

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE**

Potencial acaricida *in vitro* de carvacrol, timol, eugenol e seus derivados acetilados sobre *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

**Tatiane Pinheiro Lopes Novato**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Potencial acaricida *in vitro* de carvacrol, timol, eugenol e seus derivados acetilados sobre *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

**TATIANE PINHEIRO LOPES NOVATO**

*Sob Orientação do Professor*

**João Luiz Horacio Faccini**

*e Coorientação dos Professores*

**Erik Daemon de Souza Pinto<sup>†</sup> Caio Márcio de Oliveira Monteiro**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com  
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

NNov93 5p Novato, Tatiane Pinheiro Lopes , 1980 Potencial acaricida in vitro de carvacrol, timol, eugenol e seus derivados acetilados sobre Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) / Tatiane Pinheiro Lopes Novato. - 2018.  
83 f.

Orientador: João Luiz Horacio Faccini.

Coorientador: Caio Márcio de Oliveira Monteiro.

Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2018.

1. Carrapatos de bovinos. 2. Substâncias de origem vegetal. 3. Derivados acetilados. 4. Desenvolvimento de formulações. I. Faccini, João Luiz Horacio, 1947-, orient. II. Monteiro, Caio Márcio de Oliveira, 1982-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TATIANE PINHEIRO LOPES NOVATO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no  
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APRESENTADA EM: 27/09/2018



---

João Luiz Horacio Faccini. Dr. UFRRJ  
(Orientador)



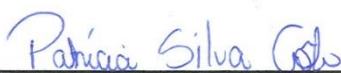
---

Márcia Cristina de Azevedo Prata Dra.  
Embrapa Gado de Leite



---

Rodrigo Luiz Fabri. Dr. UFJF



---

Patrícia Silva Gôlo Dra. UFRRJ



---

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt Dra. UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

O principal agradecimento dedico a Deus, pela minha vida e pela paz nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir.

Ao professor orientador *Dr. João Luiz Horacio Faccini*, sempre disposto a contribuir de forma ímpar para a realização deste objetivo. Agradeço pela convivência e sabedoria partilhadas durante este tempo.

Ao amigo e coorientador Prof. *Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro*, pelos “puxões de orelha” e por sempre me apoiar e incentivar. Obrigada por ser essa pessoa tão generosa e conselheira.

Ao saudoso coorientador Professor *Dr. Erik Daemon*, por todos esses anos de convivência, ensinamentos preciosos.

Ao meu marido *Antônio Carlos de Oliveira Novato* que sempre esteve ao meu lado apoiando minhas escolhas e ao meu filho *Rafael Lopes Novato* por todos os momentos de carinho nas horas que mais precisava.

A meus pais *Maria Campos Pinheiro Lopes* e *Aselmo José Lopes*, irmãos *Ana Caroline Pinheiro Lopes* e *Guilherme Sebastião Pinheiro Lopes*, demais familiares e amigos que sempre me incentivaram e torceram pela minha vitória.

Aos professores membros da banca de qualificação, Profa. *Dra. Mariana Guedes Camargo* e Profa. *Dra. Patrícia Silva Gôlo* pelas sugestões pertinentes que engrandeceram o trabalho.

Aos membros da banca de defesa *Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata*, *Dr. Rodrigo Luiz Fabri*, *Dra. Patrícia Silva Gôlo* e *Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por aceitarem o convite e contribuírem com a avaliação final da tese.

A *Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata* por ser tão generosa e por estar sempre me incentivando.

Ao *Dr. Jonh Furlog* e *Michele* do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFRRJ e Programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal/UFJF, onde cursei disciplinas que contribuíram para minha formação.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, em especial *Arthur*, *Ivan* e *Maurício* pela parceria e ajuda de sempre.

Aos professores *Dr. Mário Geraldo de Carvalho* e *Dr. Geovany Amorim Gomes* e doutoranda *Débora Ramos de Oliveira* por desenvolverem e prepararem os derivados acetilados.

As professoras *Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela* e *Dra. Simone Jaqueline Cardoso*, pelas contribuições no trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Artrópodes Parasitos da UFJF (LAP) *Viviane Zeringóta*, *Ralph Maturano Pinheiro*, *Caio Márcio de Oliveira Monteiro*, *Diego Rodrigues Melo*, *Mariana Oliveira*, *Paula Barroso Cruz*, *Cristiane Teixeira Franco*, *Fernanda Calmon*, *Larissa Xavier*, *Renata Mattos*, *Natália Cunha Muniz*, *Dionis Teixeira de Oliveira*, *Rafael Moreira do Nascimento* e *Lívia Duque* pelo convívio, amizade e parceria nos trabalhos de laboratório. Muito obrigada sempre!!!

À amiga e irmã de coração *Tatiane de Oliveira Souza Senra* pelo seu carinho e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

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

## BIOGRAFIA

**Tatiane Pinheiro Lopes Novato**, filha de Aselmo José Lopes e Maria Campos Pinheiro Lopes, nasceu em 6 de outubro de 1980, na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. cursou ensino fundamental na Escola Municipal Manuel Bandeira e ensino médio na Escola Estadual Francisco Bernadino e Escola Estadual Sebastião Patrus, em Juiz de Fora, Minas Gerais. Em agosto de 2004 ingressou no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, no curso de Ciências Biológicas, com conclusão em dezembro de 2008.

Em março de 2013 foi aprovada no processo seletivo para o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a orientação do Professor Dr. Erik Daemon. Sua dissertação teve como tema “Avaliação da combinação entre timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) e *Demacenter nitens* (Acari: Ixodidae)” e sua defesa ocorreu em outubro de 2014.

No mesmo ano ingressou no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Dr. João Luiz Horacio Faccini e coorientação do Professor Dr. Erik Daemon e do Professor Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro, sendo contemplada com uma bolsa da Capes.

Durante o período de mestrado e doutorado publicou oito artigos sobre o tema da tese.

1. MARCHESINI, PAULA; BARBOSA, ALAN FRANCO ; FRANCO, CRISTIANE ; **NOVATO, TATIANE** ; SANCHES, MIRZA NALESSO GOMES ; DE CARVALHO, MÁRIO GERALDO ; FABRI, RODRIGO LUIZ ; DAEMON, ERIK ; MONTEIRO, CAIO MÁRCIO OLIVEIRA . Activity of the extract of *Acmella oleracea* on immature stages of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae). VETERINARY PARASITOLOGY **JCR**, v. 254, p. 147-150, 2018.
2. **NOVATO, TATIANE**; GOMES, GEOVANY AMORIM ; ZERINGÓTA, VIVIANE ; FRANCO, CRISTIANE TEIXEIRA ; DE OLIVEIRA, DÉBORA RAMOS ; MELO, DIEGO ; DE CARVALHO, MÁRIO GERALDO ; DAEMON, ERIK ; MONTEIRO, CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA . *In vitro* assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). VETERINARY PARASITOLOGY **JCR**, v. 260, p. 1-4, 2018.
3. FERREIRA, F. M. ; DELMONTE, C. C. ; **NOVATO, T. L. P.** ; MONTEIRO, C. M. O. ; DAEMON, E. ; VILELA, F. M. P. ; AMARAL, M. P. H. . Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum* , hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY **JCR**, v. 32, p. 41-47, 2017.
4. ARAÚJO, L. X. ; **NOVATO, T. P. L.** ; ZERINGOTA, V. ; MATURANO, R. ; MELO, D. ; DA SILVA, B. C. ; DAEMON, E. ; DE CARVALHO, M. G. ; MONTEIRO, C. M. O. . Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick and brown dog tick,. Medical and Veterinary Entomology (Print) **JCR**, v. ..., p. ..., 2016.
5. CRUZ, PAULA BARROSO; BARBOSA, ALAN FRANCO; ZERINGÓTA, VIVIANE; MELO, DIEGO; **NOVATO, TATIANE**; FIDELIS, QUELI CRISTINA; FABRI, RODRIGO

LUIZ; DE CARVALHO, MÁRIO GERALDO; OLIVEIRA SABAA-SRUR, ARMANDO UBIRAJARA; DAEMON, ERIK; MONTEIRO, CAIO MÁRCIO OLIVEIRA. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* (Print) **JCR**, v. 228, p. 137-143, 2016.

6. ARAÚJO, LARYSSA XAVIER ; **NOVATO, TATIANE PINHEIRO LOPES** ; ZERINGOTA, VIVIANE ; MATOS, RENATA SILVA ; SENRA, TATIANE OLIVEIRA SOUZA ; MATURANO, RALPH ; PRATA, MÁRCIA CRISTINA AZEVEDO ; DAEMON, ERIK ; MONTEIRO, CAIO MÁRCIO OLIVEIRA . Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. *Parasitology Research* (1987. Print) **JCR**, v. 114, p. 3271-3276, 2015.

7. **NOVATO, T. P. L.**; ARAÚJO, L.X. ; MONTEIRO, C. M. O. ; RALPH MATURANO ; SENRA, T. O. S. ; MATOS, R. S. ; GOMES, G. A. ; CARVALHO, M. G. ; DAEMON, E. . Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. *Veterinary Parasitology* (Online) **JCR**, v. ., p. ., 2015.

8. DA SILVA MATOS, RENATA ; DAEMON, ERIK ; CAMARGO-MATHIAS, MARIA IZABEL ; FURQUIM, KARIM CHRISTINA SCOPINHO ; SAMPIERI, BRUNO RODRIGUES ; REMÉDIO, RAFAEL NEODINI ; ARAÚJO, LARYSSA XAVIER ; **NOVATO, TATIANE PINHEIRO LOPES** . Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. *Parasitology Research* (1987. Internet) **JCR**, v. 113, p. 4555-4565, 2014.

“Se eu vi mais longe, foi por me apoiar em ombro de GIGANTES”  
Isaac Newton



## RESUMO

NOVATO, Tatiane Pinheiro Lopes. **Potencial acaricida *in vitro* de carvacrol, timol, eugenol e seus derivados acetilados sobre *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2018. 96p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Substâncias de origem vegetal tem demonstrado o seu potencial para o controle de carrapatos. Dentre essas substâncias destacam-se os monoterpenos timol e carvacrol e o fenilpropanoide eugenol, que já apresentaram sua eficiência em diferentes espécies de carrapatos, inclusive *Rhipicephalus microplus*, que tem grande importância devido as perdas econômicas para a bovinocultura no Brasil. A combinação destes óleos essenciais, modificação estrutural de moléculas encontradas nos mesmos e o desenvolvimento de formulações, também, tem se mostrado um mecanismo que potencializa o efeito destas substâncias. Entretanto, até o presente momento há poucos relatos na literatura de trabalhos com a modificação estrutural dessas moléculas, associação de óleos essenciais e desenvolvimento de formulações sobre este ixodídeo. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial dos monoterpenos timol e carvacrol e o fenilpropanoide eugenol no controle de *R. microplus*. O estudo foi dividido em 3 capítulos. O primeiro capítulo comparou a atividade do timol, carvacrol e eugenol e os seus respectivos derivados acetilados sobre larvas de *R. microplus*. Timol e carvacrol causaram 100% de mortalidade de larvas a partir da concentração de 2,5 mg/mL e para o acetato de carvacrila a mortalidade alcançou 100% na concentração de 5,0 mg/mL, sendo que o acetato de timila, acetato de eugenila e o eugenol alcançaram a mortalidade de 100% a partir da concentração de 15 mg/mL. O segundo capítulo avaliou o efeito das combinações binárias entre timol, carvacrol e eugenol e posteriormente foi realizado a incorporação dessas associações a uma formulação. As associações de timol + carvacrol, carvacrol + eugenol e timol + eugenol apresentaram efeito aditivo e sinérgico. As combinações binárias incorporadas a formulação apresentaram atividade satisfatória para larvas de *R. microplus*, porém essa formulação não teve eficácia sobre fêmeas ingurgitada de *R. microplus*. O terceiro capítulo avaliou atividade carrapaticida do timol e carvacrol em populações de *R. microplus* com diferentes perfis de sensibilidade a acaricidas sintéticos. Os testes que avaliaram a sensibilidade das populações de *R. microplus* ao timol e carvacrol mostraram pequena variação nos valores da CL<sub>50</sub>, além disso, não foi observado correlação entre a sensibilidade aos compostos vegetais e os compostos químicos. Este foi o primeiro estudo que avaliou a atividade carrapaticida de monoterpenos e fenilpropanoide associados e incorporados a uma formulação. Além disso, foi possível verificar o perfil de sensibilidade de diferentes populações de *R. microplus* aos monoterpenos timol e carvacrol.

**Palavras chave:** acetato, associação, fenilpropanóide, formulações, monoterpenos, *R.microplus*

## ABSTRACT

NOVATO, Tatiane Pinheiro Lopes. 2018. ***In vitro* acaricidal potential of carvacrol, thymol, eugenol and its acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2018, 96p. Thesis (Doctor in Veterinary Science) Instituto de Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Substances of plant origin have shown their potential for tick control. Among these substances, we can highlight the thymol and carvacrol monoterpenes and the phenylpropanoid eugenol, which have already shown their efficiency in different species of ticks, including *Rhipicephalus microplus*, which is of great importance due to economic losses for cattle breeding in Brazil. The combination of these essential oils, structural modification of molecules found in them and the development of formulations, have also been shown to potentiate the effect of these substances. However, to date there are few reports about structural modification of these molecules, association of essential oils and development of formulations for ixodid control. The present study aimed to evaluate the potential of the thymol and carvacrol monoterpenes and the phenylpropanoid eugenol in the control of *R. microplus*. The study was divided into 3 chapters. The first chapter depicted a comparative analysis about the activity of thymol, carvacrol and eugenol and their respective acetylated derivatives on *R. microplus* larvae. Thymol acetate and carvacrol caused 100% mortality of larvae as from the 2.5 mg / mL concentration, carvacrila acetate caused 100% mortality at the concentration of 5.0 mg / mL and eugenol acetate and eugenol caused 100% mortality as from the 15 mg / mL concentration. The second chapter depicted the effect of the binary combinations between thymol, carvacrol and eugenol and later the incorporation of these associations into a formulation was carried out. The associations of thymol + carvacrol, carvacrol + eugenol and thymol + eugenol showed an additive and synergistic effect. The binary combinations incorporated into the formulation showed satisfactory activity for *R. microplus* larvae, but this formulation had no efficacy on *R. microplus* engorged females. This was the first study to evaluate the acaricide activity of monoterpenes and phenylpropanoide associated and incorporated in formulations. The third chapter depicted the tickcide activity of thymol and carvacrol in populations of *R. microplus* with different sensitivity profiles to synthetic acaricides. Tests that evaluated the sensitivity of *R. microplus* populations to thymol and carvacrol showed little variation in the LC<sub>50</sub> values, in addition, no correlation was observed between sensitivity to plant compounds and chemical compounds..

