotodinâmica e equipamento a laser para o controle de Rhipicephalus (Boophilus) microplus / Leonardo Aparecido Lima dos Santos. -- Jaboticabal, 2023
51 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Alessandro Pelegrine Minho
Coorientadora: Ana Carolina de Souza Chagas

1. Carrapato. 2. Resistência. 3. Controle físico. 4. terapia fotodinâmica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

O combate ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* possui como método principal o controle baseado em produtos químicos, porém, a utilização incorreta dessas substâncias gera prejuízos econômicos, danos à saúde animal, humana e ambiental, devido à dispersão dos diferentes produtos, sendo necessária a busca por métodos alternativos a fim de reduzir tais problemas. O controle físico é uma metodologia utilizada em estudos clínicos de eficácia contra parasitoses de interesse agrônomo e entomológico, mas pouco estudada em carrapatos de interesse veterinário. Com isso o projeto desenvolvido teve como objetivo buscar novas informações inovadoras com base em tratamentos não químicos e avaliação de equipamentos emissores de laser de baixa potência para verificar sua eficácia, buscando uma nova base de insumos que possam ser desenvolvidas para o controle dos carrapatos.

Potential Impact of this research

The main method of combating *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is control based on chemical products, however, the incorrect use of these substances generates economic losses, damage to animal, human and environmental health, due to the dispersion of different products, making it necessary to search by alternative methods in order to reduce such problems. Physical control is a methodology used in clinical efficacy studies against parasites of agronomic and entomological interest, but little studied in ticks of veterinary interest. Therefore, the project developed aimed to seek new innovative information based on non-chemical treatments and evaluation of low-power laser emitting equipment to verify its effectiveness, seeking a new base of inputs that can be developed to control ticks.



TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE TERAPIA FOTODINÂMICA E
EQUIPAMENTO A LASER PARA O CONTROLE DE
Rhipicephalus (Boophilus) microplus



AUTOR: LEONARDO APARECIDO LIMA DOS SANTOS

ORIENTADOR: ALESSANDRO PELEGRINE MINHO

COORIENTADORA: ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias,
área: Saúde Única pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. ALESSANDRO PELEGRINE MINHO (Participação Virtual)
Departamento Sanidade Animal / EMBRAPA Pecuária Sudeste - São Carlos/SP

Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. LUÍS ADRIANO ANHOLETO (Participação Virtual)
Departamento de Química / Acadia University - Wolfville/Canadá

Documento assinado digitalmente
gov.br ALESSANDRO PELEGRINE MINHO
Data: 02/10/2023 10:56:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>
Documento assinado digitalmente
gov.br ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Data: 02/10/2023 11:15:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIS ADRIANO ANHOLETO
Data: 02/10/2023 15:10:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 02 de outubro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Leonardo Aparecido Lima dos Santos - nascido em 29 de janeiro de 1996, em São Carlos - SP, Biólogo graduado pela UNICEP - Centro Universitário Central Paulista, São Carlos - SP, em 2019. Durante a graduação foi aluno de Iniciação Científica pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Alessandro Pelegrine Minho, com a monografia intitulada “Eficácia *in vitro* de extratos de acácia sobre *Haemonchus contortus*”. De 2020 a 2021 foi bolsista DTI-C nível C do CNPq, no qual realizou na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP, a avaliação *in vitro* da eficácia de óleos essenciais de plantas para o controle de larvas de *Rhipicephalus microplus*. Em junho de 2021 ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Ciências veterinárias (área de Saúde Única) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Jaboticabal – SP, sob orientação do Prof. Dr. Alessandro Pelegrine Minho, recebendo Auxílio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A pesquisa desenvolvida durante esse período gerou a dissertação aqui apresentada, a qual segue a linha de pesquisa que busca métodos alternativos para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

EPÍGRAFE

“O mesmo homem nunca entra no
mesmo rio, outras são as águas e
outro é o homem”.

Heráclito de Éfeso

DEDICATÓRIA

Dedicado à minha
família

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria Cristina Lima de Andrade e ao meu Padrasto José Carlos de Andrade por me proporcionarem força e coragem para seguir em frente mesmo perante aos desafios, demonstrando a importância de minhas escolhas para o meu futuro.

Aos meus irmãos Lucas Rodrigo e Luan Antônio pelo apoio, parceria e incentivo durante minha vida.

Sou grato a meus avós pelo auxílio durante toda a minha trajetória pessoal e profissional, por me moldarem e serem os principais pilares de minha família.

A minha namorada Bianca Cristina que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos durante esse percurso.

Aos meus amigos de infância pelo incentivo e por compreenderem minha ausência devido aos anos de estudo.

Ao Dr. Alessandro Pelegrine Minho pela oportunidade concedida, pelas dicas, ensinamentos, apoio profissional, paciência e por nunca me julgar pela minha forma de ser, me demonstrando que é possível evoluir cada vez mais.

Dedico em especial ao Dr. Yousmel Alemán Gainza, pelo incentivo de me manter firme em minha trajetória, por me ensinar todas as técnicas e fundamentos necessários em meu âmbito profissional apontando meus erros e acertos, tornando-se um verdadeiro amigo.

A Embrapa Pecuária Sudeste-CPPSE pela infraestrutura disponibilizada para a realização da parte experimental deste estudo.

Aos meus colegas e companheiros de trabalho da Embrapa, pelo auxílio durante o processo de desenvolvimento das atividades sempre quando necessário.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Instituto de Física de São Carlos – IFSC, por disponibilizar o laboratório e o microscópio confocal para realização do projeto.

Por fim, a Universidade Estadual Paulista – UNESP, pela oportunidade e por abrir caminhos para meu ingresso na área da pesquisa.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

Certificado Comitê de Ética	ii
RESUMO.....	iii
Palavras-chave.....	iii
ABSTRACT	iv
Keywords.....	iv
1 Introdução	1
2 Revisão de literatura	3
2.1 Carrapato do boi – <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2 Ciclo de vida.....	4
2.3 Método de controle do <i>Rhipicephalus microplus</i>	5
2.4 Métodos alternativos de controle.....	7
2.5 Controle físico de ectoparasitas	7
2.6 Revisão dos métodos avaliados	8
2.6.1 Protótipo Laser	8
2.6.2 Terapia Fotodinâmica e fotossensibilizador	13
3. Material e Métodos	15
3.1 Local e condições do experimento	15
3.2 Manutenção das colônias de <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
3.3 Isolados de plantas	17
3.4 Teste de repelência (TR).....	17
3.5 Metodologia - Protótipo Laser	18
3.6 Metodologia - Terapia Fotodinâmica (TFD).....	20
3.7 Análise estatística	21
4 Resultados e discussão.....	22
4.1 Análise dos resultados	22
4.1.1 Protótipo laser	22
4.1.2 Terapia Fotodinâmica.....	26
4.1.3 Análise de imagem - microscopia confocal	29
Conclusão	31
Agradecimentos	31
Referências	32

Certificado Comitê de Ética



CERTIFICADO

PRT N° 01/2019

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: **Desenvolvimento de métodos alternativos para controle de ectoparasitos de interesse veterinário**, registrado com o n° 01/2019 sob a responsabilidade do pesquisador científico Alessandro Pelegri Minho, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE.

São Carlos, 18 de junho de 2019



 Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Embrapa Pecuária Sudeste

Reunião de 18/06/2019

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2019 a 31/03/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus</i> - raça <i>Holandesa</i>
N° de animais	34
Peso/Idade	200-300 kg
Sexo	Machos
Origem	Embrapa Pecuária Sudeste

AVALIAÇÃO DE TERAPIA FOTODINÂMICA E EQUIPAMENTO A LASER PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

RESUMO - *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita responsável por gerar prejuízos econômicos para a pecuária que somam cerca de \$3,24 bilhões de dólares por ano. O principal método de controle envolve a utilização de carrapaticidas químicos, cuja utilização incorreta e intensiva desses fármacos acarreta o número crescente de relatos de resistência aos acaricidas, risco da presença de resíduos em produtos de origem animal e danos à saúde pública e ambiental, sendo necessário avaliar diferentes métodos alternativos de controle do carrapato-dos-bovinos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver e avaliar metodologias (protótipo laser/terapia fotodinâmica) que envolvem o controle físico para reduzir ou inibir o desenvolvimento do *R. microplus*. Ambas as metodologias avaliadas não demonstraram taxa de mortalidade, portanto, foi necessária a realização do teste de repelência (TR) para avaliar a porcentagem de migração das larvas submetidas às metodologias, no qual foram comparadas com controle negativo H₂O (GI-CNR), controle negativo etanol 60% (GII-CNR) e controle positivo *Croton sonderianus* (GIII-CPR). As larvas do grupo (GI-CNR) submetidas ao laser reduziram sua motilidade de 97,5% para 4,6%, as do GII-CNR reduziram de 96,8% para 3,8%, enquanto as larvas do grupo controle positivo de repelência (GIII-CPR) não tiveram alteração significativa, ficando próximo de 100%. Para realização da terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador (curcumina) foi diluído em quatro concentrações seriadas (200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL), após ativação com o equipamento (biotable) as larvas foram levadas para o TR no qual apresentaram respectivamente (GI-CNR) 98,7%, 82,5%, 65,8%, 42,6%; (GII-CNR) 92,8%, 81,2%, 63,2%, 37,0%; (GIII-CPR) 98,1%, 98,7%, 96,1%, e 98,3% de repelência. Esse estudo demonstrou que o controle físico, não apresentou mortalidade, porém, acarretou danos às estruturas locomotoras do ectoparasita podendo afetar o ciclo de vida parasitário.

Palavras-chave: carrapato, controle físico, ectoparasita, resistência, terapia fotodinâmica.

EVALUATION OF PHOTODYNAMIC THERAPY AND LASER EQUIPMENT FOR THE CONTROL OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

ABSTRACT - *Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite responsible for generating economic losses for livestock farming that total around \$3.24 billion dollars per year. The main control method involves the use of chemical acaricides, whose incorrect and intensive use of these drugs leads to an increasing number of reports of resistance to acaricides, the risk of the presence of residues in products of animal origin and damage to public and environmental health, making it necessary evaluate different alternative methods of controlling cattle ticks. Therefore, the objective of this study was to develop and evaluate methodologies (prototype laser/photodynamic therapy) that involve physical control to reduce or inhibit the development of *R. microplus*. Both methodologies evaluated did not demonstrate a mortality rate, therefore, it was necessary to carry out the repellency test (RT) to evaluate the percentage of migration of larvae subjected to the methodologies, in which they were compared with the negative control H₂O (GI-CNR), control negative 60% ethanol (GII-CNR) and positive control *Croton sonderianus* (GIII-CPR). The larvae of the group (GI-CNR) subjected to the laser reduced their motility from 97.5% to 4.6%, those of the GII-CNR reduced it from 96.8% to 3.8%, while the larvae of the positive control group of repellency (GIII-CPR) had no significant change, remaining close to 100%. To perform photodynamic therapy, the photosensitizer (curcumin) was diluted in four serial concentrations (200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL), after activation with the equipment (biotable) the larvae were taken to the TR in which they presented respectively (GI-CNR) 98.7%, 82.5%, 65.8%, 42.6%; (GII-CNR) 92.8%, 81.2%, 63.2%, 37.0%; (GIII-CPR) 98.1%, 98.7%, 96.1%, and 98.3% repellency. This study demonstrated that physical control did not present mortality, however, it caused damage to the locomotor structures of the ectoparasite and could affect the parasite life cycle.

Keywords: tick, physical control, ectoparasite, resistance, photodynamic therapy.

1 Introdução

O carrapato do boi é considerado um dos ectoparasitas de bovinos mais preocupantes da África, Austrália e da América Latina, com grande relevância como vetor de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* (agentes da Tristeza Parasitária Bovina - TPB) e *Borrelia theileri* na América do Sul e Central (Taylor et al., 2007; Pereira et al., 2008; Catto et al., 2010; Estrada-Peña, 2015).

A hematofagia das formas adultas e imaturas, além da transmissão de patógenos como os da TPB, ocasiona anemia, perda de peso, estresse, queda na imunidade, diminuição da produtividade e por vezes a morte de animais (Faza et al., 2013; Lopes et al., 2013). Além disso, as lesões predispoem o estabelecimento de miíases que afetam negativamente a qualidade do couro (Guglielmone et al., 1999).