**Key words:** acetate, association, phenylpropanoide, formulations, monoterpenes, *R. microplus*

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Tabela 1. Dados de RMN de protons e carbono 13 (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) dos derivados de carvacrol, timol e eugenol.....27

**Tabela 2.** Mortalidade média de larvas não ingurgitadas *Rhipicephalus microplus*, cepa Porto Alegre, tratadas em diferentes concentrações de carvacrol, timol, eugenol e seus derivados acetilados (acetate de carvacrila, acetate de timila e acetate de eugenila) em condições de laboratório (27 ± 1°C and RH> 80 ± 10%).....30

**Tabela 3.** Concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) do carvacrol, timol e eugenol e seus derivados acetilados (acetato de carvacrila, acetate de timila e acetate de eugenila) sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, cepa Porto Alegre, em condições de laboratório (27±1°C e UR>80±10%).....30

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Veículos presentes no desenvolvimento da fórmula base para a incorporação das substâncias e desenvolvimento das formulações.....45

**Tabela 2.** Classificação do efeito da associação de substâncias de origem vegetal de acordo com os resultados do Índice de Combinação (IC), utilizando o programa CompuSyn® versão 1.0 (CHOU & MARTIN, 2005). Classificação adaptada por Novato et al., (2015).....46

**Tabela 3.** Valores referente a média e desvio padrão do peso das fêmeas antes da postura (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas (mg), percentuais de eclosão larval (%) e percentual de controle (%) de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes concentrações de carvacrol, timol e eugenol, em condições de laboratório (27±1°C e UR 80±10%).....47

**Tabela 4.** Valores referente a média e desvio padrão do peso das fêmeas antes da postura (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas (mg), percentuais de eclosão larval (%) e percentual de controle (%) de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com associação binárias entre carvacrol, timol e eugenol, em diferentes concentrações, em condições de laboratório (27±1°C e UR 80±10%).....49

**Tabela 5.** Efeito de combinações binárias das substâncias carvacrol, timol e eugenol sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em condições de laboratório (27±1°C e UR>80±10%).....51

**Tabela 6.** Percentual de mortalidade (média ± DP) de larvas não ingurgitadas *Rhipicephalus microplus*, tratados com combinações binárias entre timol, carvacrol e eugenol incorporadas a

formulações, em condições de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} > 80 \pm 10\%$ ).....52

**Tabela 7.** Valores referente (média  $\pm$  DP) ao peso das fêmeas antes da postura (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas (mg), percentuais de eclosão larval (%) e percentual de controle (%) de *Rhipicephalus microplus*, tratados com combinações binárias entre timol, carvacrol e eugenol incorporadas a formulações, em condições de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} > 80 \pm 10\%$ ).....52

### **CAPÍTULO III**

**Tabela 1.** Produtos utilizados em testes *in vitro* para determinação da sensibilidade de fêmeas ingurgitadas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* aos carrapaticidas, em condições de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR}$  de  $80 \pm 10\%$ ).....64

**Tabela 2.** Valores de concentração letal 50% ( $\text{CL}_{50}$ ) do timol (mg/mL) e carvacrol (mg/mL) para populações de *Rhipicephalus microplus* com diferentes perfis de resistência. Estudo conduzindo em condições de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR}$  de  $80 \pm 10\%$ ).....67

**Tabela 3.** Análise de correlação entre o nível de sensibilidade de *Rhipicephalus microplus* aos carrapaticidas e os valores de  $\text{CL}_{50}$  do timol e carvacrol.....74

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1.** Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus* .....4

**Figura 2.** Estrutura molecular do timol, carvacrol e eugenol.....6

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Estrutura do timol, carvacrol, eugenol e seus derivados acetilados (acetate de timila, acetate de carvacrila e acetate de eugenila).....25

**Figura 2.** Teste de pacote de larvas (A) onde aproximadamente 100 larvas foram colocadas no interior de papéis de filtro (6x6cm), dobrados ao meio e as extremidades vedadas com clips (B). Após o fechamento, com a utilização de pipeta cada lado externo do envelope foi umedecido com 90 µl das soluções a serem testadas (C). Após 24h, realizou a leitura das larvas vivas e mortas (D).....26

**Figura 3.** Espectro de confirmação do processo de acetilação do timol.....28

**Figura 4.** Espectro de confirmação do processo de acetilação do carvacrol.....28

**Figura 5.** Espectro de confirmação do processo de acetilação do eugenol .....29

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Metodologia empregada no Teste de Imersão de Fêmeas.....44

**Figura 2.** Substâncias e concentrações testadas para avaliação de efeito sinérgico sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.....44

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Distribuição geográfica das populações de *Rhipicephalus microplus* utilizadas nos testes com timol e carvacrol. ....65

**Figura 2.** Dendograma obtido através da Análise de *Cluster* utilizando as CL<sub>50</sub> do timol (Populações de 1 a 25) para larvas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus*. Experimentos realizados em condições de laboratório (27±1°C e UR de 80±10%).  
.....69

**Figura 3.** Dendograma obtido através da Análise de *Cluster* utilizando as CL<sub>50</sub> do carvacrol (Populações de 21 a 40) para larvas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus*. Experimentos realizados em condições de laboratório (27±1°C e UR de 80±10%).  
.....70

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO III

**Quadro 1.** Eficácia carrapaticida (%) sobre fêmeas ingurgitadas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* (fêmeas ingurgitadas em condições de laboratório  $27\pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $80\pm 10\%$ ). Dados fornecidos pela Embrapa Gado de Leite .....72

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

®	Marca registrada;
%	Por cento;
°C μL	Graus Celsius;
CAPES	Microlitros;
CDCL <sub>3</sub> CL	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;
CNPq	Clorofórmio deuterado
DMSO	Concentração Letal
et al.	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;
GFM	Dimetilsulfóxido
HCL	E colaboradores;
Hz	Grupo febre maculosa;
IC	Hipoclorito de sódio
LAP	Hertz
mg	Índice de combinação
mL	Laboratório de Artrópodes Parasitos
MHz	Miligrama;
OPG	Mililitro;
q.s.p.	Mega hertz
RMN	Ovos por grama
RMN <sup>1</sup> H	Quantidade suficiente para
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear
s.l.	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio 1
TL	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
TMS	Sensu lato;
UFJF	Tempo letal
UFRRJ	Trimetil silano
	Universidade Federal de Juiz de Fora;
	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1 2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<i>Rhipicephalus microplus</i>			3
<b>2.2</b>	Carrapaticidas sintéticos			4
<b>2.3</b>	Substâncias de origem vegetal no controle de <i>Rhipicephalus microplus</i>			5
<b>2.4</b>	Mecanismo de ação das substâncias de origem vegetal			7
<b>2.5</b>	Associação das substâncias de origem vegetal			7
<b>2.6</b>	Referências Bibliográficas			9
<b>CAPÍTULO I</b>				
<b>ATIVIDADE CARRAPATICIDA DE CARVACROL, TIMOL, EUGENOL E SEUS DERIVADOS ACETILADOS SOBRE LARVAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE)</b>				
	Resumo			21
	Abstract			22
1.	Introdução	24		
2.	Material e métodos	24		
3.	Resultados	27		
4.	Discussão	31		
5.	Referências Bibliográficas	34		
<b>CAPÍTULO II</b>				
<b>AVALIAÇÃO DE EFEITO SINÉRGICO A PARTIR DE COMBINAÇÕES BINÁRIA DE MONOTERPENOS E FENILPROPANOIDE SOBRE FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (CANESTRINI, 1888)</b>				
	Resumo			39
	Abstract			40
1.	Introdução	42		
2.	Material e métodos	43		
3.	Resultados	46		
4.	Discussão	53		
5.	Referências Bibliográficas	55		
<b>CAPÍTULO III</b>				
<b>AÇÃO <i>IN VITRO</i> DE TIMOL E CARVACROL SOBRE DIFERENTES POPULAÇÕES DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (CANESTRINI, 1888) COM DIFERENTES PERFIS DE RESISTÊNCIA</b>				
	Resumo			60
				61



Abstract	62
1. Introdução	63
2. Material e métodos	64
3. Resultados	66
4. Discussão	75
5. Referências Bibliográficas	77
<b>3 CONCLUSÃO</b>	<b>80</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos capazes de infestar animais como répteis, anfíbios, aves e mamíferos, com ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em todas as regiões do planeta. *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae), do ponto de vista econômico, é uma espécie de grande importância devido aos prejuízos causados à pecuária bovina (ANDREOTTI; KOLLER, 2013). É originário da Índia e Ilha de Java, na Ásia e sua chegada ao Brasil ocorreu, provavelmente, no início do século XVIII, sendo que nos dias de hoje pode ser encontrado em diferentes regiões e em diferentes condições climáticas (GONZALES, 1995). Este ixodídeo tem os bovinos como hospedeiro preferenciais, sendo responsável por grandes perdas econômicas, tais como: anemia, perda de peso, predisposição a miíases, perda na produção da carne e do leite, desvalorização do couro (FURLONG et al., 2003), além de transmitir os agentes patogênicos que ocasionam doenças caracterizadas em um complexo denominado “Tristeza Parasitária Bovina” (GUGLIELMONE et al., 2006). Esses prejuízos na produtividade pecuária brasileira, incluindo os custos com programas de controle, chegam a 3,24 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2014).

Os carrapaticidas sintéticos são o meio de controle mais utilizado para combate desse ectoparasito (MARTINS et al., 2006) porém, o uso indiscriminado e sem critérios técnicos tem propiciado a seleção de populações de carrapatos resistentes as bases químicas presentes no mercado, fenômeno que vem ocorrendo de maneira acelerada (KLAFKE, 2008). Atualmente, já existem populações de carrapatos multirresistentes a maioria das bases químicas disponíveis no mercado (RECK et al., 2014). A utilização indiscriminada desses acaricidas também pode ocasionar a intoxicação de humanos, animais e a contaminação do solo e recursos hídricos (BORGES et al., 2011). Por esse motivo, torna-se importante o desenvolvimento de novas alternativas para o controle desses carrapatos, que sejam mais seguras aos animais, homem e ao meio ambiente, além de desacelerar o processo de resistência das populações de carrapatos (CHAGAS, 2004; BORGES et al., 2011).

As substâncias de origem vegetal, por apresentarem propriedades biocidas, têm sido consideradas como alternativas para o controle de ectoparasitos (REGNAULT-ROGER; PHILOGENE, 2008). Os óleos essenciais são frações voláteis extraídas de plantas, obtidas principalmente por hidrodestilação ou destilação a vapor. São muito utilizados na produção de perfumes, aromatizantes e produtos farmacêuticos (BIZZO, 2009). Têm papel ecológico como atrativo para polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou servem como defensores químicos contra microrganismos e insetos (CHAGAS, 2004). São metabolitos secundários compostos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides e são constituídos principalmente de carbono, hidrogênio e o oxigênio (CASTRO et al., 2004).

Os monoterpenos carvacrol e timol, e o fenilpropanóide eugenol podem ser encontrados como componentes mais abundantes em óleos essenciais de plantas das famílias Lamiaceae, Verbenaceae, Myrtaceae, Lauraceae e Apiaceae (OLIVEIRA et al., 2009; FRANZ & NOVAK, 2009). Essas substâncias possuem atividade bactericida (ULTEE et al., 2002, HE et al., 2007, NOSTRO et al., 2007), leishmanicida (UEDA-NAKAMURA et al., 2006), moluscicida (BEZERRA et al., 1981, EL-DIN, 2006; RADWAN et al., 2008), inseticida (CARVALHO et al. 2003, KNIO et al. 2008, BARBOSA et al. 2012) e acaricida (SENRA et al., 2013a; NOVATO et al., 2015), incluindo atividade sobre diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (MONTEIRO et al., 2012; CRUZ et al., 2013; SENRA et al., 2013b; VALENTE et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016).

Na tentativa de desenvolver pesticidas botânicos, a modificação estrutural de substâncias extraídas de plantas tem sido uma alternativa atrativa que vem sendo utilizada para aumentar a atividade biocida dessas moléculas. Essas modificações mostraram-se uma ferramenta útil para aumento de atividade sobre bactéria, insetos, ácaros e carrapatos (ROBLEDO et al., 2005; FERRARINI et al., 2008; SADDIQ & KHAYYAT, 2010; MIAO et al., 2012). A geração de derivados acetilados ocorre através de mudanças na estrutura da molécula, com a introdução do grupo acetila, produzindo os seus derivados como o acetato de timila, o acetato de carvacrila e o acetato de eugenila a partir dos precursores timol, carvacrol e eugenol. Alguns estudos têm comprovado que a introdução dos derivados acetilados está melhorando a atividade sobre bactérias (MATHELA et al., 2010), insetos (JACK et al., 2006; SCOTTI et al., 2014) e carrapatos (FERRARI et al., 2008; CONCEPCIÓN et al., 2013).

Estudos também tem demonstrado que a combinação de certos compostos como os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides podem gerar efeito sinérgico na combinação dessas substâncias (PAVELA, 2010). O efeito é sinérgico quando duas ou mais substâncias são associadas e o efeito produzido é maior do que a soma das substâncias individuais (NTALLI et al., 2011). E já existem estudos que comprovam o efeito sinérgico da associação entre substâncias de origem vegetal sobre diferentes organismos como bactérias, nematoides, insetos e carrapatos (DIDRY et al., 1994; NTALLI et al., 2011; GALLARDO et al., 2012; NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016). Novato et al. (2015) ao realizarem a combinação do timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas não ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) verificaram efeito sinérgico moderado na associação de timol e carvacrol. Já Araújo et al. (2016) encontraram efeito sinérgico em todas as combinações testadas entre timol, carvacrol e eugenol sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e em oito das nove combinações testadas para *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille, 1808). Contudo, ainda são escassos na literatura estudos investigando a associação de substâncias de origem vegetal sobre outros estágios de carrapatos.

Existem muitos relatos na literatura sobre o uso de substâncias de origem vegetal no controle de carrapatos (CRUZ et al., 2013; MONTEIRO et al., 2012; NOVATO et al., 2015), entretanto, há poucos relatos da atividade carrapaticida de monoterpenos e fenilpropanoide incorporados a uma formulação (DELMONTE et al., 2017; FERREIRA et al., 2017). O presente estudo inova com a avaliação da associação do timol, carvacrol e eugenol incorporados a uma formulação.