Seu controle envolve não somente gastos com medicamentos, mas tempo, instalações e mão de obra para tratamento, que indiretamente geram prejuízos econômicos aos pecuaristas. Conforme Grisi (2014) apenas no Brasil, perdas decorrentes desse parasita somam cerca de \$3,24 bilhões de dólares por ano.

O principal método empregado no controle de *R. microplus* ainda é a aplicação de acaricidas sintéticos comerciais, sendo o período de proteção residual e a eficiência do produto sobre a população alvo, fatores essenciais para que seja bem-sucedido (Pereira, 2009; Correa et al., 2015). O período de carência do medicamento é outro fator limitante, pois esses resíduos dos fármacos no leite e na carne podem prejudicar a saúde humana (Langeloh, 2010).

No Brasil, houve aumento de relatos científicos acerca da resistência de *R. microplus* frente aos carrapaticidas nas últimas décadas (Raynal et al., 2013; Cruz et al., 2015; Higa et al., 2016), ocorrendo propagação de populações de carrapatos resistentes em todo o território nacional (Higa et al., 2015). Em diversos estados, principalmente das regiões Sul e Sudeste do país, são amplamente diagnosticadas ocorrências de populações resistentes a até oito classes de acaricidas e suas associações (Higa et al., 2015), incluindo o primeiro caso de resistência ao Fluazuron (Reck et al., 2014).

A escolha e o uso correto, assim como a mudança de produto quando necessária, são fatores preponderantes para a obtenção dos resultados esperados, pois o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes tem ocorrido, historicamente, após algum tempo de uso da maioria dos carrapaticidas lançados no mercado (Gomes, 1998). Segundo Furlong (2005), os mecanismos geralmente

utilizados pelos carrapatos resistentes para sobreviver à aplicação do carrapaticida são a redução na taxa de penetração do produto, as mudanças no metabolismo, no armazenamento e na eliminação do químico, e por meio de alterações no local de ação do produto.

Mesmo assim, o carrapaticida químico ainda representa a melhor opção para os pecuaristas, pois são encontrados mais facilmente no comércio e apresentam resultados satisfatórios no combate ao carrapato, sendo que alternativas, às vezes com resultados superiores, não são de fácil acesso aos produtores.

Visto a importância do carrapato *R. microplus* na pecuária brasileira e, ainda, diante da constante dificuldade de controle deste ectoparasito devido à resistência aos princípios ativos disponíveis, fazem-se necessários novos estudos, sobretudo, de alternativas que auxiliem no controle, reduzindo a carga parasitária dos animais e do ambiente e, conseqüentemente, diminuam os prejuízos econômicos ocasionados por eles. Nesse contexto, faz-se necessária a elaboração de novos métodos para o controle desse carrapato.

Independentemente da alternativa selecionada para controlar parasitoses, é aconselhado conciliar várias metodologias para que o sucesso seja alcançado (Pereira et al., 2010), ou seja, implementar o controle integrado de parasitos.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* novas metodologias baseadas no controle físico utilizando equipamentos emissores de laser e/ou formulações contendo compostos fotossensibilizadores para o controle das formas imaturas do *R. microplus*.

2 Revisão de literatura

2.1 Carrapato do boi – *Rhipicephalus microplus*

Taxonomicamente, o carrapato *R. microplus* é classificado, e modificado posteriormente por Murrel & Barker da seguinte forma:

- Reino: Animália;
- Filo: Arthropoda;
- Classe: Arachnida;
- Subclasse: Acari;
- Ordem: Ixodida;
- Família: Ixodidae;
- Gênero: *Rhipicephalus*;
- Espécie: *Rhipicephalus microplus*.

Esse carrapato possui a base do gnatossoma hexagonal com rostro, ou seja, hipostômio e quelíceras com palpos curtos, com o terceiro segmento do palpo fazendo uma aba na junção com o segundo segmento, possui seu escudo sem ornamentação, os olhos estão presentes, além de estigmas arredondados ou ovais.

Os machos apresentam dois pares de placas adanaís desenvolvidas, geralmente com prolongamento caudal e são menores que as fêmeas (Monteiro, 2012).



Figura 1. *Rhipicephalus microplus* adultos (vista dorsal). Fonte: Embrapa 2018.

2.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *R. microplus* pode ser dividido em duas etapas, a fase parasitária e a fase de vida livre (ou fase não parasitária). A fase parasitária compreende desde a fixação da larva em um hospedeiro sensível até chegar ao estágio adulto, com consequente desprendimento das teleóginas (fêmeas ingurgitadas). A partir deste momento dá-se o início da fase de vida livre em que, após cair ao solo, a teleógina busca local adequado e inicia a ovipostura com subsequente incubação dos ovos e posterior eclosão das larvas (Garcia, 2019).

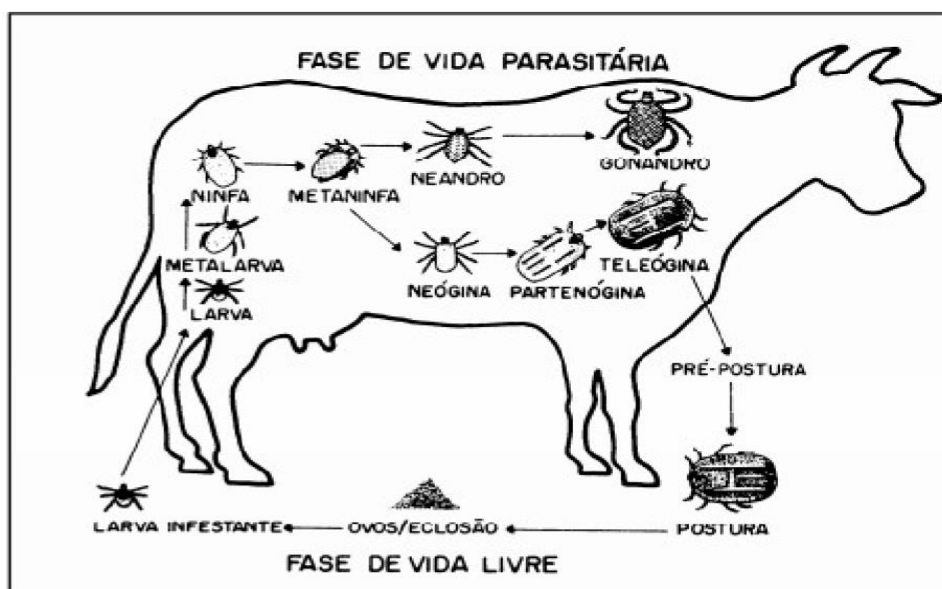


Figura 2. Representação do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*.
Fonte: Fortes (2004).

A fase parasitária inicia-se quando a “larva infestante” consegue subir e fixar-se no bovino, dessa forma permanecendo por aproximadamente 22 dias. Após sofrer diferentes mudas (estágios de metalarva, ninfa e metaninfa), ocorre a diferenciação sexual. O macho (neandro) atinge a fase adulta (gonandro) e começa a percorrer o corpo do bovino para fecundar as fêmeas. A fêmea (neógina) após ser fecundada (partenógina), recebe então a denominação “teleógina”, próximo ao momento de se desprender do animal e dar início à fase de vida livre, na qual ocorre a postura dos ovos (Gonzales, 1995).

De acordo com Pereira (2008) e Veríssimo (2015), apenas 5% da carga parasitária aparece presentes parasitando os animais, enquanto os 95% deixam as pastagens altamente infestadas agravando o problema na propriedade.



Figura 3. Larvas de *Rhipicephalus microplus* na vegetação. Fonte: Figueiredo (2018).

Encontrando condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, do extremo Sul em direção ao Norte ou Nordeste, o carrapato pode completar de 2,5 a 3 ou 3 a 4, e potencialmente até cinco gerações por ano, em locais com temperaturas médias anuais acima de 17° C. Entretanto, estações secas severas podem limitar a sobrevivência do carrapato, podendo ir até a completa paralisação na incubação, postura, e até mesmo o fracasso desses estágios, quando a sobrevivência de um ano para outro se torna dependente da larva dormente do inverno (Furlong e Evans, 1991).

2.3 Métodos de controle do *Rhipicephalus microplus*

A utilização de carrapaticidas é uma das principais formas de controle, tornando-se necessário o conhecimento do ciclo biológico do carrapato para uma maior eficácia no controle, custo, avanço da resistência e reduzir os impactos no ambiente causados pelo uso desses acaricidas (Andreotti, 2010).

A aplicação desses acaricidas (geralmente disponíveis na forma de aspersão, *pour on* ou injetáveis) continua sendo o método mais comum para controle do carrapato *R. microplus* na bovinocultura (Furlong, 2005; Klafke et al., 2006; Furtado et al., 2013).

Tabela 1. Exemplos de carrapaticidas comerciais

Nome comercial	Princípio Ativo	Composição (100 mL)
Butox P CE 25	Deltametrina base	02,5 g
Colosso FC30	Cipermetrina	15,0 g
	Fenthion	15,0 g
Colosso Pulverização	Cipermetrina	15,0 g
	Clorpirifós	25,0 g
	Citronelal	01,0 g
Triatox Pulverização	Amitraz	12,5 g
Bovitraz	Amitraz	12,5 g
Cyperclor Plus Pulverização	Cipermetrina	15,0 g
	Clorpirifós	25,0 g
	Citronelal	01,0 g
	Butóxido de Piperonila	15,0 g
Máximo Pulverização	Cipermetrina	15,0 g
	Clorpirifós	25,0 g
	Butóxido de Piperonila	01,0 g

Fonte: Informações presentes na Bula dos Medicamentos

O controle dos carrapatos é realizado tradicionalmente pela utilização de substância ou produtos químicos, através da aplicação de acaricidas e quando utilizado corretamente torna-se eficiente. Porém, este controle frequentemente é utilizado de forma incorreta, levando ao desenvolvimento da resistência química, constituindo-se em um problema global (Freitas et al., 2005).

Levantamentos da resistência do carrapato bovino no estado de São Paulo, por exemplo, indicaram que em propriedades do Noroeste do estado, os piretroides foram os menos eficazes (17% e 27% para cipermetrina e deltametrina,

respectivamente), indicando resistência em todas as propriedades averiguadas. Amitraz, clorpirifós + cipermetrina e clorpirifós + diclorvós demonstraram as maiores médias de eficácia: 73%, 79% e 76%, respectivamente (Ueno et al., 2012)

O efeito residual do carrapaticida também é um fator limitante, pois o uso indiscriminado e sem medidas de segurança pode ocasionar contaminação ambiental e toxicidade, tanto para a fauna local quanto para humanos (Dantas-Torres, 2008; Araújo, 2015), sendo necessário avaliar métodos alternativos para o controle do ectoparasito.

2.4 Métodos alternativos de controle

Com a importância destes ectoparasitos e a disseminação de multirresistência a diferentes fármacos sintéticos, a demanda por alternativas de controle “ecofriendly” é prioritária (Regnault-Roger et al., 2012).

Vários estudos são realizados, voltados ao controle alternativo de ectoparasitos, que incluem: controle utilizando fungos (López-Sanchez et al., 2012; González et al., 2016; Fernández-Salas et al., 2017), extratos e óleos essenciais de plantas (Agonolin et al., 2010) e vacinas (Fernandes et al., 2007; Aguierre et al., 2016; Maruyama et al., 2017).

2.5 Controle físico de ectoparasitas

Na literatura, a radiação é um dos principais métodos utilizados em estudos clínicos de eficácia contra parasitoses. Segundo Wang e Tang (2001), o tratamento inclui três tipos de radiação ionizante usadas em alimentos: raios gama de cobalto-60 radioativo e cézio-137, elétrons de alta energia e raios-X. O melhor exemplo desta estratégia foi a aplicação de raios X em pupas de seis dias causando esterilidade em adultos de *Cochliomyia hominivorax*. Posteriormente, 155 machos/km²/-semana foram distribuídos por meio de aviões em regiões estratégicas da América do Norte, fazendo com que essa mosca fosse erradicada; um marco na parasitologia (Baumhover et al., 1955).

Equipamentos de controle físico de insetos, podem ser desenvolvidos com foco na destruição de formas imaturas. Essa linha de pesquisa que utiliza corrente elétrica, radiação eletromagnética, micro-ondas ou radiação ionizante, é mais

comum no controle de insetos de interesse agrônômico (Vincent et al., 2003), com centenas de registro de patente de equipamento, sobretudo, voltados para a área humana e agrícola (Schulein, 1975; Wilbanks, 2000; Demarest et al., 2007; Wiljenberg et al., 2007; Wilbanks, 2010; Bolen, 2016).