Desta forma, o presente estudo foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa de controle de parasitos com substâncias de origem vegetal com o objetivo de propor novas alternativas para o controle de carrapatos. Nesse sentido, o primeiro capítulo foi desenvolvido com o intuito de realizar uma análise comparativa da atividade dos monoterpenos timol e carvacrol e do fenilpropanóide eugenol e seus respectivos derivados acetilados sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*. No segundo capítulo, o objetivo foi avaliar o efeito da combinação entre timol, carvacrol e eugenol sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e avaliar o efeito das combinações binárias de timol, carvacrol e eugenol incorporados a uma formulação sobre larvas e fêmeas de *R. microplus*. Por fim, o terceiro capítulo comparou a susceptibilidade de populações de *R. microplus* com diferentes graus de resistência aos acaricidas comerciais e aos monoterpenos timol e carvacrol.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

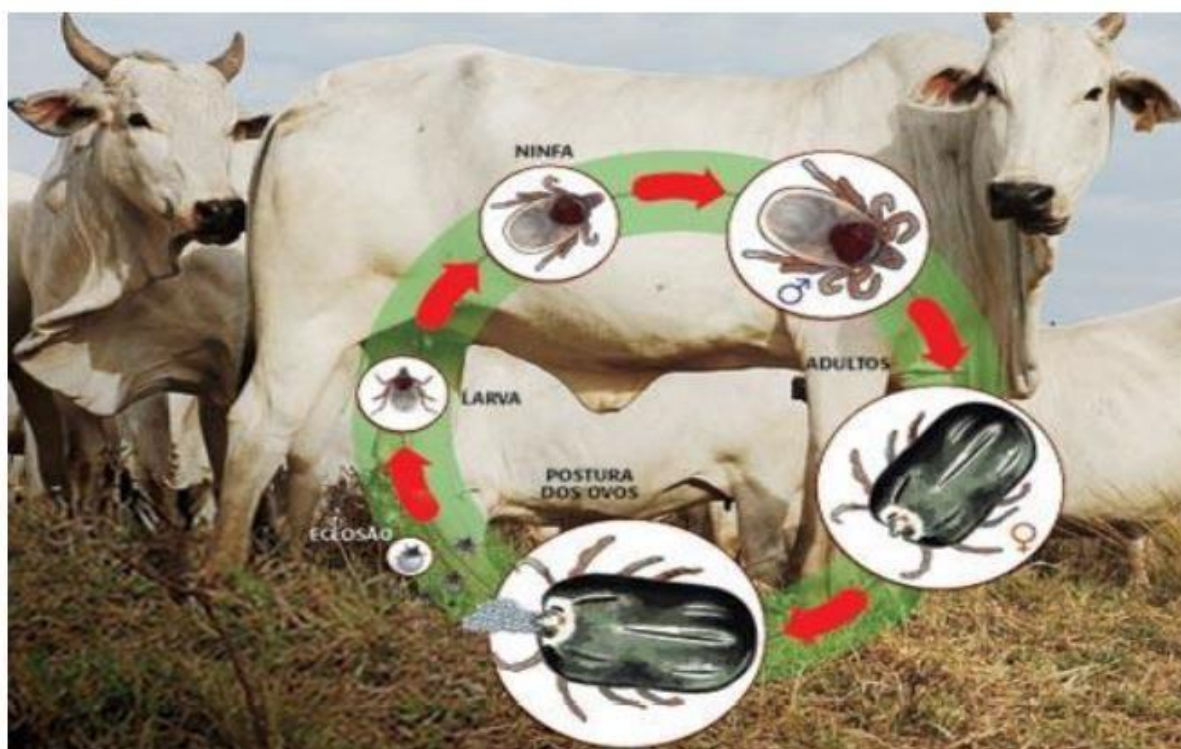
### 2.1 *Rhipicephalus microplus*

*Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) tem sua origem na Ásia e atualmente encontra-se distribuído desde o norte da Argentina, na região neotropical, até o México, incluindo as Ilhas do Caribe e Antilhas, exceto o Chile, além de estar presente no continente Africano (PEREIRA & LABRUNA, 2008). Surgiu no Brasil no início do século XVIII e, nos dias de hoje, é encontrado em todas as regiões, variando o parasitismo de acordo com a raça dos bovinos e condições climáticas (GONZALES, 1995).

Seu ciclo biológico utiliza um único hospedeiro podendo ter uma duração média de 18-22 dias, com duas fases distintas e complementares que são a fase parasitária e a fase não parasitária (PEREIRA & LABRUNA, 2008). A fase parasitária inicia quando as larvas infestantes sobem no hospedeiro e se fixam para a realização do repasto sanguíneo. Posteriormente as larvas ingurgitadas passam pelo processo de muda dando origem as ninfas não ingurgitadas. As ninfas se alimentam e realizam novo processo de muda, dando origem aos indivíduos adultos (fêmeas e machos). As fêmeas, por vez, se fixam e após a cópula ingerem grande quantidade de sangue que servirá como fonte de nutrientes para a produção de ovos. Com o fim do ingurgitamento as fêmeas se desprendem do hospedeiro, caem no solo e dá início a fase não parasitária com a postura dos ovos. Enquanto isso, os machos permanecem vivos no hospedeiro por um período aproximado de 70 dias fecundando outras fêmeas (FURLONG; PRATA, 2005; PEREIRA; LABRUNA, 2008).

Assim que a fêmea se ingurgita completamente ela cai no solo e procura um lugar com microclima adequado para dar início ao processo de oviposição, um ambiente com condições de umidade e temperatura adequados não só para elas, mas também para a incubação dos ovos que serão deixados no ambiente. A presença deste microclima é ocasionada pela cobertura vegetal propiciada pela pastagem utilizada no forrageio dos animais (PEREIRA; LABRUNA, 2008). Há casos em que em que as fêmeas se enterram em fendas do solo ou entre a vegetação na busca de condições ideais para a postura (BROVINI et al., 2003).

Depois que as fêmeas encontram o local apropriado para oviposição e após a maturação dos ovos elas começam a fazer postura, sendo que cada fêmea de *R. microplus* pode gerar em média 3000 ovos (GUIMARÃES et al., 2001). Após o período de incubação as larvas eclodem e permanecem inativas no solo próximos as cascas dos ovos por um período de dois ou três dias, no qual encontram maior proteção contra os fatores abióticos devido a cobertura vegetal. Esse período é fundamental para que se complete o período de rigidez da cutícula que após a exposição ao ar, exhibe a coloração marrom-avermelhada (FURLONG; PRATA, 2005). Após esse período as larvas sobem na vegetação e se aglomeram na extremidade do capim, aguardando o aparecimento do hospedeiro pertinente. Esse comportamento de agrupamento serve como proteção contra perda de água para o ambiente e também a ação da radiação solar (GUIMARÃES et al., 2001). As larvas podem sobreviver por um período de 30 dias em jejum em locais quentes e mais de 120 dias em locais com condições climáticas favoráveis (GUGLIELMONE et al., 2006).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus* (BARRETO, 2008).

## 2.2 Carrapaticidas sintéticos

Os lucros com a pecuária bovina podem ser afetados drasticamente devido aos prejuízos causados pela ação direta do parasito no animal, assim como os custos com as estratégias de controle (MELLO et al., 2014).

No final do século XIX foi utilizada a primeira formulação, com arsênico diluído em água, para o controle de carrapatos. Entretanto, após 40 anos de uso, surgiram os primeiros casos de resistência na Austrália e na América do Sul (FURLONG et al., 2007). Desde então, outras substâncias apareceram no mercado como: organoclorados, organofosforados, amitraz, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron. Porém estas bases químicas foram perdendo eficiência, ao longo dos anos, diante de populações de carrapatos resistentes (MARTINS & FURLONG, 2001; CUORE et al., 2007; RECK et al., 2014). De acordo com Pohl, (2012) a resistência é a capacidade do organismo sobreviver a doses letais. Quando um produto é utilizado, os indivíduos resistentes são capazes de sobreviver ao tratamento e se reproduzir, dando origem a populações de carrapatos também resistentes.

A forma de controle mais indicada consiste na realização de um controle estratégico, que se baseia no uso de carrapaticidas em épocas desfavoráveis a sobrevivência deste ectoparasito na pastagem, sendo importante o conhecimento da biologia e de sua interação com o ambiente. Mas o que é observado, na maior parte das propriedades, é a realização do controle somente quando o animal apresenta grande quantidade de fêmeas ingurgitadas. Além deste fato, o uso indiscriminado de carrapaticidas como modo de preparação, intervalos de aplicação e a falta de critérios para a escolha do carrapaticida contribuem para a falha no controle efetivo (FURLONG & PRATA, 2013).

Devido aos grandes prejuízos financeiros, o panorama de resistência, a intoxicação dos animais e a contaminação do meio ambiente, novas alternativas de controle estão sendo

estudadas (KISS et al., 2012). Estes estudos têm demonstrado que substâncias naturais, extraídas de plantas, como óleos essenciais e seus constituintes são agentes promissores no combate a esses ectoparasitos (SENRA et al., 2013a, b).

### 2.3 Substâncias de origem vegetal no controle de carrapatos

Devido à grande diversidade da flora brasileira, o uso de extratos vegetais tem se tornado uma alternativa no controle de carrapatos. (JACOBY et al., 2002).

O emprego de biocarrapaticidas provenientes do metabolismo secundário das plantas apresentam algumas vantagens, como: a rápida degradação no ambiente; são obtidas a partir de recursos renováveis; fácil acesso e obtenção; não deixam resíduo no ambiente; apresentam desenvolvimento lento do processo de resistência devido a associação de vários princípios ativos e normalmente, apresentam baixo custo e baixo impacto ambiental (ROEL, 2001; MOREIRA et al., 2007; BAGAVAN et al., 2009).

O metabolismo secundário das plantas tem papel importante na atração de agentes polinizadores, servem como defensores químicos contra microrganismos e insetos além de apresentarem adaptações químicas à pressão ambiental (CHAGAS et al., 2004).

A extração dessas substâncias pode ocorrer pelo processo de destilação a vapor que consiste na evaporação e condensação de líquidos, a fim de produzir, refinar e concentrar os óleos essenciais. Esses óleos são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis formados, principalmente, por terpenos e fenilpropanóides, podendo ser constituídos, também, por álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis e éter de fenol (BAJPAI et al., 2008), sendo que fatores como sazonalidade, radiação UV, composição atmosférica, índice pluviométrico, temperatura, ritmo circadiano, que podem variar os componentes presentes nesses óleos (FIGUEIREDO et al., 2008).

Nos últimos anos tem se intensificado os estudos sobre a ação de extratos vegetais e óleos essenciais sobre diferentes espécies de carrapatos. Clemente et al. (2010) observaram a atividade dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus* em larvas de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) e *Amblyomma cajennense sensu lato*. A atividade do óleo de *Lippia sidoides* também foi constatada por Gomes et al. (2012) em larvas e fêmeas de *R. microplus*, neste estudo foram observados mortalidade de 100% nas concentrações de 15 µl/mL e 20 µl/mL, para larvas de *R. microplus* e *D. nitens*, respectivamente. Em fêmeas de *R. microplus* os autores verificaram eficácia acima de 95% na concentração de 60 µl/mL. Neste mesmo trabalho foi realizada a análise quantitativa dos constituintes do óleo e verificaram que o timol e o carvacrol eram as substâncias majoritárias com 67,6 e 6,3%, respectivamente.

Lage et al. (2015) também verificaram a atividade do óleo de *Baccharis dracunculifolia* sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Eles constataram mortalidade de 99% em larvas na concentração de 15 mg/mL. Já para fêmeas a redução significativa no percentual de eclosão ocorreu a partir da concentração de 40 mg/mL. Outros óleos essenciais também foram testados em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, como: *Cymbopogon winterianus* e *Syzygium aromaticum* (MELLO et al., 2014), *Cymbopogon nardus* e *Corymbia citriodora* (CHAGAS et al., 2014), *Lippia graveolens* (FLORESFERNÁNDEZ et al., 2016), *Curcuma longa* e *Mentha arvensis* (CHAGAS et al., 2016), *Juniperus communis* *Cymbopogon martinii*, *Cedrus atlântica*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, *Pelargonium graveolens* (PAZINATO et al., 2016), *Syzygium aromaticum* (FERREIRA et al., 2017).

Os óleos essenciais são misturas (matrizes complexas) que são responsáveis pelas propriedades biológicas da planta (GALLUCCI et al., 2009). Essas substâncias são

monoterpenos, sesquiterpenos e os fenilpropanóides que associados formam potentes inseticidas naturais (ROMERO, 2008).

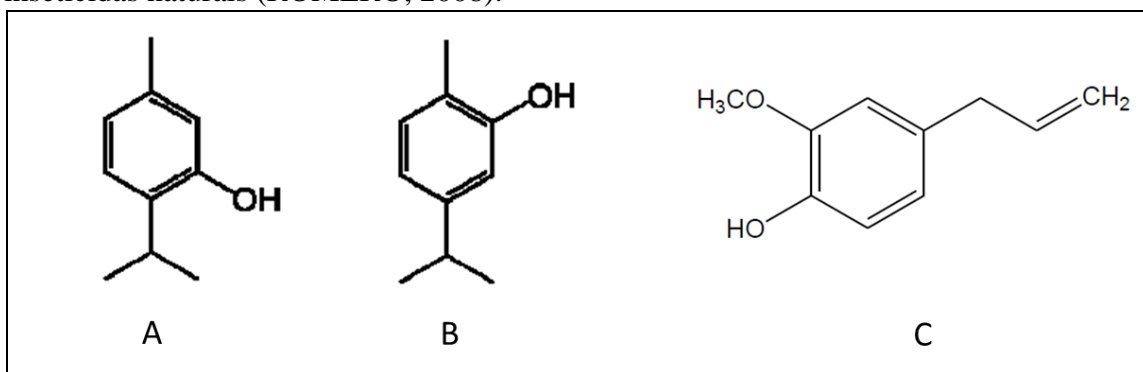


Figura 2. Estrutura molecular do timol (A), carvacrol (B) e eugenol (C).

O timol é encontrado em plantas da família Lamiaceae e Verbenaceae, é um monoterpeno volátil e de odor característico (GIRI & MUKERJI, 2002). E na família Lamiaceae, alguns gêneros merecem destaque por serem muito utilizados como condimentos, são eles: sálvia (*Salvia officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare* L.) e manjerona (*Origanum majorana* L.) (PORTE & GODOY, 2001).

A atividade carrapaticida do timol já foi comprovada em larvas e adultos de *R. microplus* (NOVELINO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2010) e diferentes estágios de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille, 1808) (DAEMON et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009). Em estudos realizados com timol sobre *A. cajennense* s.l., a concentração de 1% apresentou eficiência superior a 95% (MENDES et al., 2011). A mesma eficiência do timol foi verificada por Senra et al. (2013b) com larvas e ninfas de *A. cajennense* s. l. na concentração de 10 µl/mL. Scoralick et al. (2012) também comprovaram a ação deletéria do timol sobre larvas de *R. microplus*, na solução etanólica (água destilada + etanol) na menor concentração (2,5 mg/mL), com mortalidade de 94%. Delmonte et al. (2017) observaram a atividade da formulação tópica contendo timol sobre diferentes estágios de *R. sanguineus* s.l. indicando ser formulações promissoras para futuro uso terapêutico. Neste estudo a concentração de 10 mg/mL do timol incorporado a uma emulsão atingiu mortalidade acima de 95% em todos os estágios *R. sanguineus* s.l.

O carvacrol está presente em plantas da família Lamiaceae e Verbenaceae e também tem sua atividade carrapaticida comprovada (COSKUN et al., 2008; SENRA et al., 2013). Esse monoterpeno é o principal constituinte dos óleos essenciais de plantas aromáticas da família Lamiaceae, como o orégano e o tomilho (PENGELLY, 2004; NEVES, 2009). Coskun et al. (2008), em seus estudos com carvacrol, verificaram mortalidade acima de 90% na concentração de 12,5% em adultos de *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, 1940. A atividade carrapaticida do carvacrol sobre *Amblyomma americanum* Linnaeus, 1758 e *Ixodes scapularis* Say, 1821 foi igualmente, constatada por Dolan et al. (2009) quando borrifaram carvacrol na concentração de 5% na vegetação. Cetin et al. (2010) avaliaram a atividade acaricida do óleo essencial de *Satureja thymbra* L. e seus componentes principais carvacrol e  $\gamma$ -terpinene em adultos de *Hyalomma marginatum* Koch, 1844, sendo observado 100% de mortalidade após 24 horas. O mesmo foi observado por Martinez-Velazquez et al. (2011) com larvas de *R. microplus* ao testarem o óleo de *Lippia graveolens* (Verbenaceae) que possui o timol e o carvacrol como seus componentes majoritários. Em estudos realizados por Senra et al. (2013a, b) a atividade carrapaticida do carvacrol foi igualmente comprovada para larvas de *R. microplus* e *D. nitens*,

larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* s. l. e *R. sanguineus* s. l. Neste estudo foi possível verificar mortalidade de 100% em todas as espécies na concentração de 5 µl/mL.

O eugenol é um fenilpropanóide presente em plantas da família Myrtaceae, Lauraceae e Lamiaceae (FRANZ & NOVAK, 2009). É o principal constituinte do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), folha de louro (*Laurus nobilis*), noz-moscada (*Myristica fragrans*) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica*) (PENGELLY, 2004; NEVES, 2009). Ele é extremamente versátil, podendo ser utilizado na fabricação de sorvetes, produtos de panificação, doces, cosméticos, perfumes, produtos farmacêuticos e em composições para dentistas (BARCELOUX, 2008; CHANG et al., 2002).

O eugenol tem propriedade bactericida, fungicida, nematicida, acaricida e inseticida (ASHA et al., 2001; HE et al., 2007; EL-ZEMITY et al., 2010). Já existem relatos na literatura da ação do eugenol sobre carrapatos com atividade acaricida sobre fêmeas ingurgitadas e larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *D. nitens* (BROWN et al., 1998; THORSELL et al., 2006; MONTEIRO et al., 2012; FERREIRA et al., 2017) e larvas e ninfas não ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. e *A. cajennense* s. l. (SENRA et al., 2013b). O efeito repelente do eugenol também foi observado em ninfas de *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (THORSELL et al., 2006, DEL FABBRO & NAZZI, 2008) e em *R. microplus* e *D. nitens* (ZERINGÓTA et al., 2012). Valente et al. (2014), por sua vez verificaram que o eugenol, na concentração de 5%, demonstrou atividade acaricida e inibiu a oviposição de *R. microplus*.

#### **2.4 Mecanismo de ação das substâncias de origem vegetal**

A conscientização ambiental tem levado a busca por novas substâncias que possam ser usadas no lugar dos compostos sintéticos que são prejudiciais ao meio ambiente (Yuan et al., 2016). Porém a investigação sobre o sítio de ação dessas substâncias é de extrema importância para poder conhecer os mecanismos de ação de cada substância.

Em estudos realizados com células bacteriana e eucariótica Bakkali et al. (2008) verificaram a ação do timol e carvacrol sobre a membrana e puderam observar que essas substâncias foram capazes de penetrar nas células e se incorporar a membrana e facilitar a entrada de substância da célula (BAKKALI et al., 2008). De acordo com Enam (2001) os óleos essenciais têm ação neurotóxica sobre insetos e outros artrópodes, provocando uma hiperexcitação do sistema nervoso que leva a uma rápida queda e imobilização do indivíduo. Esses óleos essenciais atuam através da inibição da enzima colinesterase (AChE), essa inibição provoca o acúmulo da acetilcolina nas sinapses, que resulta na falta de coordenação neuromuscular e morte (SINGH & SINGH, 2000). Ribeiro et al. (2012) revelaram que o extrato de *Calea serrata* têm ação inibitória da acetilcolinesterase em larvas de *R. microplus* assim como os acaricidas sintéticos carbamatos e organofosforados. Os óleos essenciais podem, também, bloquear os receptores de octopamina em insetos e alguns vertebrados (ENAN, 2001). Além disso, podem agir no sistema GABA (Ácido gama-aminobutírico) dos insetos (BLOOMQUIST et al., 2008).

Em estudos realizados por Matos et al. (2014) o timol foi capaz de agir diretamente no sistema reprodutivo de fêmeas de *R. sanguineus*, provocando vacúolos no citoplasma das células, invaginações na membrana limitante e danos na vesícula germinal. Na análise histoquímica foi possível verificar grande presença de cálcio em relação ao grupo controle. Remedio et al., (2016) também verificaram a ação do óleo essencial de nim (*Azadirachta indica*) em glândulas salivares de *R. sanguineus*. Esses autores encontraram irregularidade no formato das células, desorganização no citoplasma, além de alterações intermembranar mitocondrial, o que pode ocasionar modificações na fisiologia da glândula salivar.



Esses dados encontrados na literatura reforçam o potencial do uso de substâncias de origem vegetal no controle de pragas.

## 2.5 Associação das substâncias de origem vegetal

Existem estudos que comprovam a atividade de óleos essenciais e de seus componentes isolados em insetos (PAVELA, 2008), nematoides (NTALLI et al., 2011), carrapatos (MONTEIRO et al., 2010; DAEMON et al., 2012; SENRA et al., 2013). Houve um aumento dos estudos com a associação dessas substâncias isoladas, já que juntas podem apresentar atividade sinérgica, potencializando a atividade do óleo essencial em relação ao isolado (HUMMELBRUNNER & ISMAN, 2001). Já existem relatos na literatura de estudos com a combinação de substâncias em bactérias (DIDRY et al., 1994), nematoides (NTALLI et al., 2011), insetos (GALLARDO et al., 2012) e carrapatos (NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016).

Hummelbrunner & Isman (2001) avaliaram a ação isolada e a combinação dos monoterpenos timol, trans-anetol,  $\alpha$ -terpineol e citronelal sobre *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae), e verificaram que o trans-anetol apresentou atividade sinérgica quando misturado as outras substâncias. Pavela (2008) também verificou em seus estudos com *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Insecta: Diptera) o efeito sinérgico nas combinações entre *p*-cimeno +  $\gamma$ -terpineno; *p*-cimeno + carvacrol e *p*-cimeno + 1,8-cineol, em aplicação tópica. Porém o efeito antagônico foi constatado quando combinou timol e carvacrol nos experimentos de fumigação em *M. domestica*, o que merece destaque pois na maior parte dos estudos realizados com essas duas substâncias o efeito detectado é sinérgico ou aditivo (PAVELA, 2008), fato que evidencia a existência de variação de resposta de acordo com a espécie analisada.

A ação sinérgica entre timol e carvacrol foi verificada por Pavela (2010) em estudos realizados com larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833). O mesmo efeito foi observado por Ntalli et al. (2011) ao avaliarem a atividade desta combinação sobre nematoides *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 (Tylenchida: Heteroderidae). Resultado similar foi encontrado por Lima et al. (2011) com *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) no óleo essencial de *L. sidoides* e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e timol, isolados e em misturas binárias e terciárias, sendo que as misturas que continham o timol apresentavam o efeito sinérgico mais evidenciado.

Estudos com larvas de *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera:Pyralidae), a broca do milho, também avaliaram a ação das substâncias isoladas e em mistura binárias do linalol, 1,8-cineol, timol, *a*-terpineol, trans-anetol, carvacrol, eugenol e metil eugenol e verificaram o efeito sinérgico do timol + linalol; timol + 1,8-cineol; terpineol + linalol; terpineol + 1,8-cineol, no entanto o metil eugenol, eugenol e carvacrol misturados não tiveram efeito sobre a espécie estudada (SINGH et al., 2009).

Gallardo et al. (2012) avaliaram da associação do geraniol, citronelol, linalol e formato de citronelila, que estão presentes no óleo essencial de *Geranium maculatum* L. sobre fêmeas de *Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778 (Phthiraptera: Pediculidae) e verificaram o efeito sinérgico na mistura dos componentes. O mesmo foi verificado por Chaubey (2012) em seus estudos com *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) avaliando a atividade repelente das substâncias  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno isoladamente e misturadas os autores constataram o efeito potencializado da combinação dessas substâncias nos diferentes estágios desses insetos.

O efeito da mistura dos óleos linalol, 1,8-cineole, timol, trans-anetol e carvacrol sobre *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Pyralidae) também foi avaliado. Neste estudo foi possível verificar o efeito sinérgico do timol e linalol sobre as três espécies estudadas. Contudo o carvacrol apresentou efeito antagônico quando combinado com linalol, 1,8-cineol, timol, trans-anetol sobre as mesmas espécies. Alguns resultados chamam atenção quanto a sensibilidade das espécies a combinação, pois na mistura de trans-anetol + timol e trans-anetol + linalol verificou-se efeito sinérgico sobre *S. litura*, entretanto essa mesma combinação exibiu efeito antagônico sobre *H. armigera* e *C. partellus*, mostrando que a atividade da combinação pode variar com indivíduo estudado (KOUL et al., 2013).

Estudos com a combinação binária de substâncias de origem vegetal também foram realizados com carrapatos, porém ainda existem poucos relatos na literatura. Novato et al. (2015) avaliaram a atividade do timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído em combinação binária sobre larvas não ingurgitadas de *A. sculptum* s.l. e *D. nitens*. Neste estudo foi constatado que as combinações entre timol e (*E*)-cinamaldeído apresentaram efeito antagônico para as duas espécies, porém na combinação entre carvacrol e (*E*)-cinamaldeído o efeito antagônico esteve presente apenas sobre *D. nitens*. O sinergismo foi evidenciado nas concentrações de ½ da CL<sub>50</sub> e na CL<sub>50</sub> da combinação entre carvacrol e timol para *D. nitens* e o sinergismo moderado ocorreu nas concentrações de CL<sub>50</sub> de carvacrol e timol e também ¼ das CL<sub>50</sub> de carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre *A. sculptum*.

Estudo similar foi feito por Araújo et al. (2016) ao investigarem o efeito das combinações binárias entre timol, carvacrol e eugenol em diferentes concentrações (¼ da CL<sub>50</sub>, ½ da CL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. Eles observaram o efeito sinérgico nas nove combinações testadas sobre *R. microplus*, entretanto para *R. sanguineus* s.l. das nove combinações apenas uma apresentou efeito sinérgico moderado, sendo que as demais exibiram efeito sinérgico completo.

## 2.6 Referência bibliográficas

ANDRE, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C.; CAVALCANTE, G.S.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; FREITAS, R.M.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V.; BEVILAQUA, C.M.L. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, vol. 218, p. 52 – 58, 2016.

ANDRE, W.P.P.; CAVALCANTE, G.S.; RIBEIRO, W.L.C.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V.; BEVILAQUA, C.M.L. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 323-330, 2017.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 36 p., 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/871264>>. Acesso em: novembro de 2017.

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. Apresentação. In: Andreotti, R. & Koller, W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas**. Embrapa, Gado de Corte, Brasília, 2013.

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Apresentação. In: Andreotti, R.; Koller, W.W.; Garcia, M.V. **Carrapatos: Protocolos e técnicas para estudo**. Embrapa, Gado de Corte, Brasília, 2016.

ARAUJO, L. X.; NOVATO, T.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D. R.; SILVA, B. C.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol on larvae of cattle tick, *Rhipicephalus microplus* and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 377382, 2016.

ASHA, M.K.; PRASHANTH, D.; MURALI, B.; PADMAJA, R.; AMIT, A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. **Fitoterapia**, vol. 72, n. 3, p. 669-70, 2001.

BARCELOUX, D. G. **Medical Toxicology of Natural Substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals**. Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008.

BAGAVAN, A., KAMARAJ, C., ELANGO, G., ZAHIR, A.A., RAHUMAN, A.A. Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. **Veterinary Parasitology**, v.166, p. 286-292, 2009.

BAJPAI V.K.; SHUKLA S.; KANG S.C.; Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Bioresource Technology**, vol. 99, 89038908, 2008.

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

BARBOSA, J.D.; SILVA, V.B.; ALVES, P.B.; GUMINA, G.; SANTOS, R.L.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 14781483, 2012.

BEZERRA, P.; FERNANDES, A.G.; CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; VIANA, G.S.B.; MATOS, F.F.; ROUQUAYROL, M.Z. Composição química e atividade de óleos essenciais de plantas do Nordeste – Gênero *Lippia*. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 1-14, 1981.

BIZZO, H.R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, n. 3, p: 588-594, 2009.

BLOOMQUIST, J.R., BOINA, D.R., CHOW, E., CARLIER, P.R., REINA, M., GONZALEZ-COLOMA, A. Mode of action of the plant-derived silphinenes on insect and mammalian GABAA receptor/chloride channel complex. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 91, n. 1, p. 17- 23, 2008.

BORGES, L.M.F; SOUSA, L.A.D; BARBOSA C.S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** v.20, p. 89–96, 2011.

BROVINI, C.N.; FURLONG, J.; CHAGAS, A.C.S. Influência dos fatores climáticos na biologia e no comportamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* a campo. **Bioscience Journal**. v. 19, p. 71-76, 2003.

BROWN H. A.; MINOTT D. A.; INGRAM C. W.; WILLIAMS L. A. D. Biological activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal of Tropical Insect Science**. v.18: p.9–16, 1998.  
CARVALHO A.F.; MELO V.M.; CRAVEIRO A.A.; MACHADO M.I.; BANTIM M.B.; RABELO E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 98, n.4, p. 569–571, 2003.

CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.A.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n.1, p.55-57, 2004.

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

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p. 156-160, 2004.

CHAGAS, A.C.S.; DOMINGUES, L.F.; FANTATTO, R.R.; GIGLIOTI R.; OLIVEIRA, M.C.S.; OLIVEIRA, D.H.; MANO, R.A.; JACOB, R.G. *In vitro* and *in vivo* acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon*spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 277-284, 2014.

CHAGAS, A.C.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R.C.M.; BIZZO, H.R.; GAMA, P.E.; CHAVES, F.C.M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.

CHANG, M. C.; UANG, B. J.; WU, H. L.; LEE, J. J.; HAHN, L. J.; JENG, J. H. Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: Roles of glutathione and reactive oxygen species. **British Journal of Pharmacology**, v.135, p. 619–630, 2002.

CHAUBEY, M. K. Acute, Lethal and Synergistic effects of some terpenes against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ecologia Balkanica**, v.4, n.1, p. 53-62, 2012.

CHOU, T.C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 621–681, 2006.

CLEMENTE, M. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SCORALIK, M. G.; GOMES, F. T.; PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 107, p. 987–992, 2010.

CONCEPCIÓN, R.L.; FROYLÁN, I.V.; HERMINIA, I.P.M.; NORBERTO, M.A.; HÉCTOR, J.S.Z.; YENIEL, G.C. In vitro assessment of the acaricidal activity of computerselcted analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n.2, p. 251-257, 2013.

COSKUN, S.; GIRISGIN, O.; KURKCUOGLU, M.; MALYER, H.; GIRISGIN, A.O.; KIRIMER, N.; BASER, K.H. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitology Research**, v.103, p. 259-261, 2008.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; MILLER, R.J.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; LI, A.Y.; LEÓN, A.A.P. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60-64, 2016.

CRUZ, E.M.O.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.A.; ARAUJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198– 202, 2013.

CUORE, U.; TRELLES, A.; SANCHIS, J.; GAYO, V.; SOLARI, M.A. Primer diagnóstico de resistencia al fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. **Veterinaria (Montevideo)**, v.42, n. 165-166, p. 35 – 41, 2007.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; ROSA, L. S.; CLEMENTE, M. A.; ARCOVERDE, A. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.105, p. 495-497, 2009.

DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. M. O.; SCORALIK, M. G.; MASSONI, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v.186, p. 542-545, 2012 a.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; FAZA, A.; AZEVEDO, P. M. C.; GEORGOPOULOS, S. L.; OLIVEIRA, L. F. C. Spectroscopic evaluation of thymol dissolved by different methods and influence on acaricidal activity against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.111, p. 1901-1906, 2012 b.

DEL FABBRO, S.; NAZZI, F. Repellent effect of sweet basil compounds on *Ixodes ricinus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 45, n.3-4, p. 219-228, 2008.

DELMONTE, C.; CRUZ, P.B.; ZERINGÓTA, V.; MELLO, V.; FERREIRA, F.; AMARAL, M.P.H.; DAEMON, E. Evaluation of the acaricidal activity of thymol incorporated in two formulations for topical use against immature stages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.116, n. 11, p. 2957–2964, 2017.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.69, p. 25-28, 1994.

DOLAN, M. C.; JORDAN, R. A.; SCHULZE, T. L.; SCHULZE, C. J.; MANNING, M. C.; RUFFOLO, D.; SCHMIDT, J. P.; PIESMAN, J.; KARCHESY, J. J. Ability of Two Natural Products, Nootkatone and Carvacrol, to Suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme Disease Endemic Area of New Jersey. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p. 2316-2324, 2009.

EL-DIN, AT. Molluscicidal effect of three monoterpenes oils on schistosomiasis and fascioliasis vector snails in Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.36, p. 599-612, 2006.

EL-ZEMITY, S.R.; REZK, H.A.; FAROK, S.; ZAITOON, A.A. Acaricidal activity of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Trends in Acarology**, p. 541-543, 2010.

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

FERNADES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIANSE, T.C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307 – 318, 2011

FERRARINI, S.R.; DUARTE, M.O.; DA ROSA, R.G.; ROLIM, V.; EIFLER-LIMA, V.L.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V.L.S. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and  $\beta$ amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p.149–153, 2008.

FERREIRA, F.M.; DELMONTE, C.C.; NOVATO, T.P.L.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; VILELA, F.M.P.; AMARAL, M.P.H. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.32, n.1, p 4147, 2017.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p.213-226, 2008.

FLORES-FERNÁNDEZ, J.M.; PADILHA-CAMBEROS, E.A.; CASTILLO HERRERA, G.A.; MARTINEZ-VELÁZQUEZ, M. Adulticidal and oviposition- and hatching-altering activities of essential oil from Mexican oregano leaves (*Lippia graveolens* H.B.K.) against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Tropical Biomedicine** v. 33, n.2, p. 290–294, 2016.

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of Essential Oils. In: Baser KHC, Buchbauer G (ed) **Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications**. CRC Press, New York 39-81, 2009.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Comunicado Técnico 36, **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, 2003.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, 27(159), 2007.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Conhecimento básico para controle do carrapato-dosbovinos. In: FURLONG, J. (Org.). **Carrapatos: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005. p. 9-20.

FURLONG, J. & PRATA, M. C. A. Carrapato-dos-bovinos: ações simples permitem convivência em harmonia. In: Andreotti, R. & Koller, W. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas. **Embrapa, Gado de Corte**, Brasília, 2013.

GALLARDO, A.; PICOLLO, M.I.; GONZÁLEZ-AUDINO, P.; MOUGABURE-CUETO, G. Insecticidal Activity of Individual and Mixed Monoterpenoids of Geranium Essential Oil Against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Journal of Medical Entomology**, v.49, n.2, p. 332-335, 2012.

GALLUCCI, M. N.; OLIVA, M.; CASERO, A. C.; DAMBOLENA, J.; LUNA, A.; ZYGADLOB, J.; DEMO, M. Antimicrobial combined action of terpenes against the foodborne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, p. 348–354, 2009.

GIRI, B.E.; MUKERJI, K.G. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.5, p. 459- 463, 2002.

GOMES, G.A.; MONTEIRO, C.M.O; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R.S.; DAEMON, E.; GOIS, R.W.S.; SANTIAGO, G.M.P.; CARVALHO, M.G.

Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, 2012.

GONZALEZ, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2 ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995. P. 235.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p.150-156, 2014.

GUGLIELMONE, A.A.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.S; ESTRADA-PEÑA, A. Capítulo 7: Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D. M.; Arzua, M.; Bechara, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, 115-138, 2006.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATESTI, D.M. **Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária**. Sao Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 213p.

HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.163, n.3, p. 137–143, 2007.

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 715-720, 2001.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v.19, p. 603–608, 2000.

JACK, I.R.; OKOROSAYE-ORUBITE, K.; BOBMANUEL, R.B. Assessment of the larvicidal potentials of thymol derivatives on *Anopheles* mosquitoes. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 10, p. 63-65, 2006.

JACOBY, C.; COLTRO, E. M.; SLOMA, D. C.; MULLER, J.; DIAS, L. A.; LUFT, M.; BERUSKI, P. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade rural de Guamirim, Município de Irati, PR. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.4, n.1, p. 79-89, 2002.

KISS, T.; CADAR, D.; SPINU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Veterinary Parasitology**, v.187, p. 357-366, 2012.

KLAFKE, G.M. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M.C. et al. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-105, 2008.



KNIO, K.M.; USTA, J.; DAGHER, S.; ZOURNAJIAN, H.; KREYDIYYEH, S. Larvacidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 763-768, 2008.

KOUL, O.; SINGH, R.; KAUR, B.; KANDA, D. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. **Industrial Crops and Products**, 49: 428–436, 2013.

LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti DMB, Arzua M, Bechara GH (eds) **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan, p. 155–164, 2006.

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, 148: 124-129, 2015.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; CARVALHO, S.M.; RODRIGUES, V.G.; GUIMARÃES, L.G.L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 35(4): 664-671, 2011.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; CASTILLO-HERRERA, G.; FLORES-FERNANDEZ, J. M.; ALVAREZ, A. H.; LUGO-CERVANTES, E. Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. p. 822-827, 2011.

MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **The Veterinary Record**, v. 149, n.2, p. 64, 2001.

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. Capítulo 9: Controle de carrapatos. In: Barros-Battesti, D. M.; Arzua, M.; Bechara, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, 145-154, 2006.

MATHELA, C.S.; SINGH, K.K.; GUPTA, V.K. Synthesis and *in vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v. 67, p.375-380, 2010.

MELLO, V.; PRATA, M. C. D. A.; DA SILVA, M. R.; DAEMON, E.; DA SILVA, L. S.; GUIMARÃES, F. D. G.; DE MENDONÇA, A. E.; FOLLY, E.; VILELA, F. M. P.; DO AMARAL, L. H.; CABRAL, L. M.; DO AMARAL, M. D. P. H. Acaricidal properties of the

formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4431–7, 2014.

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

MIAO, F.; YANG, X.J.; MA, Y.N.; ZHENG, F.; SONG, X.P.; ZHOU, L. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their in vitro acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.60, n. 12, p. 1508-13, 2012.

MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; CLEMENTE, M. A.; ROSA, L. S.; MATURANO, R. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.105, p. 1093-1097, 2009.

MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; SILVA, A.M.R.; MATURANO, R.; AMARAL, C. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.106, p. 615-619, 2010.

MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; CALMON, F.; SENRA, T.O.S.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111, p.1295–1300, 2012.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; MARTINS, J.C.; CAMPOS, M.R.; CHEDIK, M. 2007. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: Zambolin, L., Lopes, C.A., Picanço, M.C., Costa, H. **Manejo integrado de doenças e pragas**. Suprema Gráfica e Editora. Visconde do Rio Branco. Brasil. pp. 577-606.

NEVES, Ana Paula. Ensaio sobre controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* através de processos agroecológicos. **Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de PósGraduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, Santa Catarina, 2009.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, A.; PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 519–523, 2007.

NOVATO, T.; ARAUJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 331-335, 2015.

NOVELINO, A.M.S.; DAEMON, E; SOARES, G.L.G. Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.101, p. 809-811, 2007 a.

NTALLI, N.G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, 67: 341–351, 2011.

OLIVEIRA RA, REIS TV, SACRAMENTO CK, DUARTE LP, OLIVEIRA FF. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira Farmácia**, v.19, n. 3, p. 771-775, 2009.

PAVELA, R. Lethal and sublethal effects of thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) on the house fly (*Musca domestica* Lin.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, p. 346–356, 2007.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of some Monoterpenoid essential oil compounds on the House Fly (*Musca domestica* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.11, n.5, p.451-459, 2008.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biopesticides**, v.3, n.3, p.573 – 578, 2010.

PAZINATO, R.; VOLPATO, A.; BALDISSERA, M.D.; SANTOS, R.C.V.; BARETTA, D.; VAUCHER, R.A.; GIONGO, J.L.; BOLIGON, A.A.; STEFANI, L.M.; Da SILVA, A.S. In vitro effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Advanced Research**, v. 7, p. 1029 – 1034, 2016.

PENGELLY, A. **The Constituents of Medicinal Plants: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine**. Segunda edição, Allen&Unwin, 2004.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET. 2008. p.15–56.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M.G.; SÁ, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257 -260, 2012.

PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. **Science**, v.311, p.808-811, 2006.

POHL, P.C. Participação dos transportadores ABC na destoxificação de acaricidas no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Tese**. Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O.; Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos**, v.19, n. 2, 193 – 210, 2001.

RADWAN, M.A.; EL-ZEMITY, S.R.; MOHAMED, S.A.; SHERBY, S.M. Potential of some monoterpenoids and their new N-methyl carbamate derivatives against *Schistosomiasis snail* vector, *Biomphalaria alexandrina*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p. 889894, 2008a.

RADWAN, M.A.; EL-ZEMITY, S.R.; MOHAMED, S.A.; SHERBY, S.M. Larvicidal activity of some essential oils, monoterpenoids and their corresponding N-methyl carbamate derivatives against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.28, p. 61-68, 2008b.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, 201(1-2): 128-136, 2014.

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B.J.R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p. 41-52, 2008.

REMEDIO, R.N.; NUNES, P.H.; ANHOLETO, L.A.; OLIVEIRA, P.R.; SÁ, I.C.G.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. **Micron**, v. 83, p. 19-31, 2016.

RIBEIRO, V.L.S.; VANZELLA, C.; MOYSÉS, F.S.; SANTOS, J.C.; MARTINS, J.R.S.; POSER, L.V.; SIQUEIRA, I.R. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. . **Veterinary Parasitology**, 189, p. 322-326, 2012.

ROBLEDO S, OSORIO E, MUÑOZ D, JARAMILLO LM, RESTREPO A, ARANGO G, VELEZ I. *In vitro* and *in vivo* cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemi synthetic derivates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.1652-1655, 2005..

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Interações: Revista Internacional Desenvolvimento Local**, v.1, p. 43-50, 2001.

SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S.A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.98, p. 89–93, 2010

SCORALIK, M.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, v.110, n. 2, p. 645-648, 2012.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; SILVA, V.B.; SANTOS, S.R.L.; CAVALCANTI, S.C.H.; MENDONÇA, F.B.M.J.R. Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.10, n. 2, p. 201-210, 2014.

SENRA, T.O.S.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p.1461–1466, 2013 a.

SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; MATOS, R. S.; MELO, D.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p. 3471-3476, 2013b.

SINGH, R.; KOUL, O.; RUP, P.J.; JINDAL, J. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.29, n.2, p. 93–101, 2009.

SINGH, K., SINGH, D.K. Toxicity to the snail *Limnaea acuminata* of plant-derived molluscicides in combination with synergists. **Pest Management Science**, v.56, p.889-898, 2000.

SOARES, M.A.S.; PENHA, T.A.; ARAÚJO, A.S.; CRUZ, E.M.O.; BLANK, A.F.; COSTAJUINIOR, L.M. Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.25 n.4, p. 401 – 406, 2016.

THORSELL, W.; MIKIVER, A.; TUNÓN, H. Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L. **Phytomedicine**, v.13, n. 1-2, p. 132-134, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; MAZA, P.K.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; ALVIANO, D.S.; ROSA, M.S.S.; LOPES, A.H.C.S.; ALVIANO, C.S.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1561–1568, 2002.

VALENTE, P.P.; AMORIM, J.M.; CASTILHO, R.O.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, M.F.B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.113, p. 417–423, 2014.

WEBSTER, A.; PRADEL, E.; SOUZA, U.A.; MARTINS, J.R.; RECK, J.; SCHORANK, A.; KLAFKE, G. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, p. 270-274, 2017.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ed. Porto Alegre: Artmed. p. 17 -28, 2005.

ZERINGOTA, V.; SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; FAZZA, A. P.; CATUNDA-JR., F. E. A.; MONTEIRO, C. M. O.; CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p. 2675-2679, 2013.

## **CAPÍTULO I**

**ATIVIDADE CARRAPATICIDA DE CARVACROL, TIMOL, EUGENOL E SEUS DERIVADOS ACETILADOS SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

**RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação comparativa da atividade do carvacrol, timol, eugenol e seus respectivos derivados acetilados, acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*, e verificar a possível influência na atividade carrapaticida do grupo acetato. Os derivados acetilados foram preparados a partir das reações dos compostos fenólicos com anidrido acético/piridina. A confirmação dos produtos foi feita através da análise de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$  NMR) e carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$  125 MHz). Para a avaliação da atividade, foi realizado o teste de pacote de larvas modificado, sendo testadas as concentrações de 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mg/mL diluídas em etanol absoluto. Além disso foi feito um grupo controle com etanol absoluto. O timol e carvacrol resultaram em mortalidade de 100% a partir da concentração de 2,5 mg/mL, sendo observado o mesmo para o acetato de carvacrila na concentração de 5 mg/mL. Para os demais tratamentos, mortalidade acima de 95% das larvas foi observada nos grupos tratados com a concentração 10,0 mg/mL. Os valores de  $\text{CL}_{50}$  para os derivados acetilados foram de 2,49; 2,97 e 4,25 mg/ml e  $\text{CL}_{90}$  de 4,21; 8,52 e 13,10 para o acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila, respectivamente, valores maiores do que os observados para as moléculas precursoras carvacrol, timol e eugenol. Deste modo, embora os derivados acetilados tenham apresentado elevada atividade, podemos concluir que o processo de acetilação não potencializou a atividade carrapaticida dessas substâncias sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, uma vez que as substâncias precursoras (carvacrol, timol e eugenol) apresentaram melhor atividade. Porém esse é o primeiro estudo que avaliou a atividade carrapaticida de acetato de timila e acetato de eugenila sobre carrapatos. O presente estudo vem com uma abordagem inovadora no controle de *R. microplus*.