Pulsos de laser também já foram avaliados contra larvas de insetos. Segundo Wilde (1965) a utilização do laser em larvas de *Dermestidae* spp, *Trogoderma versicolor* e baratas americanas adultas *Periplaneta americana*, causou abrasamento do corpo, cessação da alimentação, da taxa de crescimento e do movimento, e perda da resposta fototática negativa. A mortalidade total nos três espécimes tratados ocorreu em 8-14 dias, em comparação aos 45-68 dias nos controles.

Poucos estudos utilizando radiação foram conduzidos em carrapatos. As pesquisas realizadas em *Rhipicephalus sanguineus* (Oliver et al., 1972) e *Amblyomma americanum* (Drummond et al., 1966), demonstram que o efeito é semelhante ao ocasionado em moscas, causando esterilidade em machos e fêmeas, sem interferir na movimentação ou longevidade. Em ambos os estudos, dependendo do nível de irradiação utilizado, o resultado pode ser desde redução da eclodibilidade até cessação total da postura pela fêmea ou fecundidade do macho.

Para o desenvolvimento de métodos de controle físico, como em qualquer componente relacionado ao manejo integrado de parasitoses, a ciência básica e a tecnologia de ponta devem trabalhar em sinergia, a fim de atingir resultados práticos que possam auxiliar o produtor rural na luta incessante contra os ectoparasitos de interesse médico veterinário e saúde pública.

2.6 Revisão dos métodos avaliados

2.6.1 Protótipo Laser

O uso da radiação laser representa uma metodologia promissora no controle de pragas agrícolas e médicas (Keller et al., 2016). Trabalhos anteriores demonstraram que a exposição a luz azul de baixa potência, durante várias horas ao longo de dias, pode incapacitar mosquitos e moscas-da-fruta (Hori et al., 2014).

Portanto foi elaborado um equipamento experimental que consiste em unidade de processamento, unidade de controle de motor (ponte H), motores de passo e um laser.

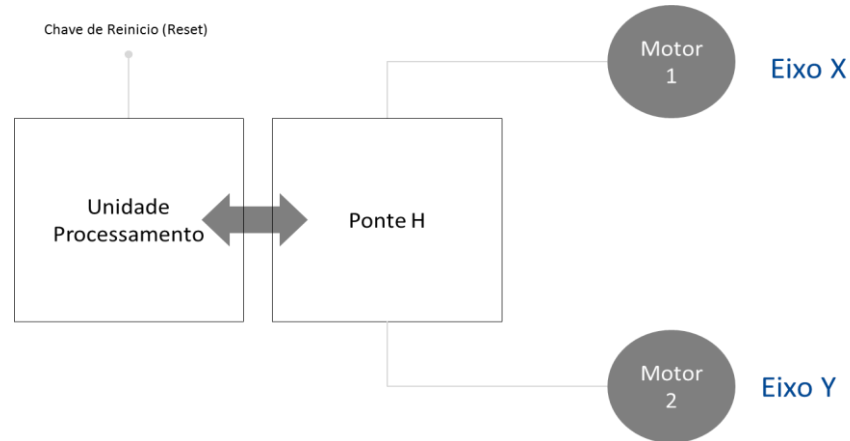


Figura 4. Diagrama de funcionamento do equipamento.

A Unidade de Processamento é composta por uma placa de desenvolvimento de protótipos denominada Arduino, sua principal função é controlar por meio do software embarcado os motores e o disparo do laser.

A Ponte H é um tipo de circuito eletrônico usado para controlar um motor elétrico CC (corrente contínua). Através das portas de controle, pode-se ligar e desligar a energia do motor. Além de poder alterar o sentido de rotação do motor. A figura 5 ilustra o conceito de ponte H utilizando chaves.

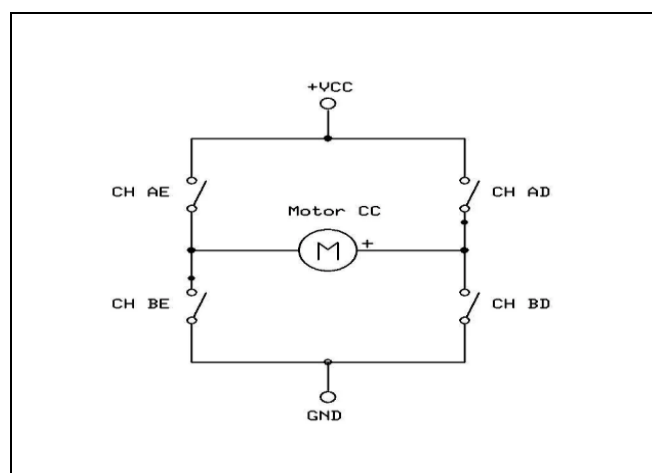


Figura 5. Conceito da Ponte H.

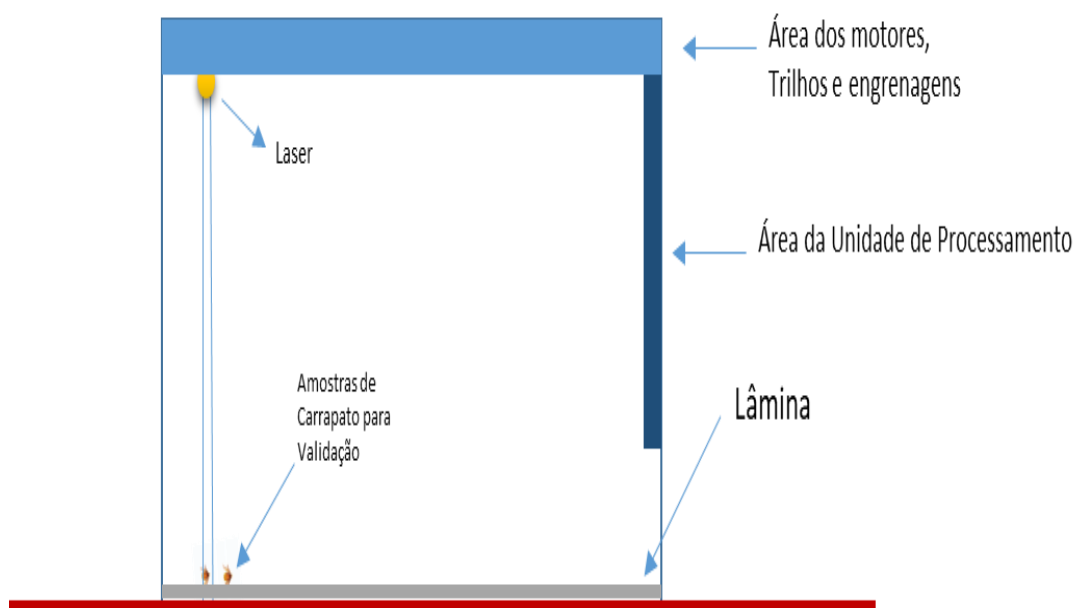


Figura 6. Imagem conceitual do protótipo. Fonte: Autor.

Para penetrar nas partes do exoesqueleto do carrapato por ação do laser, é necessário elevar a temperatura em potência de aproximadamente 1 watts no ponto de contato e produzir uma reação térmica a fim de destruir órgãos vitais do carrapato e evitar danos ao bem-estar animal hospedeiro.

Podemos destacar o tegumento como o órgão que está diretamente envolvido no sucesso biológico do carrapato, devido à proteção contra lesões mecânicas, regulação do balance hídrico, aspectos fisiológicos e de interação com os outros órgãos do carrapato. O tegumento é formado pela epiderme, que promove a secreção da cutícula. O carrapato possui duas camadas cuticulares, a epicutícula, mais externa, fina e flexível, e a procutícula mais interna e espessa. A procutícula está dividida em duas subcamadas, a exocutícula e endocutícula, composta basicamente por quitina e proteína (Aguiar, 2020).

O carrapato possui uma estrutura formada por um exoesqueleto composto de quitina, considerado como um biopolímero que contém polissacárido $C_6H_{10}O_5$, cujo calor específico é $C_p = 1.549 \text{ KJ}/(\text{Kg} \cdot \text{K})$ ou $0,40 \text{ cal}/(\text{g}^\circ\text{C})$ a temperatura ambiente.

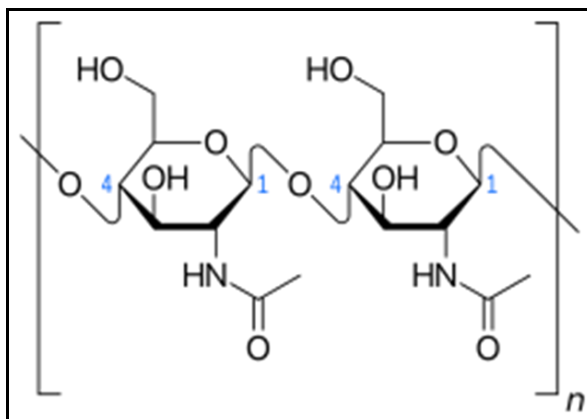


Figura 7. Composição Físico-Química da quitina

Dados da Estrutura Química

- Massa Molecular 203,1925 g/mol
- Calor sensível $C = 1,7 \text{ KJ/ (Kg} \cdot \text{K)}$ ou $0,40 \text{ cal/ (g}^\circ\text{C)}$ *
- Calor sensível para mudança de estado $= 13,81 \text{ KJ (Kg} \cdot \text{K)}$ ou $3,30 \text{ cal/ (g}^\circ\text{C)}$
- Densidade: 1.48 g/cm^3 ;
- Ponto de Fusão: 300°C
- Ponto de Ebulição: $1114,5^\circ\text{C}$

Considerando quantidade de matéria orgânica a ser volatilizada e evitar danos à pele do animal, para efeito de cálculo utilizamos um cilindro hipotético de ação para avaliar o alvo, com área de $0,8 \text{ mm}^2$, então temos um volume cilíndrico aproximadamente $\pi \times (0,4 \text{ mm})^2 \times 0,6 \text{ mm}$ de profundidade, ou seja, $0,302 \text{ mm}^3$.

Aplicando a fórmula de troca de energia em um sistema termodinâmico, onde levamos em consideração o calor latente Q_f (Equação 1) e por outro lado sem mudança de estado até atingir a temperatura de combustão dada pelo calor específico Q_p (Equação 2) temos:

Equação 1.

$$Q_f = mC_f$$

Equação 2.

$$Q_p = \int_1^0 mC_p dT = mC_p(t_1 - t_0)$$

Para massa do carrapato com $0,302 \text{ mm}^3$ de quitina de isolados suscetíveis, temos:

$$mqc = 1480 \text{ Kg/m}^3 * 0,0302 \times 10^{-9} \text{ m}^3 = 4,4 \times 10^{-8}$$

Energia necessária para combustão:

$$Q_{fqc} = mC_f = 4,4 \times 10^{-8} \text{ Kg} \times 13,81 \text{ KJ/kg} = 0,006 \text{ j}$$

$$Q_{pqc} = mQ_{pqc} (T_1 - T_0) = 4,4 \times 10^{-8} \text{ Kg} \times 1,7 \times \text{KJ/Kg} \times (900,95 - 300) = 0,0450 \text{ J}$$

Sendo:

m_{qc} = Massa quitina Carrapato

Q_{fqc} = Energia necessária para fundir a quitina

Q_{pqc} = Calor específico

C_f = Calor sensível para mudança de estado

A potência é calculada pela divisão da energia elétrica transformada, pelo intervalo de tempo dessa transformação conforme equação 3.