**Palavras-chave:** Carrapato dos bovinos, acetato de carvacrila, acetato de timila, acetato de eugenila.



## ABSTRACT

The objective of the present study was to perform a comparative evaluation of the activity of carvacrol, thymol, eugenol and their respective acetylated derivatives, carvacrila acetate, timila acetate and eugenyl acetate on larvae of *Rhipicephalus microplus*, and to verify the possible influence on the acaricidal activity of acetate group. The acetylated derivatives were prepared from the reactions of the phenolic compounds with acetic anhydride / pyridine. The products were confirmed by the analysis of Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR) and carbon-13 ( $^{13}\text{C}$  NMR 125 MHz) spectra. For the evaluation of the activity, the modified larval packet test was performed, being tested the concentrations of 0.312; 0.625; 1.25; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 and 15.0 mg / ml diluted in absolute ethanol. In addition, a control group was made with absolute ethanol. Thymol and carvacrol resulted in 100% mortality from the concentration of 2.5 mg / mL, and the same was observed for 5 mg / mL carvacrila acetate. For the other treatments, mortality above 95% of larvae was observed in the groups treated with the concentration 10.0 mg / mL. The  $\text{LC}_{50}$  values for the acetylated derivatives were 2.49; 2.97 and 4.25 mg / ml and  $\text{LC}_{90}$  of 4.21; 8.52 and 13.10 for carvacril acetate, thymyl acetate and eugenyl acetate, respectively, higher values than those observed for the precursor molecules carvacrol, thymol and eugenol. Thus, although the acetylated derivatives showed high activity, we can conclude that the acetylation process did not potentiate the acaricidal activity of these substances on non-engorged larvae of *R. microplus*, since the precursor substances (carvacrol, thymol and eugenol) presented better activity. However, this is the first study to evaluate the tyrosine acacia and eugenyl acetate activity on ticks. The present study comes with an innovative approach in the control of *R. microplus*.

**Keywords:** Cattle tick; carvacryl acetate; thymol acetate; eugenyl acetate.

## 1 INTRODUÇÃO

O controle de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) é realizado com carrapaticidas sintéticos, cuja aplicação de maneira indiscriminada tem acelerado a seleção de carrapatos resistentes (FURLONG et al., 2007), sendo que atualmente já existe relatos de populações multirresistentes (RECK et al., 2014). Além da resistência, outro fator importante gerado pela utilização indiscriminada dos carrapaticidas é a contaminação do ambiente e intoxicação de animais (BORGES et al., 2011).

Os gastos com o controle, somados ao fenômeno de resistência, tem impulsionado a realização de estudos para o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle de *R. microplus*. Assim, muitas pesquisas têm investido na avaliação do potencial de substâncias de origem vegetal para o controle de diferentes espécies de carrapatos (BORGES et al., 2011; KISS et al., 2012; BANUMATHI et al., 2017).

Carvacrol, timol e eugenol já possuem atividade reconhecida sobre bactérias (ULTEE et al., 2002; HE et al., 2007; NOSTRO et al., 2007), leishmania (UEDA-NAKAMURA et al., 2006), moluscos (EL-DIN, 2006; RADWAN et al., 2008), insetos (CARVALHO et al., 2003; KNIO et al., 2008; BARBOSA et al., 2012) e ácaros (SENRA et al., 2013 a,b; NOVATO et al., 2015) e estudos estão sendo realizados com a modificação estrutural nesses compostos.

A modificação estrutural de constituintes químicos encontrados em óleos essenciais tem se mostrado uma ferramenta eficaz para melhorar o efeito biocida destas substâncias, aumentando sua atividade sobre bactérias, insetos, ácaros e carrapatos (ROBLEDO et al., 2005; FERRARINI et al., 2008; SADDIQ; KHAYYAT, 2010; MIAO et al., 2012). Dentre as modificações estruturais que podem ser realizadas, está a introdução do grupo acetila, produzindo derivados acetilados como o acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila, por meio da acetilação dos precursores carvacrol, timol e eugenol, respectivamente. Alguns estudos comparativos, utilizando compostos presentes em óleos essenciais de plantas e seus derivados acetilados tem evidenciado que a introdução de um grupo acetila resultou em potencialização da atividade bactericida e inseticida (JACK et al., 2006; MATHELA et al., 2010; SCOTTI et al., 2014). Outro aspecto positivo é que a produção de derivados acetilados pode apresentar menor toxicidade para mamíferos (ANDRE et al., 2016; ANDRE et al., 2017).

Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise comparativa da atividade do timol, carvacrol e eugenol e seus derivados acetilados acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*.

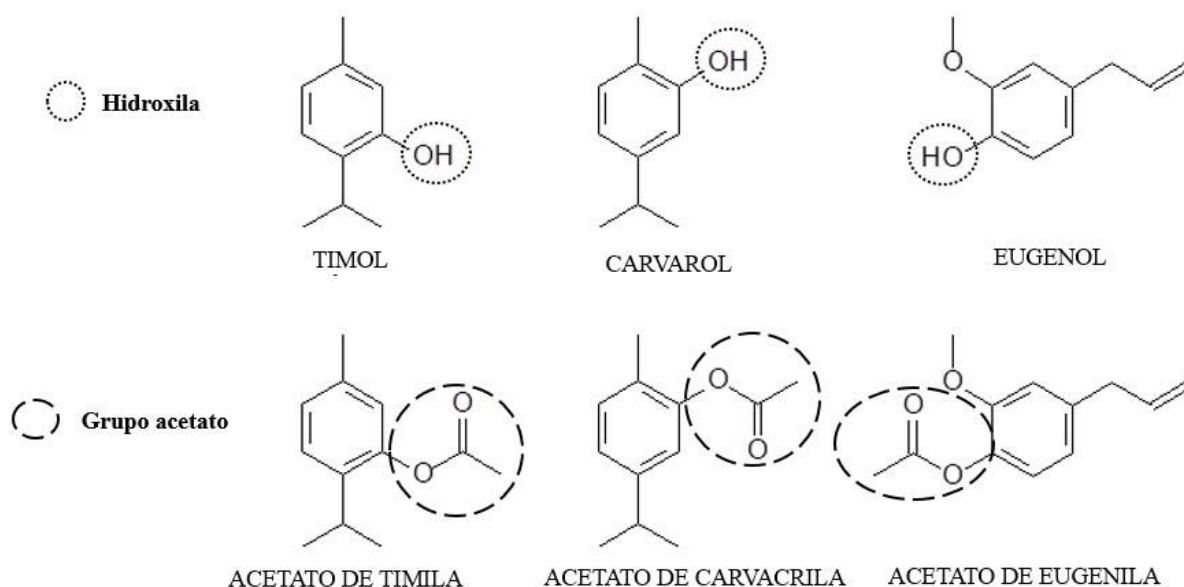
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação dos derivados

O timol foi adquirido da empresa Vetec Química Fina LTDA, enquanto o carvacrol e o eugenol foram obtidos da Sigma-Aldrich (Figura 1), ambas substâncias com certificação de grau de pureza superior a 98%. A preparação e confirmação das substâncias acetiladas foram

realizadas em parceria com o Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Instituto de Ciências Exatas no departamento de Química da Universidade Federal Ruarla do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os derivados acetilados (Figura 1) foram sintetizados seguindo metodologia proposta por Oliveira et al. (1999). Para obtenção do derivado acetato de timila, uma mistura de anidrido acético (0,7 mL) e piridina (0,5 mL) foi adicionada a 0,303 g de timol. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente em constante agitação e refluxo em torno de 48 horas. Em seguida, adicionou-se água gelada (30 mL), fez-se extração com clorofórmio (3 x 20 mL). A fase clorofórmica foi lavada com HCl (10%) para eliminar a piridina, e posteriormente lavouse com água destilada (3 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado através de destilação sob pressão reduzida (BASTOS et al., 2002). Foram empregados os mesmos procedimentos para obtenção do acetato de carvacrila e acetato de eugenila. O acetato de carvacrila foi obtido a partir 3,35 g de carvacrol, com utilização de 7 mL de anidrido acético e 5 mL de piridina, enquanto para obtenção do acetato de eugenila foram utilizados 4,18 g de eugenol, 9 mL de anidrido acético e 7 mL de piridina.



**Figura 1.** Estrutura do timol, carvacrol, eugenol e seus derivados acetilados acetato de timila, acetato de carvacrila e acetato de eugenila (Fonte: NOVATO et al 2018).

## 2.2 Confirmação dos produtos acetilados

Para confirmação da formação dos produtos foram feitas análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ , 500 MHz) e carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$  125 MHz). Foi utilizado  $\text{CDCl}_3$  como solvente e TMS como referência interna. Além da pequena modificação dos deslocamentos químicos dos prótons vizinhos ao grupo acetato, quando comparado com os respectivos reagentes, foram observados os sinais de singlete da metila do acetato em torno de 2,0 ppm em cada produto obtido.

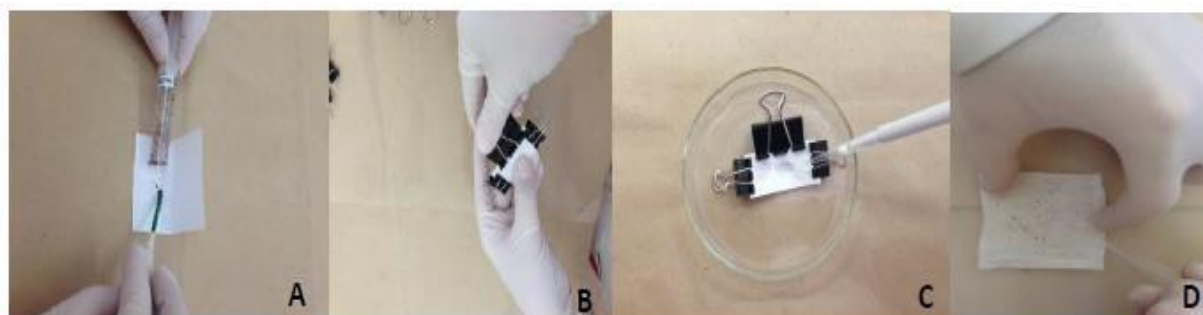
## 2.3 Obtenção dos carrapatos

Foram utilizadas larvas provenientes da postura de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, cepa Porto Alegre, mantida através de infestações artificiais em bezerros alocados no Campo

Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil. Tal procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (registro CEUA - nº 28/2015). Para realização dos testes foram utilizadas larvas com 15 a 21 dias após a eclosão.

## 2.4 Teste de pacote de larvas

O experimento foi conduzido no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP) da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Foi utilizado o teste de pacote de larvas proposto por Stone e Haydock (1962) adaptado por Monteiro et al. (2012), em que aproximadamente 100 larvas foram colocadas no centro de uma folha de papel de filtro (6x6 cm), que em seguida, foi dobrada ao meio e fechada nas laterais com cliques binder. Após essa etapa, cada um dos lados do papel foi umedecido com 90 µL, totalizando 180 µL das soluções testadas (Figura 2).



**Figura 2.** Teste de pacote de larvas (A) onde aproximadamente 100 larvas foram colocadas no interior de papéis de filtro (6x6cm), esses foram dobrados ao meio e as extremidades vedadas com cliques (B). Após o fechamento, com a utilização de pipeta cada lado externo do envelope foi umedecido com 90 µL das soluções a serem testadas (C). Após 24h, realizou a leitura das larvas vivas e mortas (D).

As substâncias carvacrol, acetato de carvacrila, timol, acetato de timila, eugenol e acetato de eugenila foram testadas nas seguintes concentrações: 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mg/mL, sendo diluídas em etanol absoluto. As concentrações foram determinadas de acordo com os resultados obtidos em testes anteriores com timol (DAEMON et al., 2012), carvacrol (SENRA et al., 2013b) e eugenol (MONTEIRO et al., 2012). Foram feitas 10 repetições por grupo. O grupo controle foi tratado com o solvente, etanol absoluto, substância que apresenta baixa toxicidade para larvas dessa espécie (CHAGAS et al., 2003; GONÇALVES et al., 2007). Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada (27±1°C e UR>80±10), sendo utilizadas diferentes câmaras climatizadas para cada grupo. A mortalidade das larvas foi avaliada após 24 horas, com uma bomba a vácuo, para contagem do número de larvas vivas e mortas. O percentual de mortalidade foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\%M = \frac{\text{Total de larvas mortas}}{\text{Total de larvas}} \times 100$$

## 2.5 Análise dos dados

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa Biostat versão 5.0 (AYRES et al. 2007). Os valores percentuais foram transformados em  $\sqrt{\text{arco seno } x}$  e analisados por Anova e Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). No caso de distribuição não paramétrica, os valores foram comparados através dos testes Kruskal Wallis e Student Newman Keulls ( $p < 0,05$ ). Para cálculo das concentrações letais (CL) foi utilizado o método de análise de Probit (Finney 1971), gerados por Probit POLOPC (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA, EUA).