Equação 3.

$$P = E_e / \Delta T$$

$$P = 0,0450 / 500 \text{ ms} = 0,9 \text{ Watts}$$

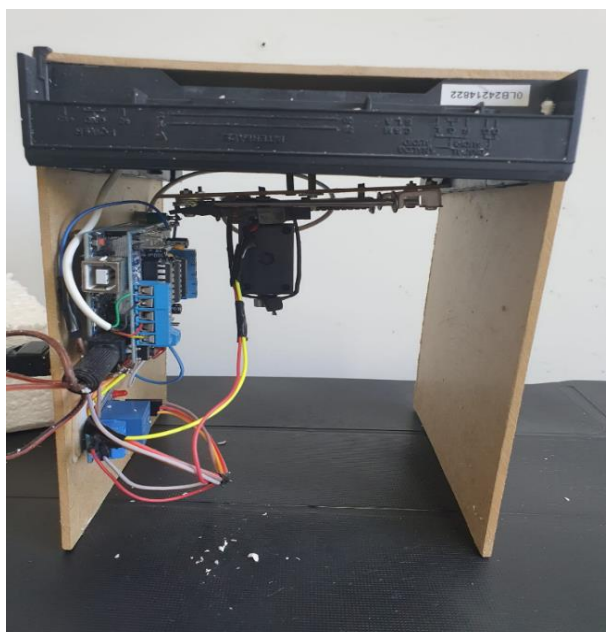


Figura 8. Imagem real do protótipo. Fonte: Autor.

O equipamento utilizado foi um protótipo desenvolvido pela EMBRAPA Brasília, utilizando-se uma potência máxima que, teoricamente, não acarreta danos ao sistema tegumentar dos animais (não foram realizados testes com animais). O qual utiliza um laser azul-violeta com comprimento de onda de 405 nm, resolução 512X512, voltagem 5V e potência 1000 mw, em uma câmara automatizada que delimita uma área de 4,5 cm e altura do alvo em 4,5cm.

2.6.2 Terapia Fotodinâmica e fotossensibilizador

A Terapia fotodinâmica (TFD) é definida como uma reação fotoquímica utilizada com o objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. É uma técnica terapêutica de duas etapas, na qual a utilização de uma droga sensibilizante, tópica ou sistêmica, seguida da irradiação de uma luz visível. Os fotossensibilizantes, administrados exogenamente ou formados endogenamente, são ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio para induzir morte celular (Issa, 2010).

Conforme Ribeiro et al. (2007), a destruição dos tecidos ocorre através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou de oxigênio singleto (mecanismo tipo II), sendo que, no mecanismo tipo 1 o fotossensibilizador interage diretamente com o O_2 produzindo radicais ou íons radicais através de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons, já no Mecanismo Tipo II obtém-se o oxigênio singleto altamente reativo através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio.

Segundo a Teoria do Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados. Esses elétrons tendem a possuir o mesmo *spin* de forma a produzir multiplicidade máxima e assim um estado de mais baixa energia. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio molecular é um tripleto (Machado, 2000).

Com isso, sabe-se que a TFD se baseia na inativação celular através da produção de espécies reativas de oxigênio a partir do processo fotoquímico que

resulta da interação entre um fotossensibilizador e a luz em um comprimento de onda adequado à liberação de oxigênio.

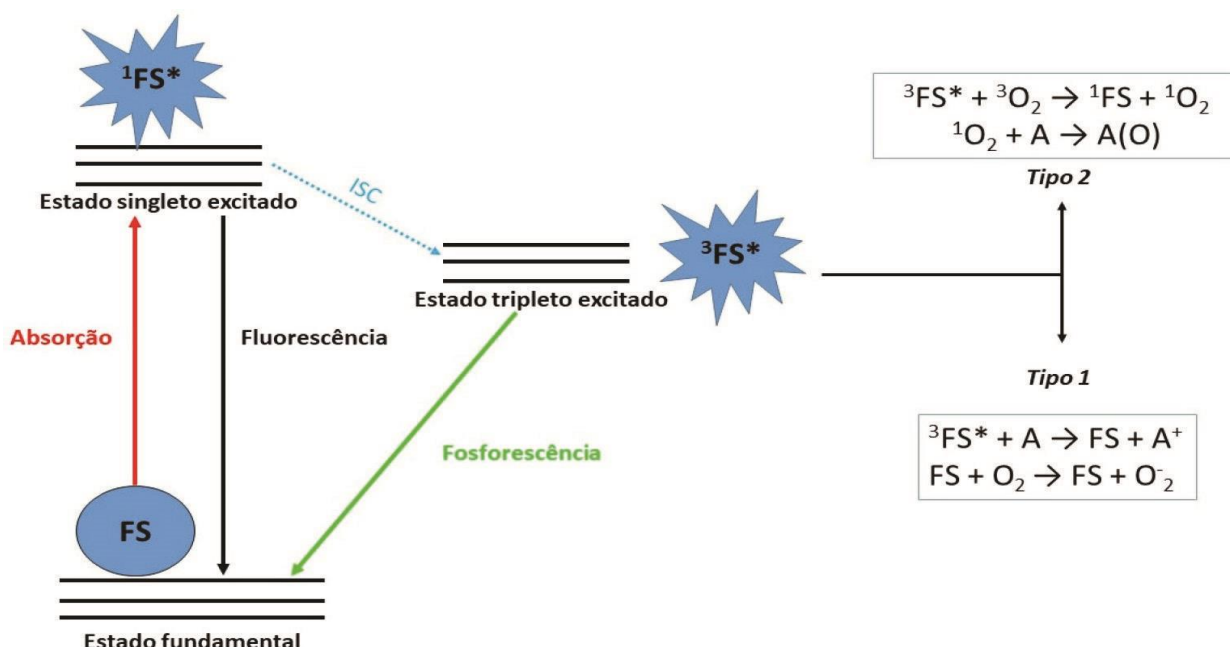


Figura 4. Diagrama de Jablonski para processos fotodinâmicos que levam a formação de espécies reativas de oxigênio. Abreviaturas: FS: fotossensibilizador no estado fundamental; ^1FS : fotossensibilizador no estado singleto excitado; $^3\text{FS}^*$: fotossensibilizador no estado tripleto; ISC: cruzamento intersistema; A: substrato orgânico. Fonte: Rossin (2020).

Conforme Wood et al. (2006), diversas substâncias podem ser conhecidas como fotossensibilizantes, como corantes, drogas e compostos naturais, porém, os mais utilizados são: azul de metileno, verde de malaquita, cristal violeta, fitolacianinas, hematoporfirinas e protoporfirina.

Um recurso que poderia fazer da aplicação do TFD um método menos caro é o uso de um fotossensibilizador de baixo custo e facilmente obtido, como a curcumina.

Pereira et al. (2021) realizaram um estudo no qual avaliaram as concentrações de curcumina de 7,8 a 15,6 associada à irradiação de LED azul ($\lambda = 450 \pm 5 \text{ nm}$), com uma dose de luz de 10 J/cm^2 no qual conseguiram inativar células do sistema imune (macrófagos) infectadas com *Leishmania braziliensis*.

A curcumina (CUR) é um composto fenólico de origem natural, extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* usada como tempero na tradicional culinária asiática e na medicina chinesa, onde já foram comprovadas diversas outras propriedades farmacológicas, como anti-inflamatórias, antiparasitários, antifúngicas, antibacterianas e (Sharma et al., 1999; Priyadarsini et al., 2009).

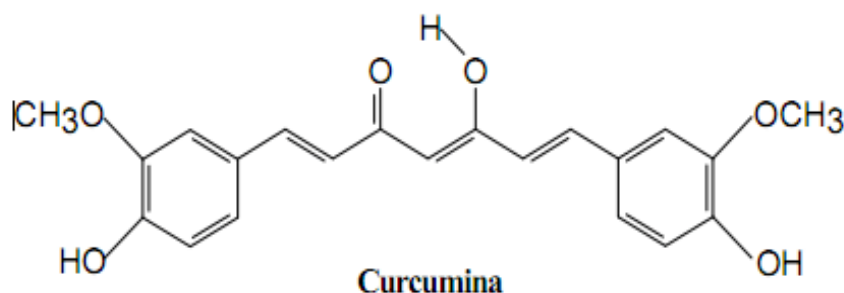


Figura 6. Estrutura da curcumina Fonte: Oliveira (2021).

Rasmussen et al. (2000) realizaram um estudo avaliando a eficácia de um extrato etanólico de *Curcuma longa* contra *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major*, que inibiu o desenvolvimento *in vitro* dos parasitas.

Changtam et al. (2010) investigaram a atividade antiparasitária de curcuminoides contra espécies de *leishmania* e formas de protozoário tripanosoma.

No entanto, os estudos que tem em foco as propriedades antiparasitárias da curcumina ainda são escassos. Neste contexto, torna-se necessário avaliar o potencial da curcumina sintética junto a TFD para o controle parasitário do *Rhipicephalus microplus*.

3. Material e Métodos

3.1 Local e condições do experimento

Os testes *in vitro* do protótipo à Laser e a primeira etapa das análises da terapia fotodinâmica foram realizados no Laboratório de Parasitologia Veterinária pertencente à Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, São Carlos-SP. A segunda etapa da terapia fotodinâmica foi avaliada no Centro de pesquisa em Óptica e

fotônica no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Manutenção das colônias de *Rhipicephalus microplus*

Nesta etapa foram utilizados carrapatos *R. microplus* provenientes do Sistema de Leite da Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE). Fêmeas adultas foram colhidas de oito bovinos hospedeiros mantidos sob rigoroso esquema de tratamento acaricida, de forma a evitar resíduos nos parasitas. Elas foram higienizadas, acondicionadas em placas de Petri e incubadas em estufa no Laboratório de Parasitologia Veterinária ($\pm 27^{\circ}\text{C}$; UR > 80%) para realizarem ovipostura. Posteriormente, após 7 dias, a massa de ovos foi pesada e transferida para seringas adaptadas e vedadas para a eclosão das larvas por um período de 21 dias.

Todos os protocolos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa (CEUA-CPPSE nº. 01/2019).

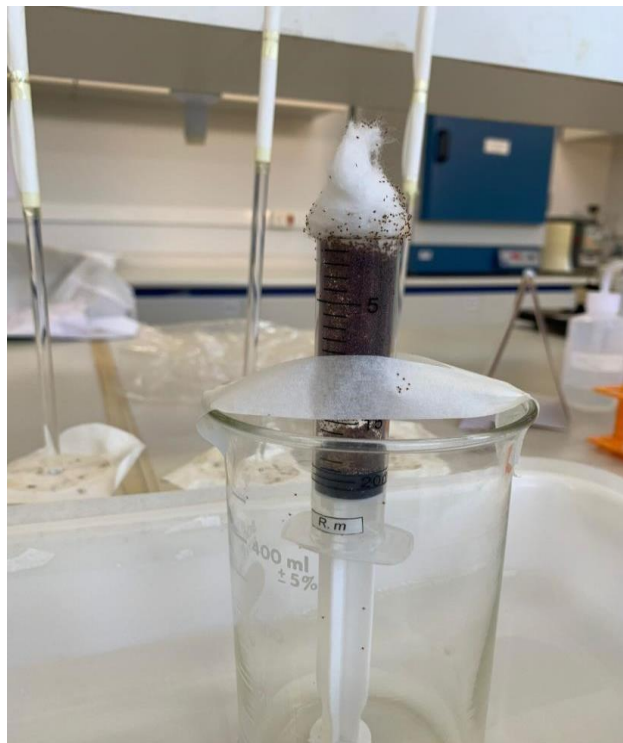


Figura 7. Seringa adaptada com larvas de *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Autor.

3.3 Isolados de plantas

Para o teste de repelência (TR) como controle positivo foi utilizado o extrato aquoso de *Croton sonderianus* proveniente da Embrapa Agroindústria Tropical, posteriormente diluído em álcool etanol 60% para formular a solução estoque em concentração de 20 µg/mL.

Para TFD foi utilizado curcumina sintética fornecido pelo Instituto de Física da USP (IFSC-USP), diluída em 95% álcool etílico e 5% de óleo de coco para formular a solução estoque concentrada em 10 mg/mL, posteriormente levada para ultrassom por 40 minutos para solubilizar.

3.4 Teste de repelência (TR)

O TR foi realizado conforme Chagas e rabelo (2012), com pequenas adequações. Na parte superior de um bastão de vidro foram fixados dois papéis filtro 5 cm x 5 cm, sendo denominados de Zona 1 e Zona 2, em seguida o bastão foi inserido em um suporte de gesso para mantê-lo fixo, no qual utilizamos três bastões por tratamento (grupo).