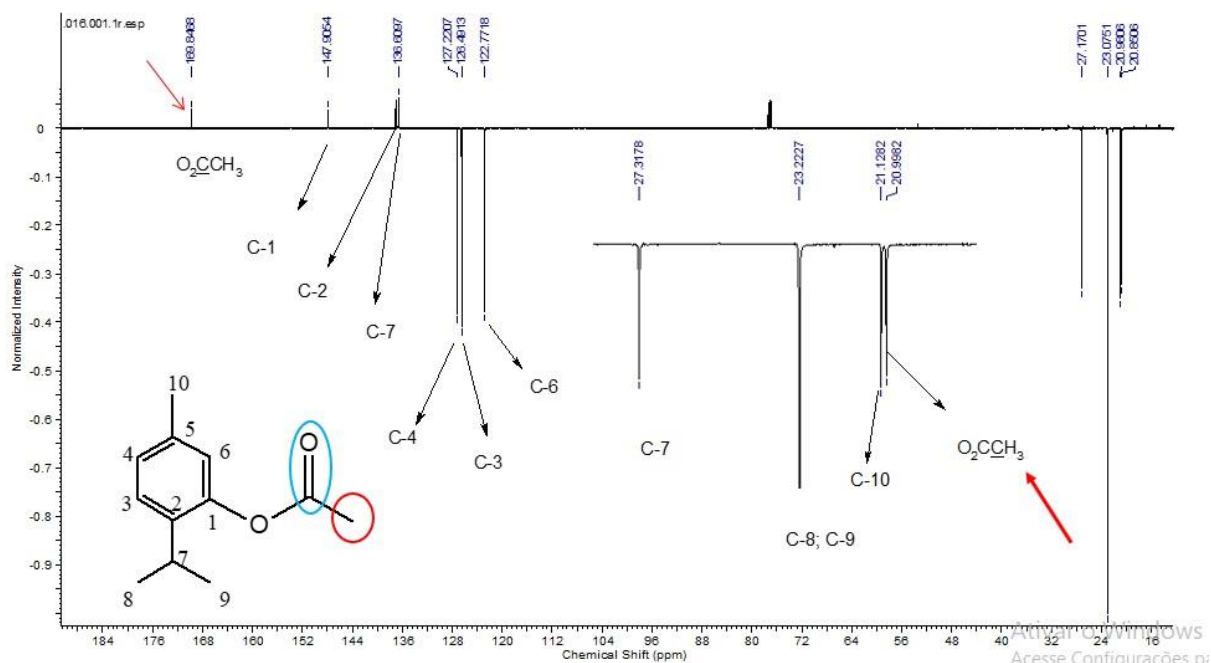
## 3 RESULTADOS

### 3.1 Preparação e confirmação dos produtos derivados

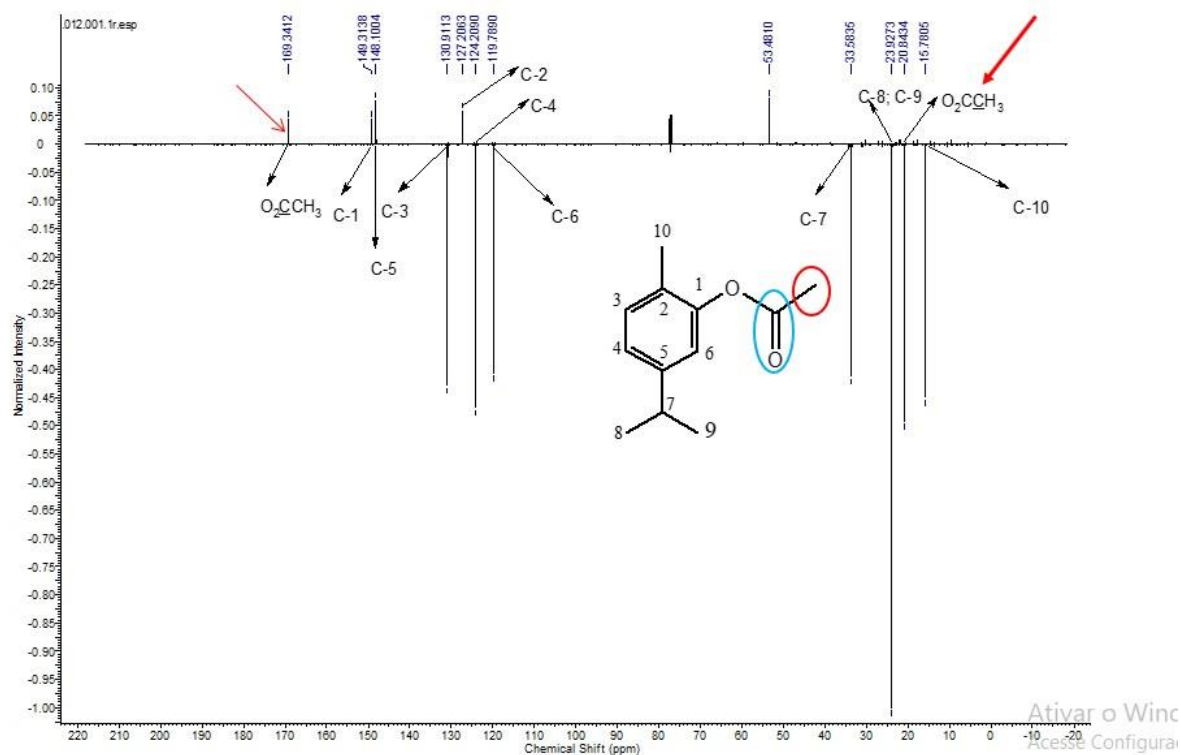
A análise dos dados dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) e de carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C) (deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento) de cada produto obtido a partir de reações de acetilação são apresentados na Tabela 1. O processo de síntese resultou em 0,367 g de acetato de timila (líquido incolor) (Figura 3), com rendimento de 94,83%, 4,18 g de acetato de carvacrila (líquido de coloração âmbar) (Figura 4), com rendimento de 97,58% e 5,10 g de acetato de eugenila (líquido levemente amarelado) (Figura 5), com rendimento de 97,14 %.

**Tabela 1.** Dados de RMN de protons e carbono 13 (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) dos derivados de carvacrol, timol e eugenol.

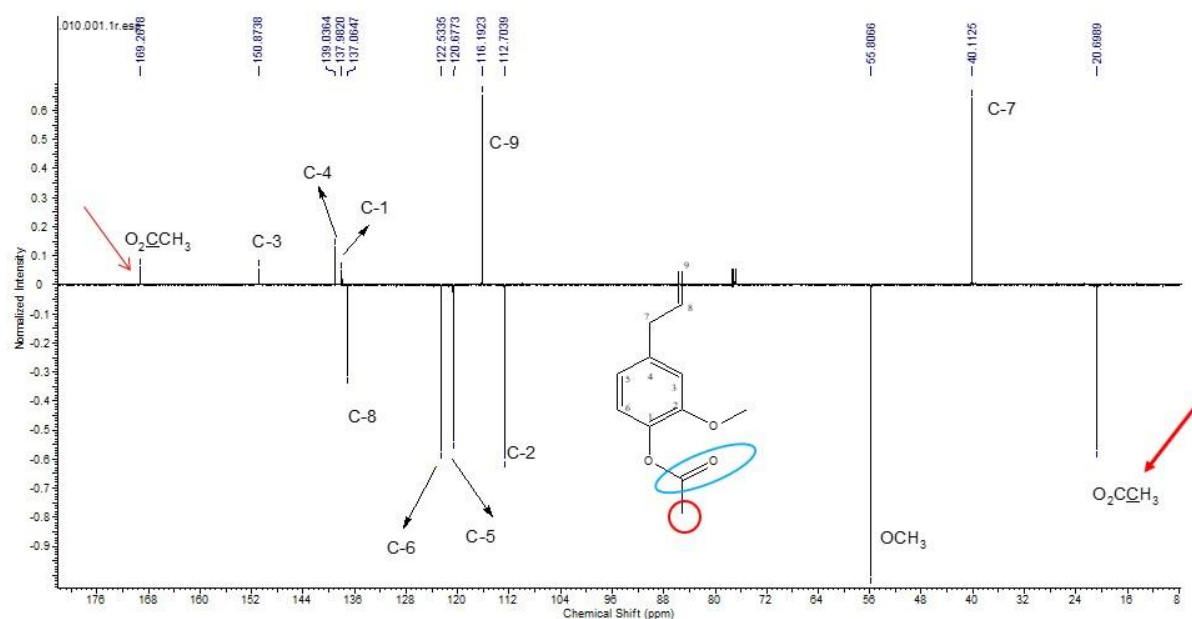
Derivados	$\delta_{\text{H}}$ , (Multiplicidade, <i>J</i> ); $\delta_{\text{C}}$ :
Acetato de carvacrila	$\delta_{\text{H}}$ : 7.20 (d, 8.0 Hz, H-3), 7.06 (brd, 8.0 Hz, H-4), 6.91 (brs, H-6), 2.93 (sept, 7.0 Hz, H-7), 2.35 (s, H-10), 2.19 (s, O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ), 1.28 (d, 7.0 Hz, H-8, H-9); $\delta_{\text{C}}$ : 169.8 (O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ), 149.3 (C-1), 148.3 (C-5), 127.5 (C-2), 130.8 (C-3), 124.2 (C-4), 119.8 (C-6), 33.6 (C-7), 23.8x2 (C-8, C-9), 20.9 (O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ), 15.7 (C-10).
Acetato de timila	$\delta_{\text{H}}$ : 7.6 (d, 8.0 Hz, H-3), 7.16 (brd, 8.0 Hz, H-4), 6.8 (brs, H-6), 3.01 (sept, 7.0 Hz, H-7), 2.25 (s, H-10 e O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ) e 1.23 (d, 7.0 Hz, H-8, H-9); $\delta_{\text{C}}$ : 170.0 (O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ), 148.0(C-1), 137.0 (C-2), 136.6 (C-5), 127.2 (C-4), 126.4 (C-3), 122.7 (C-6), 27.6 (C-7), 22.8x2 (C-8, C9), 20.6 (C-10), 20.7 (O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ).
Acetato de eugenila	$\delta_{\text{H}}$ : 6.97 (brd, 8.0 Hz, H-6), 6.82 (brs, H-2), 6.79 (brd, 8.0 Hz, H-5), 5.98 (m, H-8), 5.14 (brd, 16 Hz, H-9a) 5.12 (brd, 10 Hz, H-9b), 3.85 (s, OCH <sub>3</sub> ), 3.40 (d, 7.0 Hz, H-7) e 2.31 (s, O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ). $\delta_{\text{C}}$ : 169.5 (O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ), 150.8 (C-3) 138.9 (C-4), 137,5 (C-1), 137.0 (C-8), 122.6 (C-6), 120.6 (C-5), 116.0 C-9), 112.1 (C-2), 55.9 (OCH <sub>3</sub> ), 40.2 (C7), 20.7 (O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ).



**Figura 3** – Espectro de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C para confirmação do processo de acetilação do timol.



**Figura 4** – Espectro de de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C para confirmação do processo de acetilação do carvacrol.



**Figura 5** – Espectro de de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  para confirmação da acetilação do eugenol.

### 3.2 Atividade carrapaticida das substâncias testadas

O carvacrol foi a única substância que apresentou taxa de mortalidade com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para controle a partir do tratamento de 1,25 mg/mL, enquanto o mesmo só foi observado para todas as outras substâncias a partir da concentração de 2,5 mg/mL (Tabela 2). O carvacrol e o timol na concentração de 2,5 mg/mL ocasionaram mortalidade de 100% das larvas, sendo observado o mesmo para o acetato de carvacrila na concentração de 5 mg/mL. Para os demais tratamentos (eugenol, acetato de timila e acetato de eugenila), taxa de mortalidade de acima de 95% foi verificada nos grupos tratados com a maior concentração (10 mg/mL) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Mortalidade média e desvio padrão de larvas não ingurgitadas *Rhipicephalus microplus*, cepa Porto Alegre, tratadas com diferentes concentrações de carvacrol, timol, eugenol e seus derivados acetilados acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila em condições de laboratório  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} > 80 \pm 10\%$ .

Tratamentos (mg/mL)	Carvacrol	Acetato de carvacrila	Timol	Acetato de timila	Eugenol	Acetato de eugenila
Controle (etanol)	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0
0,312	20,8 <sup>a</sup> ±17,1	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	1,8 <sup>a</sup> ±1,8	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0
0,625	31,5 <sup>a</sup> ±22,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	2,4 <sup>a</sup> ±5,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0
1,25	69,9 <sup>b</sup> ±30,9	4,4 <sup>a</sup> ±3,5	36,9 <sup>a</sup> ±23,4	18,6 <sup>a</sup> ±14,5	5,3 <sup>ab</sup> ±6,7	13,9 <sup>ab</sup> ±7,5
2,5	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	55,1 <sup>b</sup> ±3,5	100,0 <sup>b</sup> ±0,0	51,5 <sup>b</sup> ±16,8	39,0 <sup>b</sup> ±22,6	33,6 <sup>b</sup> ±22,2
5,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>b</sup> ±0,0	56,7 <sup>b</sup> ±18,2	98,4 <sup>c</sup> ±3,7	46,3 <sup>b</sup> ±26,1
7,5	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	97,9 <sup>c</sup> ±2,5	100,0 <sup>b</sup> ±0,0	85,1 <sup>bc</sup> ±17,0	91,8 <sup>c</sup> ±16,3	53,0 <sup>b</sup> ±13,5
10,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>b</sup> ±0,0	98,0 <sup>c</sup> ±3,5	99,2 <sup>c</sup> ±1,8	94,2 <sup>c</sup> ±15,2
15,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>b</sup> ±0,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0	100,0 <sup>c</sup> ±0,0

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%. Teste Kruskal Wallis/Student Newman Keulls.

O carvacrol apresentou os menores valores de  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$  (0,83 e 2,02 mg/mL), seguidos por timol (1,26 e 2,21 mg/mL), acetato de carvacrila (2,49 e 4,21 mg/mL), eugenol (2,77 e 5,35 mg/mL), acetato de timila (2,97 e 8,52 mg/mL) e acetato de eugenila (4,25 e 13,10 mg/mL). Nesta análise comparativa dos valores de  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$ , os derivados acetilados (acetato de timila, acetato de carvacrila e acetato de eugenila) apresentaram valores maiores que os observados para as respectivas substâncias precursoras (timol, carvacrol e eugenol), sem sobreposição nos intervalos de confiança, indicando maior atividade das substâncias precursoras (Tabela 3).

**Tabela 3** – Concentração letal ( $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$ ) do carvacrol, timol e eugenol e seus derivados acetilados (acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila) sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, cepa Porto Alegre, em condições de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} > 80 \pm 10\%$ ).

Compostos	$\text{CL}_{50}$ (mg/mL)	CI-95	$\text{CL}_{90}$ (mg/mL)	CI-95	Valor de P
	0,83		2,02		<0,05
Carvacrol		0,73-0,95		1,67-3,01	<0,05
Acetato de carvacrila	2,49	2,26-2,74	4,21	3,67-5,56	
Timol	1,26	1,14-1,40	2,21	1,89-3,05	<0,05
	2,97		8,52		<0,05
Acetato de timila		2,62-3,38		7,14-12,22	



Eugenol	2,77	2,49-3,08	5,35	4,66-7,09	<0,05
Acetato de eugenila	4,25	3,74-4,83	13,10	10,72-19,75	<0,05

Análise de Probit para o cálculo da CL<sub>50</sub>.

Valor de P < 0,05.

## 4 DISCUSSÃO

A busca por análogos de substâncias obtidas de plantas a partir de processos de derivatizações tem se mostrado uma abordagem atrativa para seleção de substâncias bioativas com potencial para o controle pragas, uma vez que em certos casos, as substâncias análogas têm apresentado eficácia superior ao verificado para seus precursores (JACK et al., 2006; CONCEPCIÓN et al., 2013; SCOTTI et al., 2014). Tal fato evidencia que modificações na estrutura da molécula podem potencializar sua atividade, fato já verificado em outros estudos com carrapatos (FERRARINI et al., 2008). O presente estudo apresenta dados de uma análise comparativa a respeito da atividade do carvacrol, timol, eugenol e seus derivados acetilados sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*.

As substâncias utilizadas como precursoras para obtenção dos compostos apresentaram elevada atividade carrapaticida, fato que já era esperado, uma vez que a atividade do carvacrol (SENRA et al., 2013a; CRUZ et al., 2013), timol (SCORALIK et al., 2012; MATOS et al., 2014) e eugenol (MONTEIRO et al., 2012; VALENTE et al., 2014) já foi bem documentada para larvas desse ixodídeo. Entre essas substâncias, no presente estudo, o carvacrol foi a que apresentou melhor atividade, seguido do timol e eugenol.

Com relação a comparação entre a atividade do carvacrol e timol sobre carrapatos, tem sido encontrado dados divergentes na literatura. Cruz et al. (2013) verificaram que o carvacrol apresentou maior atividade do que o timol sobre larvas de *R. microplus*. Contudo, Araújo et al. (2016) verificaram que o timol e carvacrol apresentaram atividades similares sobre larvas desse mesmo ixodídeo. Novato et al. (2015) verificaram que o timol apresentou atividade superior ao carvacrol sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888) e *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897). Essas diferenças podem estar relacionadas com diferenças na metodologia, tipo do solvente, procedência das substâncias e diferenças de susceptibilidade entre populações de carrapatos. Entretanto, embora exista divergência entre a ordem de atividade nos diferentes estudos, cabe destacar que todos os autores que investigaram o efeito do timol e carvacrol sobre carrapatos, concluíram que ambos apresentam grande potencial para o desenvolvimento de formulações carrapaticidas.

Essa diferença de atividade entre timol e carvacrol também foi verificada em estudos com outros organismos, como por exemplo as bactérias. Friedman et al. (2002), avaliaram o efeito desses compostos sobre *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella enterica* e, verificaram que o carvacrol exibiu atividade superior ao timol. Entretanto, em estudos realizados por Didry et al. (1994) com bactérias do gênero *Streptococcus* e *Prevotella*, a atividade do timol foi superior à do carvacrol.

Entre as substâncias utilizadas como precursoras para os compostos acetilados, o eugenol foi a que apresentou menor atividade em relação ao timol e carvacrol, fato também observado para larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (ARAÚJO et al., 2016) e larvas e ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* (SENRA et al. 2013a). A menor atividade do eugenol em relação ao carvacrol e o timol também já foi

verificada em estudos com outros artrópodes, como *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (HUMMELBRUNNER & ISMAN, 2001) *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (PAVELA, 2010) e *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (SINGH et al., 2009).