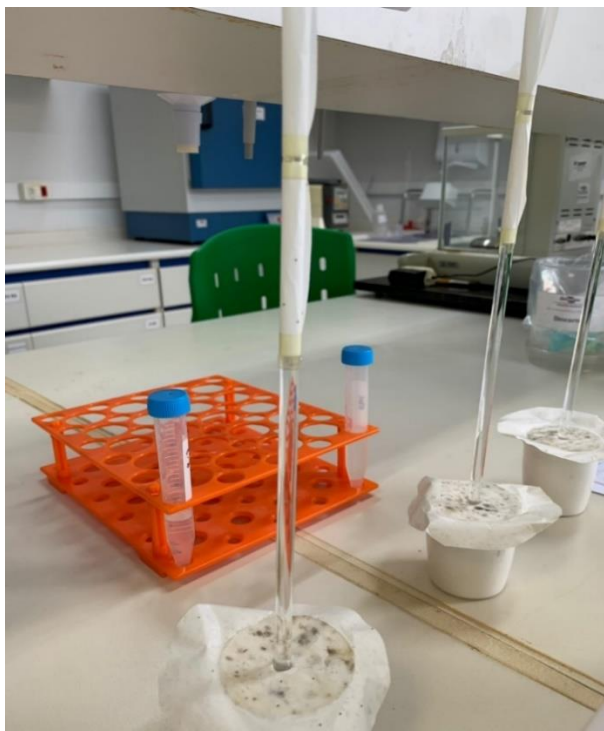


Figura 8. Teste de repelência. Fonte: Autor.

Em ambas as metodologias (laser e TFD) foram realizados 2 grupos controles negativos (H₂O e etanol 60% diluente do controle positivo) e 1 grupo controle positivo utilizando extrato aquoso derivado da planta *Croton sonderianus* em concentração de 20 µg/mL avaliado em pesquisas anteriores que demonstrou um resultado satisfatório referente à % de inibição de migração das larvas infectantes de *Rhipicephalus microplus* acima de 95% de repelência (dados não publicados).

Este último elemento teve como objetivo indicar caso não houvesse % de mortalidade e de migração, se as larvas expostas aos diferentes métodos apresentavam possíveis danos aos órgãos sensoriais, conforme o cálculo:

Repelência = $[(\text{n}^\circ \text{ de larvas no papel não impregnado } \text{Área 2} * 20) / (\text{n}^\circ \text{ larvas no papel não impregnado } \text{Área 2} + \text{n}^\circ \text{ de larvas no papel impregnado } \text{Área 1})]$

Para cada metodologia foram realizadas triplicatas, na qual adicionamos 1 mL das respectivas soluções na Zona 1 (tratamento água, etanol 60% e controle positivo), enquanto adicionamos na Zona 2 as larvas submetidas aos equipamentos.

Após um período de 15 minutos expostas ao teste de repelência as larvas foram quantificadas com o auxílio de uma bomba a vácuo com ponteira (1000 µL) adaptada.

3.5 Metodologia - Protótipo Laser

Para avaliação do protótipo foram adicionadas 20 larvas de *R. microplus* em uma placa de petri, sendo utilizado um suporte de madeira (4,5 cm) como base para a placa, realizamos o contato com o protótipo uma única vez em fundo branco, em seguida realizamos o contato por duas vezes em fundo branco em uma margem de tempo de, aproximadamente, 5 segundos.

Posteriormente repetimos o teste em fundo escuro para observar se a coloração do fundo (escuro ou claro) afetaria na dispersão da luz do laser alterando os resultados obtidos. Ao redor da placa para evitar a saída das larvas foi colada uma fita adesiva dupla face. Em seguida as placas foram expostas ao equipamento Laser para iniciar a varredura.

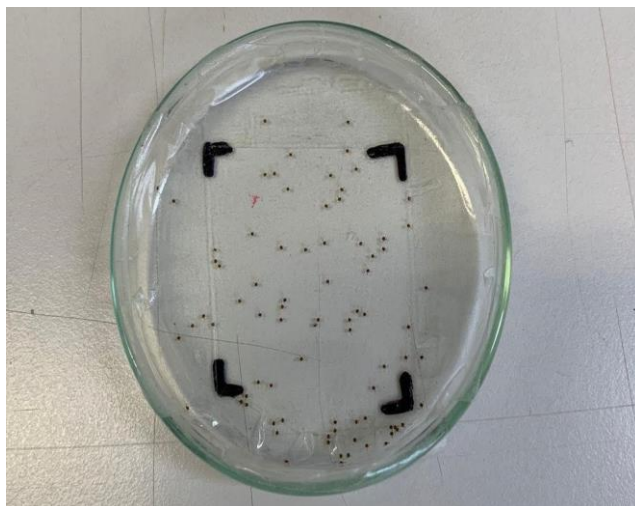


Figura 9. Larvas adicionadas em Placa de Petri. Fonte: Autor.

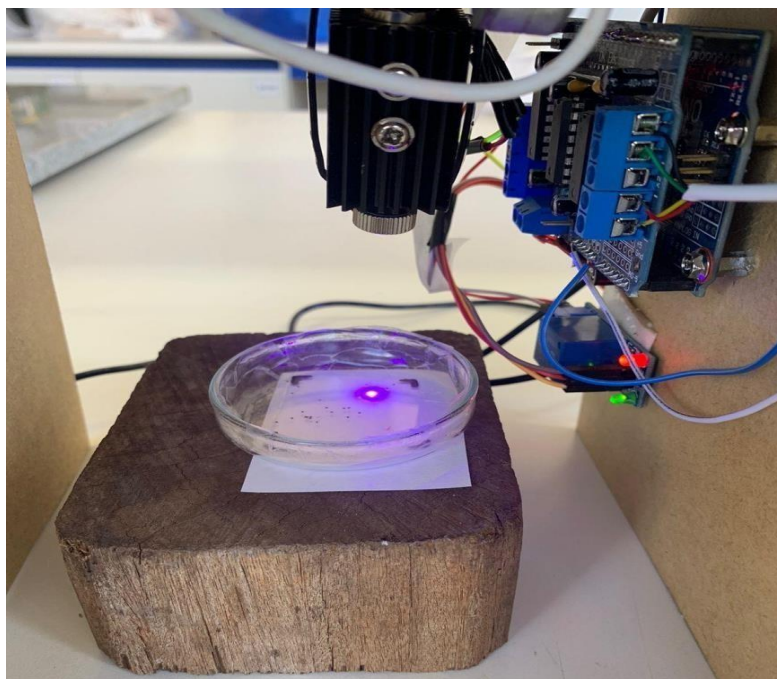


Figura 10. Larvas expostas ao equipamento Laser. Fonte: Autor.

Após serem expostas ao laser, as larvas foram submetidas ao Teste de Repelência para avaliar se houve danificação em suas estruturas sensórias e/ou locomotoras (pernas e órgão de haller) para análise sensorial e de motilidade.

3.6 Metodologia - Terapia Fotodinâmica (TFD)

Em uma placa de cultivo de 24 poços foram adicionadas 200 μL de solução controle (95% H_2O + 5% óleo de coco) para dar densidade a solução e impedir as larvas de se locomoverem para fora da placa.

Em seguida, em outros poços a solução estoque de curcumina foi diluída de forma seriada em 4 diferentes concentrações (base de dois) sendo 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ em volume final de 200 μL por poço.

Após a preparação das soluções foram adicionadas em cada poço aproximadamente 20 larvas de *R. microplus*.

A placa foi levada para a biotable, dispositivo produzido e disponibilizado pelo Instituto de física de São Carlos (IFSC), baseado em leds azuis como fonte de luz com comprimento de onda de 450 nm e taxa de fluência de 40 mW/cm^2 responsável pela ativação da curcumina sintetizada (fotossensibilizador), por um período de 20 minutos.



Figura 11. Dispositivo biotable. Fonte: Autor.

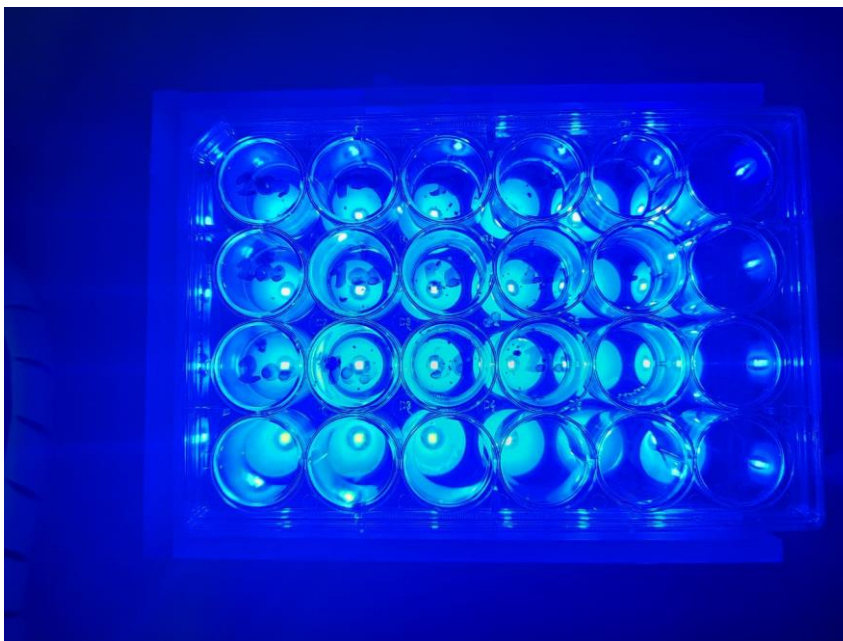


Figura 12. Placa contendo as larvas expostas a biotable. Fonte: Autor.

Após 20 minutos expostas as larvas foram retiradas e levadas para o teste de repelência.

3.7 Análise estatística

Os resultados do teste de repelência foram submetidos a análises de variância (ANOVA) one way seguido pelo teste de Tukey-Kramer, para determinar a % de migração das larvas de *Rhipicephalus microplus*. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2020).

4 Resultados e discussão

4.1 Análise dos resultados

4.1.1 Protótipo laser

Após realizar a quantificação das larvas de *Rhipicephalus microplus* submetidas ao teste de repelência (TR), obtivemos os seguintes resultados:

Tabela 2. % de repelência das larvas submetidas ao equipamento Laser após leitura do TR.

Métodos submetidos	TR (extratos)	% de repelência
Sem laser	Água	2,5± 4,3 ^{Aa}
Sem laser	Etanol 60%	3,2± 3,3 ^{Aa}
Sem laser	<i>Croton sonderianus</i>	98,7± 2,3 ^{Aa}
Laser 1x em Fundo Branco	Água	95,4± 4,8 ^{Ba}
Laser 1x em Fundo Branco	Etanol 60%	96,2± 3,9 ^{Ba}
Laser 1x em Fundo Branco	<i>Croton sonderianus</i>	100 ± 0,0 ^{Ba}
Laser 2x em Fundo Branco	Água	96,3± 6,4 ^{Ba}
Laser 2x em Fundo Branco	Etanol 60%	95,4± 5,7 ^{Ba}
Laser 2x em Fundo Branco	<i>Croton sonderianus</i>	98,3± 2,9 ^{Ba}
Laser 1x em Fundo Escuro	Água	94,9± 4,5 ^{Bb}
Laser 1x em Fundo Escuro	Etanol 60%	93,5± 5,4 ^{Bb}
Laser 1x em Fundo Escuro	<i>Croton sonderianus</i>	98,5± 2,6 ^{Bb}
Laser 2x em Fundo Escuro	Água	97,1± 2,6 ^{Bb}
Laser 2x em Fundo Escuro	Etanol 60%	94,3± 4,7 ^{Bb}
Laser 2x em Fundo Escuro	<i>Croton sonderianus</i>	98,2± 3,0 ^{Bb}

Letras maiúsculas comparam os tratamentos (sem/com laser) e letras minúsculas comparam os diferentes fundos (branco/escuro)

Fonte: Autor.

As larvas expostas ao laser perderam sua viabilidade de locomoção quando foram submetidas ao TR ($P \leq 0,001$), porém, não apresentaram mortalidade, observando-se que estas realizaram a migração para a região da zona 1 de acordo com o seu comportamento no estágio infectante (geotropismo negativo). Com isso, foi demonstrado que a exposição ao laser de baixa intensidade inibiu significativamente a motilidade das larvas de *R. microplus*, por outro lado, a incapacidade de locomoção das larvas (após exposição ao laser) impediu que o dano sensorial fosse avaliado.

O uso da radiação laser representa uma metodologia promissora no controle de pragas agrícolas e médicas emitindo luz a partir da estimulação da radiação (Keller et al., 2016). A utilização de controle físico para insetos é comum, sendo iniciado por Hunter (1912) no qual utilizou raio-x em *Sitophilus oryzae*, porém, não obteve resultados satisfatórios devido à baixa energia utilizada em seu trabalho. Muller (1927) avaliou radiações ionizantes em moscas *Drosophila melanogaster*, com efeitos apenas na esterilidade dos exemplares avaliados. Semelhante ao estudo anteriormente citado, a avaliação do nosso protótipo laser em larvas de *Rhipicephalus microplus* não apresentando % de mortalidade significativa, no entanto observou-se certa dificuldade na locomoção das larvas ao realizar o teste de repelência nestas larvas. Wilde (1965) ao avaliar pulsos de laser em larvas de *Dermestidae spp* e *Trogoderma versicolor*, observaram que as larvas perderam a capacidade de locomoção, semelhante aos resultados apresentados.

Analisando os seguintes resultados, foi possível observar que as larvas não expostas ao laser nos grupos controle negativos (água e etanol 60%) realizaram a migração para a região da zona 1 de acordo com o seu comportamento no estágio infectante apresentando repelência de 2,5% e 3,2%.

Após o contato com o protótipo uma única vez as larvas apresentaram um aspecto de imobilidade em ambos os fundos (branco e escuro). As larvas do grupo controle negativo apresentaram uma repelência de 95,4% e 96,2% em fundo branco e 94,9% e 93,5% em fundo escuro, visto que ao serem levadas para o teste de repelência as larvas permaneceram na Zona 2, local na qual foram depositadas. Trabalhos anteriores realizados por Hori (2014) demonstraram que a exposição a luz azul de baixa potência, durante várias horas ao longo de dias, pode incapacitar a motilidade de mosquitos e moscas-da-fruta. Quando comparadas ao grupo controle

sem laser, nota-se que após o contato com o laser em ambos os grupos (controles negativos e positivo) as larvas apresentaram danos a suas estruturas locomotoras (pernas), perdendo a capacidade de realizar a migração, não apresentando força locomotora para migrar da Zona 2 para a Zona1.

Devido as larvas apresentarem redução na locomoção, porém, ainda estarem vivas, foi realizado uma varredura a laser por 2 vezes, para avaliar a taxa de mortalidade das larvas. Nota-se que os resultados foram semelhantes tanto ao aplicar o laser uma vez quanto aplicação por duas vezes, não apresentando diferença estatística. Não houve mortalidade em nenhuma aplicação, todas as larvas permaneceram vivas, e novamente em ambos os grupos controles negativos e controle positivo as larvas apresentaram dificuldade de locomoção apresentando uma porcentagem de repelência de 96,3% e 95,4% em fundo branco e 97,1% e 94,3% em fundo escuro.

Em estudos realizados por Bakri et al. (2005a) os quais avaliaram doses de radiação como estratégia de controle de carrapatos, no qual as temperaturas não eram altas o suficiente para afetar a sobrevivência dos artrópodes avaliados, afirmam que a luz oriunda de LED (diodo emissor de luz) não possui potencial para causar mortalidade.

Apesar de não ser o mote principal desse trabalho e ter sido utilizado apenas para confirmação da eficácia e viabilidade do teste de repelência, o composto utilizado no grupo controle positivo, extrato aquoso de *Croton sonderianus*, também repeliu as larvas avaliadas, as quais permaneceram na Zona 2, apresentando uma repelência de 98,7%; neste caso, diferentemente do laser, não houve inibição da motilidade larvar. Estudos reportados na literatura para os óleos essenciais das folhas de *Croton sonderianus*, mostram que eles são constituídos por sesquiterpenos e apresentam atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e atividade fungicida contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Polyporus sanguineus* (SILVA et al., 2017).

De acordo com Enan (2001), qualquer que seja o modo de ação específico dos óleos essenciais e dos seus constituintes, eles desempenham um papel importante na eficácia, por maximizarem a penetração dos bioativos através da cutícula dos artrópodes.

Através dos resultados obtidos podemos afirmar que o laser apresenta potencial para incapacitar as estruturas locomotoras (pernas). Porém, as relações entre artrópodes e a tolerância ao laser de baixa potência requerem investigação mais aprofundada, a fim de utilizar a irradiação da luz azul para o controle de pragas. Conforme Araújo (2017) a irradiação de luz azul pode ser útil para controlar várias pragas de insetos. No entanto, como os comprimentos de onda efetivos da luz azul são específicos da espécie, vários comprimentos de onda (ou luz azul de amplo espectro) são necessários para o controle simultâneo de múltiplas espécies.

A capacidade sensorial dessas larvas (repelência ou não para o G-CPR) não pode ser avaliada, pois seria necessário um estudo microscópico sobre os danos fisiológicos causados pelo raio laser sobre as estruturas das larvas (órgão de Haller), uma vez que a inibição da motilidade larvar inviabilizou a realização adequada do teste de repelência. Segundo Klompen and Oliver (1993) o órgão de Haller inclui um grande conjunto de tipos diferentes de sensores quimiorreceptivos em diferentes espécies de carrapatos, sendo um importante órgão alvo para futuras avaliações do efeito da utilização do laser de baixa potência para o controle de carrapatos em animais de produção. O que nos indica a necessidade de mais estudos morfológicos e fisiológicos ampliando a área de conhecimento sobre o controle físico em carrapatos de interesse veterinário.

Quando comparados aos vertebrados, os invertebrados têm sido pouco estudados no campo da radiobiologia ou laserterapia. O que tem sido pesquisado concentra-se principalmente em métodos de esterilização e erradicação de algumas espécies de pragas através da técnica do inseto estéril (Alphey, 2002; Dyck et al., 2021; Argilés-Herrero et al., 2023). Este trabalho pela primeira vez no Brasil visou, portanto, expandir os impactos da exposição ao laser em espécies menos estudadas como os carrapatos, bem como elucidar os efeitos em parâmetros mais sutis que podem ser relevantes para o controle de estes ectoparasitas no ambiente.

Uma consideração adicional para o controle de carrapato é o custo do método em relação aos custos das doenças que estes ectoparasitas transmitem. A perda econômica mundial devido a doenças transmitidas por carrapatos, infestações por carrapatos, juntamente com os custos de vacinação e tratamento acaricida, é estimada em bilhões de dólares anualmente (Jongejan e Uilenberg, 2004). Seguindo ao encontro dos estudos para o controle físico de insetos e ácaros

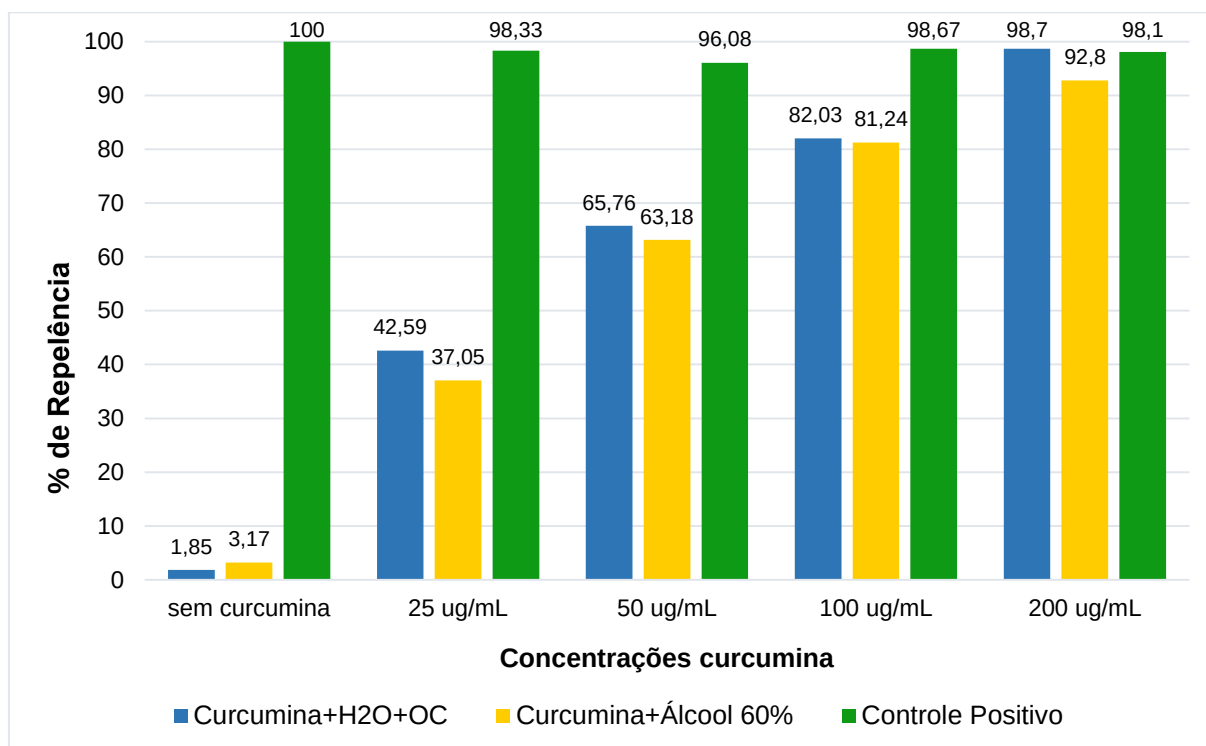
vetores de doenças existe uma forte resistência pública à disseminação generalizada de acaricidas no ambiente natural e, em muitas áreas, regulamentos locais e/ou regionais impedem tal utilização. Em contraste, o tratamento com laser, uma vez implementado, exigirá apenas visitas breves nos estabelecimentos, sendo limitado ao período de atividade sazonal do carrapato, mas principalmente com a premissa fundamental de não deixar resíduos tóxicos no ambiente.

O setor de pecuária brasileira cria e utiliza em torno de 212 milhões de bovinos, sendo o segundo maior rebanho bovino do mundo, contudo, a produtividade da pecuária é reduzida por prejuízos causados pelo carrapato. Como principal inferência desse trabalho, vislumbramos que este método de controle físico de carrapatos pode reduzir significativamente o estabelecimento das larvas nos bovinos, uma vez que perdem sua motilidade, potencializando os procedimentos de controle integrado destes ectoparasitas. Neste caso, deve ser desenvolvida uma nova metodologia ou prática agropecuária que vise o controle de formas imaturas dos carrapatos ainda no ambiente. A utilização em animais também possui potencial de uso, pois poderá inibir a fixação das larvas que estiverem se locomovendo no hospedeiro, mas neste caso, apesar do cálculo da potência do laser utilizado teoricamente não ser capaz de afetar a pele dos animais, mais estudos de danos à pele dos bovinos serão realizados em experimentos futuros.

4.1.2 Terapia Fotodinâmica

Após o período de 20 minutos expostas em biotable, as larvas foram levadas para o teste de repelência para avaliação da % de motilidade e em seguida foram quantificadas com o auxílio de uma bomba a vácuo.

Gráfico 1. Resultados obtidos no TR após quantificação das larvas submetidas à TFD



Fonte: Autor.

Após análise dos dados é possível observar que no grupo controle água nas concentrações de 0, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, o aumento da porcentagem de repelência foi de 1,85%, 42,59%, 65,76%, 82,03% e 98,7%, já no grupo controle etanol 60% foi de 3,17%, 37,05%, 63,18%, 81,24% e 92,80% respectivamente. Quando comparadas é possível observar que houve um aumento contínuo na porcentagem de repelência conforme o aumento das concentrações da curcumina. No grupo controle positivo a porcentagem de repelência manteve um valor significativo acima de 96%.

Após quantificação das larvas, os resultados foram avaliados com auxílio de programa estatístico para análise do diferencial, como apresentado na tabela 11.

Tabela 11. Resultados estatísticos obtidos – TFD após quantificação das larvas

Concentrações	Controle água	Controle etanol	Controle positivo
Sem curcumina	01,85 ± 3,2 ^{Aa}	03,17 ± 3,1 ^{Aa}	100 ± 0,00 ^{Aa}
25 µg/mL	42,59 ± 1,5 ^{Aa}	37,05 ± 2,6 ^{Aa}	98,33 ± 2,8 ^{Ab}
50 µg/mL	65,76 ± 0,7 ^{Aa}	63,18 ± 4,5 ^{Aa}	96,08 ± 6,7 ^{Ab}
100 µg/mL	82,03 ± 3,9 ^{Aa}	81,24 ± 2,6 ^{Aa}	98,67 ± 2,3 ^{Ab}
200 µg/mL	98,70 ± 1,4 ^{Ab}	92,80 ± 1,3 ^{Ab}	98,10 ± 2,7 ^{Ab}

* (Letras maiúsculas comparam os valores médios da coluna (diferentes concentrações) e letras minúsculas comparam os valores médios nas linhas). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo ANOVA e teste de Tukey ($p \geq 0.05$).

Após o período de 20 minutos na biotable com a curcumina em concentração de 25 µg/mL nos grupos de controle negativo (água e etanol 60%) houve repelência de 42,6% e 37% respectivamente, enquanto o grupo positivo manteve uma repelência significativa de 98,3%.

Em concentração de 50 µg /mL, nota-se que a porcentagem de repelência dos controles negativos aumentou para 65,8% e 63,2%, e no controle positivo as larvas apresentaram 96,1% de repelência.

A partir da concentração de 100 µg/mL a porcentagem de repelência dos controles negativos foi para 82,0% e 81,2%, enquanto o controle positivo repeliu 98,7%.

Nota-se que na concentração de 200 µg/mL a % de repelência nos grupos controles negativos passou a ser de 98,7% em água e 92,8% em álcool 60%. No grupo de controle positivo houve repelência de 98,1%.

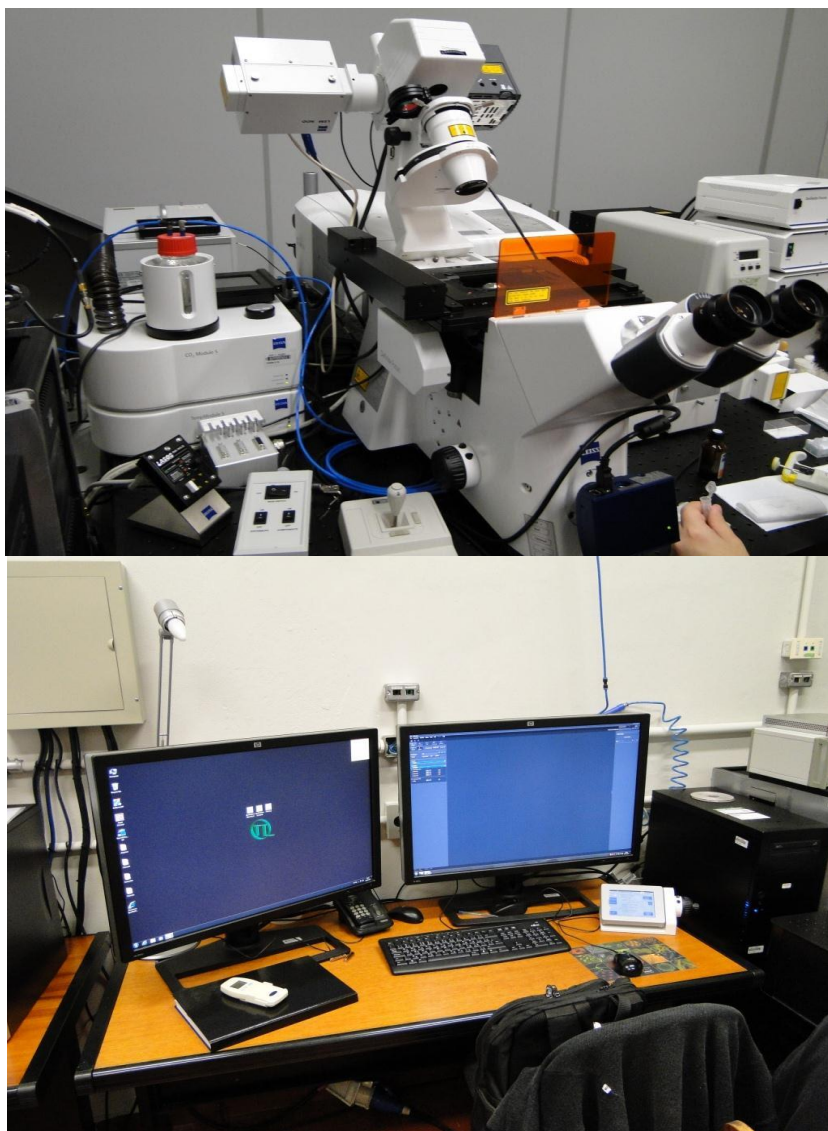
Com isso é possível afirmar que com o aumento da concentração do fotossensibilizador (curcumina) após sua ativação as larvas apresentaram danos a sua estrutura locomotora, perdendo a capacidade de locomoção, o que afeta diretamente seu comportamento, visto a falta de potencial para migrar da Zona 2 para a Zona 1.

Com base nos dados, podemos afirmar que depois de submetidas à TFD, as larvas perderam a capacidade de locomoção, com isso, não foi possível avaliar se houve danos às estruturas sensoriais, visto que no controle positivo não houve variância, sendo necessários novos estudos fisiológicos.

4.1.3 Análise de imagem - microscopia confocal

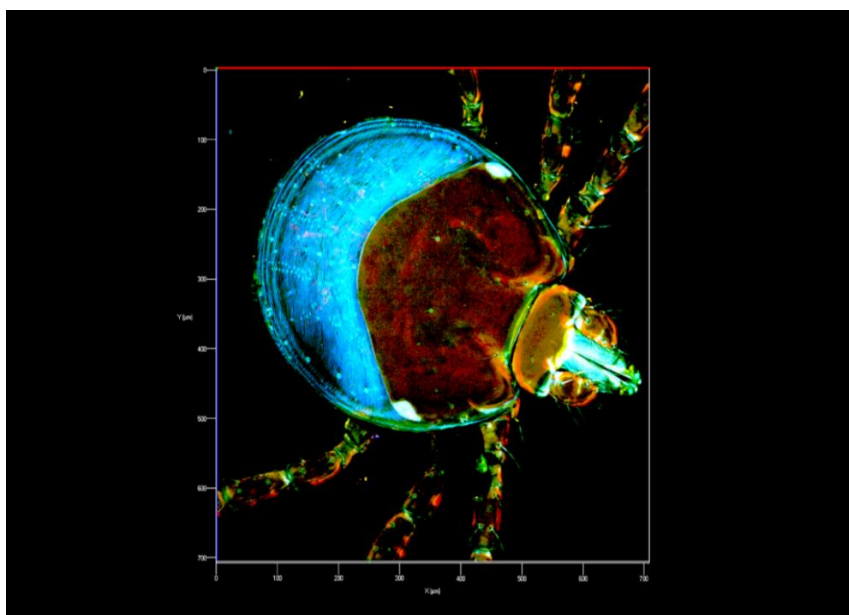
A terapia fotodinâmica envolve a administração do fitoterápico fotossensibilizante junto a sua ativação pela luz, no qual corresponde ao espectro de absorção do fotossensibilizador. Com isto, depois de quantificadas, as larvas foram selecionadas de forma aleatória e levadas para análise confocal para formular imagens, com o intuito de verificar quais estruturas tiveram contato direto com a curcumina.

Imagem 1. Microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) pertencente ao IFSC – São Carlos.



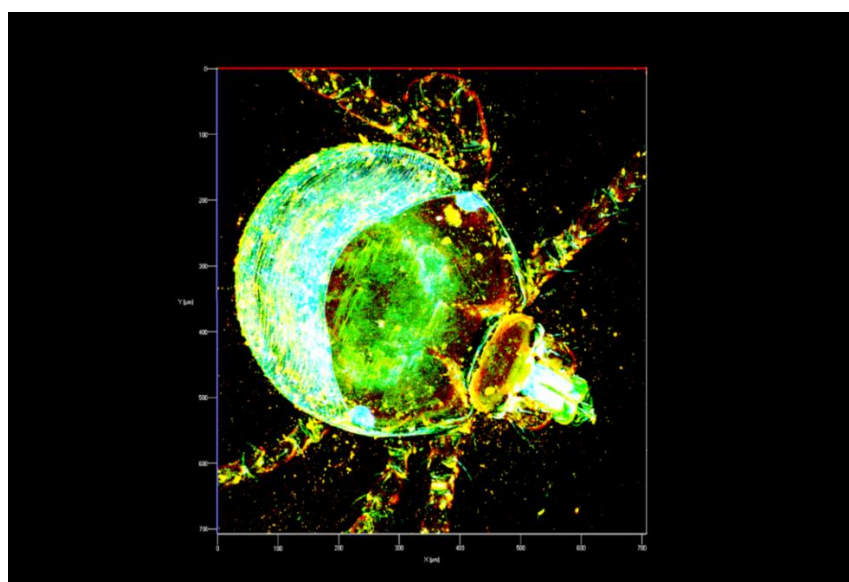
Fonte: Autor.

Imagem 2. Larva de *Rhipicephalus microplus* sem contato com a curcumina.



Fonte: Autor.

Imagem 3. Larva de *Rhipicephalus microplus* em contato com a curcumina em 100 µg/mL



Fonte: Autor.

Após ativação do fotossensibilizador (curcumina) é possível observar que ocorre a liberação do oxigênio singlete, espécie eletronicamente excitada do oxigênio molecular (O_2) que afeta estruturas teciduais.

Com a formulação das imagens é possível notar que o fotossensibilizador (coloração fluorescente) permanece presente na superfície externa, interagindo com diversas estruturas das larvas como na região do escudo, nos festões, no capitulo (palpo e hipostômio) e nas estruturas locomotoras (patas).

Conclusão

O presente estudo evidenciou que o controle físico possui potencial para o desenvolvimento de novas metodologias que visam à inibição do desenvolvimento de formas imaturas do parasita *Rhipicephalus microplus*.

Considerações Finais

Em ambas as metodologias constatou-se que os tratamentos avaliados foram capazes de diminuir significativamente a motilidade das formas imaturas, rompendo o ciclo de vida parasitário, visto que as larvas precisam se locomover da pastagem para o hospedeiro, e mesmo sobre o hospedeiro definitivo, precisam se locomover para que ocorra sua implantação e o seu desenvolvimento para os diferentes estágios até a forma adulta e subsequente reprodução, acarretando nova contaminação das pastagens.

Tais resultados demonstram que métodos alternativos com base no controle físico podem contribuir com novos estudos envolvendo ectoparasitas de interesse veterinário, promovendo um controle seguro que reduz a utilização de acaricidas químicos dando espaço para tratamentos não químicos que geram menos resíduos nos produtos de origem animal e ao ambiente.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus Jaboticabal, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Pecuária Sudeste, ao Instituto de Física de São Carlos – IFSC, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (código financeiro 001) - (Processo nº 88887.659643/2021-00).

Referências

Agnolin CA, Olivo CJ, Leal MLR, Beck RCR, Meinerz GR, Parra CLC, Machado PR, Foletto V, Bem CM, Nicolodi PRSJ (2010) Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** 12:482-487.

Aguiar JPSA (2020) Produção e caracterização de enzimas quitinolíticas produzidas pelo fungo *Trichoderma asperellum* e sua aplicação no biocontrole do carrapato *Rhipicephalus microplus* e do inseto *Aedes aegypti*. 65 f (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás

Aguierre AAR, Lobo FP, Cunha RC, Garcia MV, Andreotti R (2016) Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. **Veterinary Parasitology** 221:30-38.

Alphey L (2002) Re-engineering the sterile insect technique. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32:1243-1247.

Andreotti R (2010) **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 36 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/871264>.

Araujo AC, Silveira JA, Azevedo SS, Nieri-Bastos FA, Ribeiro MF, Labruna MB, Horta MC (2015) Infecção por *Babesia canis vogeli* em cães e carrapatos de uma região semiárida de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35:456-461.

Araujo MM, Spencer PJ (2017) Técnica do inseto estéril: Uma ferramenta no manejo integrado de pragas. **Biológico**, 79: 01-07.

Argilés-Herrero R, Salvador-Herranz G, Parker AG (2023) Near-infrared imaging for automated tsetse pupae sex sorting in support of the sterile insect technique. **Parasite** 30:17-17.

Bakri A, Heather N, Hendrichs J, Ferris I (2005a) Fifty years of radiation biology in entomology: lessons learned from IDIDAS. **Annals of the Entomological Society of America**, 98:1-12.

Baumhover AH, Graham AJ, Bitter BA, Hopkins DE, New WD, Dudley FH, Bushland RC (1995) Screw-worm control through release of sterilized flies. **Journal of Economic Entomology** 48:462-466.

Bolen PM (2016) **Method and apparatus for laser mosquito control**. U.S. Patent n. 9,374,990.

Catto JB, Andreotti R, Koller WW (2010) **Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi**. Campo Grande: Embrapa CNPGC, 6 p. (Comunicado Técnico, 123).

Chagas ACS (2008) Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, **Anais...** Curitiba: CBPV, 13 p.

Chagas ACS, Rabelo MD (2012) **Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: revisão e recomendações**. São Carlos: CPPSE, 27 p. (EmbrapaCPPSE. Documento Técnico, 106).

Changtam C, Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamrarn A (2010) Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. **European Journal of Medicinal Chemistry** 45:941–956.

Corrêa RR, Lopes WDZ, Teixeira WFP, Cruz BC, Gomes LVC, Felippelli G, Maciel WG, Fávero FC, Buzzulini C, Bichuette MA, Soares VE, Da Costa AJ (2015) A comparison of three different methodologies for evaluating *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* susceptibility to topical spray compounds. **Veterinary Parasitology** 207:115-124.

Cruz BC, Lopes WD, Maciel WG, Felippelli G, Fávero FC, Teixeira WF, Carvalho RS, Ruivo MA, Colli MH, Sakamoto CA, Da Costa AJ, De Oliveira GP (2015) Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. **Veterinary Parasitology** 207:309-317.

Dantas-Torres (1806) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control, **Veterinary Parasitology** 152: 173-185.

Demarest S, Conway S, Walter S, Abbondanzio M, Robling D, Ananth G (2007) **Combination Light Device with Insect Control Ingredient Emission**. U.S. Patent Application n. 11/620,966

Drummond RO, Medley JG, Graham OH (1966) Engorgement and Reproduction of Lone Star Ticks (*Amblyomma Americanum* (L.)) Treated with Gamma-radiation. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, **Chemistry and Medicine** 10:183– 188.

Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (2021) **Sterile Insect Technique**. 2nd ed. CRC Press.

Enan E (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 130:325–337

Estrada-Peña, A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 1, p. 53-65, 2015.

Faza AP, Pinto ISB, Fonseca I, Antunes GR, Monteiro CMO, Daemon E, Muniz MS, Martins MF, Furlong J, Prata MCA (2013) A new approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the state of Minas Gerais, Brazil. **Experimental Parasitology** 134:519-523.

Fernandes NLM, Socol VT, Pinto SB, Minozzo JC, Oliveira CAL (2007) Resposta imunehumoral e celular em bovinos da raça Nelore imunizados com extrato de larvas (L2 e L3) de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **Ciência Rural** 37:789-795.

Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Alonso-Morales RA, Lezama-Gutiérrez L, Rodríguez-Rodríguez JC, Cervantes-Chávez JA (2017) Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology** 31:36-43.

Figueiredo A, Fantatto RR, Agnolon IC, Lopes LG, Oliveira PRD, Mathias MIC, Alves TC, Junior WB, Chagas ACS (2018) *In vivo* study of a homeopathic medicine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in dairy cow. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 28:207- 213.

Figueiredo A, Nascimento LM, Lopes LG, Giglioti R, Albuquerque RDGG, Santos MG, Falcão DQ, Nogueira JAP, Rocha L, Chagas ACS (2018) First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 252:131-136.

Fortes E (2004) Parasitologia Veterinária 4ª ed. **Rev. e ampl.** - São Paulo: Icone. 607p.

Freitas DRJ, Pohl PC, Da Silva VJ (2005) Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae** 33:109-117.

Furlong J (2005) **Carrapatos: Problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 65 p. (Documento Técnico).

Furlong, J, Evans D (1991) **Epidemiologia do carrapato *Boophilus microplus* no Brasil: Necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico**. In: 7º Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária e 2º Simpósio sobre Mosca-dos-Chifres *Haematobia irritans*, São Paulo. Anais. São Paulo, 48-50.

Furtado FN, Silva VAR, Pereira JRG, Kisue A, Coêlho FAZ, Coêlho MDG (2013) Avaliação *in vitro* do potencial acaricida do óleo essencial de *Tagetes minuta* frente à *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Biociências** 19:104- 110.

Garcia MV, Rodrigues VS, Koller WW, Andreotti R (2019) Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 1: 18-27.

Gomes CCG (1998) **O carrapato-do-boi e o manejo da resistência aos carrapaticidas**. CPPSUL (Embrapa Pecuária Sul, Comunicado Técnico, 70) 5 p.

Gonzales JC (1995) **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor. 235 p.

González J, Valcárcel F, Pérez-Sánchez JL, Tercero-Jaime JM, Cutuli MT, Olmeda AS (2016) Control of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) ticks infesting *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae) using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hyocreales: Clavicipitaceae) in field conditions. **Journal of Medical Entomology** 53:1396–1402.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Perez De León AA, Pereira JB, Villela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23:150- 156

Guglielmone AA, Gimeno E, Idiart J, Fisher WF, Volpogni MM, Quaino O, Anziani OS, Flores SG, Warnke O (1999) Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. **Medical and Veterinary Entomology** 13:324-329.

Herrera IEG (2006) **Determinar la efectividad del nosodes homeopático en el control del *Dermatobia hominis* (tórso) en la unidad de producción Balcar en el departamento de Esteli**. Tese (Dourado em Medicina Veterinária) - Universidad Nacional Agraria, UNA, Managua, Nicaragua.

Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R (2015) Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicine chemistry** 5: 326-333.

Hori M, Shibuya K, Saito Y (2014) Lethal effects of short-wavelength visible light on insects. **Sci. Rep.** 4,7383.

Hunetr WD (1912) Results of experiments to determine the effects of Roentgen rays upon insects. **Journal of Economic Entomology**. 5:188-193.

Issa MCA, Manuela-Azuley (2010) Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **An. Bras. Dermatol** 85 (4).

Jongejan F, Uilenberg G (2004) The Global Importance of Ticks. **Parasitology** 129: 3-14.

Keller MD, Leahy DJ, Norton BJ, Mullen ER, Marvit M, Makagon A (2016) Laser induced mortality of *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Scientific Reports** 6:29-36.

Klafke GM, Sabatini GA, Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TS (2006). Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from estate of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology** 142:386-390.

Klompen JSH and James HO (1993) "Haller's Organ in the Tick Family Argasidae (Acari: Parasitiformes: Ixodida)" **The Journal of Parasitology** 4:591–603.

Langeloh A (2010) Carrapaticidas, seus resíduos e a saúde do consumidor. **Revista CFMV-DF** XVI:59-61.

Lopes Wdz, Teixeira WFP, Matos LVS, Felippelli G, Cruz BC, Maciel WG, Buzzulini C, Fávero FC, Soares VE, Oliveira GP, Costa AJ (2013) Effects of macrocyclic lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. **Experimental Parasitology** 135:72-78.

López-Sánchez J, Cruz-Vázquez C, Lezama-Gutiérrez R, Ramos-Parra M (2012) Efeito de fungos entomopatogênicos em adultos de *Stomoxys calcitrans* e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Biocontrol science and technology** 22:969-973.

Machado AEH (2000) terapia fotodinâmica: Principios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova** 23(2).

Maruyama SR, Garcia GR, Teixeira FR, Brandão LG, Anderson JM, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Horackova J, Veríssimo CJ, Katiki LM, Banin TM, Zangirolamo AF, Gardinassi LG, Ferreira BR, Miranda-Santos IKF (2017) Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. **Parasites & Vectors** 10:2-16.

Mkolo MN, Magano SR (2007) Repellent effects of the essential oil of *Lavendula angustifolia* against adults of *Hyalomma marginatum rufipes*. **Vet. Ver** 149-152

Monteiro CM, Maturano R, Daemon E, et al. (2012) Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitol. Res.** 111:1295–1300.

Muller HJ (1927) Artificial transmutation of the gene. **Science**. 66:84-87.

Murrell A, Barker, SC (2003) Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) **Systematic Parasitology** 56:169-172.

Oliveira DETB, Bezerra LAB, Oliveira RJ, Moraes VB, Silda JAB, Filho JRF, Ramos CS (2021) Curcumina como indicador natural de pH: uma abordagem teórica-experimental para o ensino de química. **Quim. Nova**. 44:217-223.

Oliver JH, Osburn RL, Roberts JR (1972) Cytogenetics of Ticks (Acari: Ixodoidea) 9. Chromosomes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) and Effects of Gamma Radiation on Spermatogenesis. **The Journal of Parasitology** 58:824-827.

Pereira AHC, Macolino LMC, Pinto JG, Strixino JF (2021) Avaliação da Terapia Fotodinâmica com curcumina em Amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major*. **Antibióticos**. 10:1-14.

Pereira MC, Labruna MB (2008) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência, São Paulo: **MedVet**. 15-55.

Pereira CD, Souza GD, Baffi MA (2010) **Carrapato dos bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas**. CPAC (Embrapa Cerrados, Documentos, 278) Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/881513>>.

Pereira JR (2009) The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in the control of *Boophilus microplus*, in artificially infested bovines kept in field conditions. **Veterinary Parasitology** 162:116-119.

Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM (2008) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. São Paulo: **MedVet**. 21-25, 65-90.

Priyadarsini KI (2009) Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C** 10.

R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing [software]. Vienna: R Development Core Team; 2023 [cited 2023 Jan 9]. Available from: <https://www.r-project.org/>

Rasmussen HB, Cristensen SB, Kvist LP, Karazmi A (2000) A Simple and Efficient Separation of the Curcumins, the Antiprotozoal Constituents of *Curcuma longa*. **Planta Med** 66:396-398.

Raynal JT, Silva AAB, Sousa TJ, Bahiense TC, Meyer R, Portela RW (2013) Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22:71-77.

Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'agnol B, Scheffer R, Souza AU, Coraqqssini BV, Vargas R, Dos Santos SJ, Martins JR (2014) First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology** 201:128-136.

Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT (2012) Essential Oils in Insect Control: LowRisk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology** 57:405-424.

Ribeiro JN, Jorge RA, Flores AV, Ronchil LM, Tedesco AC (2007) Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Ecl. Quím.** 32:7-14.

Rossin ARS, Oliveira ÉL, Moraes FAP, Júnior RCS, Scheidt DT, Caetano W, Hioka N, Dragunski DC (2020) Terapia fotodinâmica em eletrofiação: revisão de técnicas e aplicações. **Quim. Nova**. 43:613-622.

Schulein J (1975) **Electronic pest-control device having plural ultrasonic generators**. U.S. Patent n. 3, 893,106.

Sharman WM, Allen CM, van Lier JE (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discov. Today** 4:507-517.

Silva NL, Moletta JL, Minho AP, Filippsen LF (2007) Uso de isoterápico no controle da infestação natural por *Boophilus microplus* em bovinos. **Arquivos da Associação Médico Veterinária Homeopatia Brasileira**, 37:1495-1497.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL (3 Ed) (2007) **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 576-577.

Ueno TEH, Mendes EEB, Pomaro SHK, Lima CKP, Guilloux AGA, Mendes MC (2012) Sensitivity profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks of dairy cattle to acaricides in small farms in the northwestern São Paulo State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico** 79:177-183.

Valente PP, Moreira GHFA, Serafini MF, Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Faraco AAG, Castilho RO, Ribeiro MFB (2017) *In vivo* efficacy of a biotherapeutic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research** 116:929-938

Veríssimo CJ (2015) Controle de carrapatos nas pastagens. Rev. e ampl. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia 2:106p.

Vincent C, Hallman G, Panneton B, Fleurat-Lessard F (2003) Management of agricultural insects with physical control methods. **Annual Review of Entomology** 48:261–281.

Wang S, Tang J (2001) Radio frequency and microwave alternative treatments for nut insect control: a review. **International Agricultural Engineering Journal**, 10: 105-120.

Wilbanks AD (2000) **Infrared insect/mosquito killing system**. U.S. Patent n. 6,050,025,18.

Wilbanks AD (2010) **Attracting mosquitoes for electrocution and/or trapping**. U.S. Patent n. 7,832,140.

Wijenberg RM, Takács SJ, Lam K, Gries GJ (2017) **Use of electromagnetic fields to affect insect movement**. U.S. Patent Application n. 11/558,994.

Wilde WHA (1965) Laser Effects on Two Insects. **The Canadian Entomologist** 97:88– 92.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C (2006) Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J Antimicrob Chemother** 57:680-684.