No procedimento clássico de acetilação, para os três compostos, foram identificados os sinais dos grupos metílicos da acetoxila de cada produto, confirmando a incorporação do grupo acetila nos grupos fenólicos. Os dados de RMN <sup>1</sup>H desses derivados estão registrados na literatura (BEM ARFA et al., 2006; CARRASCO et al., 2008; NUMPAQUE et al., 2011).

Com relação aos testes com as substâncias análogas, todas apresentaram a mesma ordem de atividade verificada para as moléculas precursoras, com menor valor de CL<sub>50</sub> para o acetato de carvacrila, seguido do acetato de timila e acetato de eugenila. Para essas duas últimas substâncias, esse é o primeiro relato de atividade sobre larvas de carrapatos.

O acetato de carvacrila, derivado mais ativo no presente estudo, foi observado como constituinte mais abundante do óleo volátil de *Duchesnea indica* (Rosaceae) (UMESH; TROPIL, 2014). A sua atividade já foi demonstrada sobre bactérias (NIKUMBH et al., 2003), helmintos (MORAES et al., 2013) e carrapatos (CONCEPCIÓN et al., 2013). De acordo com Nikumbh et al. (2003) a atividade bactericida do acetato de carvacrila foi superior a atividade de seu precursor carvacrol. No entanto, em teste com ovos do nematoide *Haemonchus conturtus* (Rudolphi, 1803), Andre et al. (2016) observaram o contrário, com maior atividade do carvacrol, quando comparado ao acetato de carvacrila, semelhante ao observado no presente estudo para larvas de *R. microplus*.

Uma observação a parte deve ser feita a respeito dos resultados obtidos por Concepción et al. (2013). Esses autores investigaram o efeito do carvacrol e do acetato de carvacrila sobre larvas de *R. microplus*, e após os testes, foi verificada mortalidade de 35 e 67% para carvacrol e acetato de carvacrila, na concentração de 1%, respectivamente. Com base nesses resultados, esses autores concluíram que o derivado acetilado foi o mais ativo. Entretanto, esse resultado pode estar relacionado a baixa atividade carrapaticida do carvacrol encontrada nesse estudo, fato incomum e que difere de outros trabalhos que avaliaram a atividade desse monoterpene sobre larvas de carrapatos. Senra et al. (2013), Cruz et al. (2013) e Araújo et al. (2016) observaram que o carvacrol em concentrações inferiores a 1% resultaram em mortalidade superior a 90% de larvas de *R. microplus*.

O acetato de timila, apontado como um dos constituintes nos óleos essenciais de *Lippia multiflora* (Verbanaceae) (JULIANI et al., 2008) já teve sua atividade antimicrobiana e inseticida documentada na literatura (JACK et al., 2006; MATHELA et al., 2010; SCOTTI et al., 2014). Mathela et al. (2010), em testes com *Streptococcus mutan*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*, verificaram que a atividade do acetato de timila foi superior à do timol. O mesmo foi verificado por Jack et al. (2006) ao avaliarem a eficácia do acetato de timila e do timol contra *Anopheles* sp. No entanto, em outro estudo foi verificado que o timol apresentou melhor atividade do que o seu derivado acetilado sobre ovos e adultos do nematoide *H. conturtus* (ANDRE et al., 2017), como foi observado no presente trabalho sobre larvas de *R. microplus*.

O acetato de eugenila é encontrado, geralmente, em pequenos teores, nos óleos voláteis de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae) (SCHMIDT et al., 2006) e *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) (BARBOSA et al., 2012) e sua atividade já foi demonstrada para ácaros e insetos (KIM et al., 2003a; KIM et al., 2003b; PASAY et al., 2010; KAFLE; SHIH 2013; PANDEY et al., 2013). Em experimentos realizados com larvas de *A. aegypti* foi verificado que o acetato de eugenila apresentou maior atividade do que o eugenol (PANDEY et al., 2013). O mesmo foi verificado em estudos com testes de atividade dessas substâncias sobre os ácaros *Sarcoptes scabiei* (De Geer, 1778) (PASAY et al., 2010). Porém em estudos realizados com os ácaros

*Dermatophagoides farinae* (Hughes, 1961), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897) e *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781) a atividade do eugenol foi melhor que do acetato de eugenila (KIM et al., 2003ab), como encontrado para larvas de *R. microplus* no presente estudo.

Devido ao fato das substâncias análogas (acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila) terem apresentado menor atividade em relação as substâncias precursoras (carvacrol, timol e eugenol), pode-se sugerir que a substituição do átomo de hidrogênio do grupo hidroxila (-OH) do timol, carvacrol e eugenol, pelo grupo acetato, ocasionou a redução da atividade desses compostos fenólicos sobre larvas de *R. microplus*. Ultee et al. (2002) mencionam que o grupo hidroxila e a presença de um sistema de elétrons deslocalizados são relevantes para a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, tais como o carvacrol, timol e eugenol. Perruci et al. (1995) consideraram que a presença de hidroxila fenólica livre na estrutura confere maior atividade a compostos fenólicos. Muitos estudos demonstram que o processo de acetilação pode potencializar a atividade dessas substâncias, porém, pode ocorrer variação dos resultados de acordo com o organismo e estágio de desenvolvimento.

Estudos demonstram que essa diferença entre os resultados encontrados para compostos precursores e derivados acetilados pode variar não somente de acordo com a espécie, mas também entre estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie. Andre et al. (2016) avaliaram a eficácia de carvacrol e seu derivado acetilado sobre diferentes estágios de desenvolvimento de *H. contortus* e constataram que a atividade do carvacrol sobre os ovos é maior que do acetato de carvacrila, contudo para larvas desse nematoide, a atividade das duas substâncias foi semelhante, e por último, para redução na mobilidade de indivíduos adultos, a ação do acetato de carvacrila foi quase duas vezes melhor que a do carvacrol. Em outro estudo sobre o mesmo nematoide, foi observado que o timol foi mais eficaz contra ovos e adultos, enquanto para larvas, a atividade do timol e acetato de timila foi similar (ANDRE et al., 2017).

Andre et al. (2016) realizando testes com camundongos, verificaram que o acetato de carvacrila foi menos tóxico que o carvacrol. O mesmo foi verificado por Andre et al. (2017), em relação a toxicidade do acetato de timila e o timol sobre camundongos. De acordo com Moraes et al. (2013), a baixa toxicidade das substâncias acetiladas está relacionada a substituição da hidroxila pelo grupo acetato. Outro aspecto importante dessas substâncias acetiladas é o fato de possuírem maior lipossolubilidade (ANDRE et al., 2016), segundo alguns autores, essa característica pode facilitar a penetração através da cutícula dos parasitos (LANUSSE; PRICHARD, 1993). Assim, a menor toxicidade para mamíferos e a maior lipossolubilidade dos derivados acetilados são aspectos positivos que podem compensar a menor atividade que os derivados acetilados apresentaram para *R. microplus*.

Os dados de mortalidade ocasionados pelos acetatos, somado aos aspectos positivos mencionados anteriormente, evidenciam o potencial desses compostos para o desenvolvimento de formulações para o controle de carrapatos, especialmente para o acetato de carvacrila, que entre os derivados acetilados, foi o composto que apresentou melhor atividade. Além disso, a atividade desse composto ainda pode ser potencializada a partir da associação com possíveis sinérgicos, fato já demonstrado para o carvacrol associados a outros compostos de origem vegetal (ARAÚJO et al., 2016), e/ou com o desenvolvimento de formulações farmacotécnicas, como foi demonstrado por Lima et al. (2017), com o nanoencapsulamento do carvacrol.

Em estudo realizado por Andre et al. (2016), a atividade do acetato de carvacrila também foi demonstrada em teste *in vivo*, com administração de 250 mg/kg de acetato de carvacrila em ovelhas, sendo realizado apenas um único tratamento, para o controle de *H. contortus*. Esses autores observaram que esse composto ocasionou redução de OPG (ovos por grama de fezes)

em 66%, além de não apresentar toxicidade para os animais. Mais um aspecto que reforça o potencial do acetato de carvacrila.

Assim, podemos concluir que as substâncias carvacrol, timol e eugenol, bem como seus derivados acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila apresentaram atividade sobre larvas de *R. microplus*. Porém, os derivados acetilados demonstraram atividade inferior aos seus precursores carvacrol, timol e eugenol. Entre os derivados acetilados, o acetato de carvacrila foi o que apresentou melhor atividade no controle de *R. microplus*, sendo assim, um bom candidato para futuros experimentos visando o desenvolvimento de carrapaticidas alternativos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRE, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C.; CAVALCANTE, G.S.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; FREITAS, R.M.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V.; BEVILAQUA, C.M.L. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, vol. 218, p. 52 – 58, 2016.

ANDRE, W.P.P.; CAVALCANTE, G.S.; RIBEIRO, W.L.C.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V.; BEVILAQUA, C.M.L. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 323-330, 2017.

ARAUJO, L. X.; NOVATO, T.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D. R.; SILVA, B. C.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol on larvae of cattle tick, *Rhipicephalus microplus* and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 377-382, 2016.

AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D. L. & SANTOS A. S. 2007. BioEstat 3.0. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil de Mamirauá, Belém.

BANUMATHI, B.; VASEEHARAN, B.; RAJASEKAR, P.; PRABHU, N.M.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, K.; CANALE, A.; BENELLI, G. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 102 – 110, 2017.

BARBOSA, J.D.; SILVA, V.B.; ALVES, P.B.; GUMINA, G.; SANTOS, R.L.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1478-1483, 2012.

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 43, p. 149-154, 2006.

BORGES, L.M.F; SOUSA, L.A.D; BARBOSA C.S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** v.20, p. 89–96, 2011.

CARRASCO, A.; ESPINOZA, C.; CARDILE, V.; GALLARDO, C.; CARDONA, W.; LOMBARDO, L.; CATALÁN, M.; CUELLAR, F.; RUSSO, A. Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 543–548, 2008.

CARVALHO A.F.; MELO V.M.; CRAVEIRO A.A.; MACHADO M.I.; BANTIM M.B.; RABELO E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 98, n.4, p. 569–571, 2003.

CONCEPCIÓN, R.L.; FROYLÁN, I.V.; HERMINIA, I.P.M.; NORBERTO, M.A.; HÉCTOR, J.S.Z.; YENIEL, G.C. In vitro assessment of the acaricidal activity of computerselected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n.2, p. 251-257, 2013.

CRUZ, E.M.O.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.A.; ARAUJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198– 202, 2013.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.69, p. 25-28, 1994.

EL-DIN, AT. Molluscicidal effect of three monoterpenes oils on schistosomiasis and fascioliasis vector snails in Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.36, p. 599-612, 2006.

FERRARINI, S.R.; DUARTE, M.O.; DA ROSA, R.G.; ROLIM, V.; EIFLER-LIMA, V.L.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V.L.S. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and  $\beta$ amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p.149–153, 2008.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MANDRELL, R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella entérica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.10, p.1545–1560, 2002.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R. & PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, n.159, 2007.

HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.163, n.3, p. 137–143, 2007.

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.715-720, 2001.

JACK, I.R.; OKOROSAYE-ORUBITE, K.; BOBMANUEL, R.B. Assessment of the larvicidal potentials of thymol derivatives on *Anopheles* mosquitoes. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 10, p. 63-65, 2006.

JULIANI, H.R.; SIMON, J.E.; QUANSAH, C.; ASARE, E.; AKROMAH, R.; ACQUAYE, D.; ASANTE-DARTEY, J.; MENSAH, M.L.K.; FLEISCHER, T.C.; DICKSON, R. Chemical diversity of *Lippia multiflora* essential oils from West Africa. **Journal of Essential Oil Research**, v.20, p.49-54, 2008.

KAFLE, L.; SHIH, C.J. Toxicity and repellency of compounds from clove (*Syzygium aromaticum*) to red imported fire ants *Solenop sisinvicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v.106, p. 131-135, 2013.

KIM, E.H.; KIM, H.K.; AHN, Y.J. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari) Pyroglyphidae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.885–889, 2003a.

KIM, E.H.; KIM, H.K.; CHOI, D.H.; AHN, Y.J. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). **Applied Entomology and Zoology - Journals**, v. 38, p. 261–266, 2003b.

KISS, T.; CADAR, D.; SPINU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Veterinary Parasitology**, v.187, p. 357-366, 2012.

KNIO, K.M.; USTA, J.; DAGHER, S.; ZOURNAJIAN, H.; KREYDIYYEH, S. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 763-768, 2008.

LANUSSE, C.E.; PRICHARD, R.K. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. **Veterinary Parasitology**, v. 49, p. 123-158, 1993.

LIMA, A.S.; MACIEL, A.P.; MENDONÇA, C.J.S.; COSTA-JÚNIOR, L.M. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 190–194, 2017.

MATHELA, C.S.; SINGH, K.K.; GUPTA, V.K. Synthesis and *In Vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v. 67, p.375-380, 2010.

MATOS, R.S.; MELO, D.R.; MONTEIRO, C.M.O.; ZERINGOTA, V.; SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; PRATA, M.C.A.; DAEMON, E. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari:

Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, v.113, p. 669673, 2014.

MIAO, F.; YANG, X.J.; MA, Y.N.; ZHENG, F.; SONG, X.P.; ZHOU, L. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their in vitro acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.60, n. 12, p. 1508-13, 2012.

MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; CALMON, F.; SENRA, T.O.S.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111, p.1295–1300, 2012.

MORAES, J.; CARVALHO, A.A.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.A.; MARQUES, T.H.; ANDRADE, L.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v.112, n. 2, p. 603-610, 2013.

NIKUMBH, V.P.; TARE, V.S.; MAHULIKAR, P.P. Eco-friendly pest management using monoterpenoids – III: Antibacterial efficacy of carvacrol derivatives. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.62, p. 1086-1089, 2003.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, A.; PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 519–523, 2007.

NOVATO, T.; ARAUJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*) -cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 331-335, 2015.

NUMPAQUE, M.A.; OVIEDO, L.A.; GIL, J.H.; GARCÍA, C.M.; DURANGO, D.L. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum trichumacutatum* and *Botryodiplodia heobromae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 136, p. 3-13, 2011.

PANDEY, S.K.; TANDON, S.; AHMAD, A.; SINGH, A.K.; TRIPATHI, A.K. Structure–activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v.69p. 1235–1238, 2013.

PASAY, C.; MOUNSEY, K.; STEVENSON, G.; DAVIS, R.; ARLIAN, L.; MORGAN, M.; VYSZENSKI-MOHER, D.; ANDREWS, K.; MCCARTHY, J. Acaricidal Activity of eugenol based compounds against scabies mites. **Plos One**, v.5, n.8, p. 12079, 2010.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biopesticides**, v. 3, p. 573-578, 2010.

- PERRUCCI, S.; MACCHIONI, G.; CIONI, P.L.; FLAMINI, G.; MORELLI, I. Structure/activity relationship of some natural monoterpenes as acaricides against *Psoroptes cuniculi*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 8, p. 1261-1264, 1995.
- RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, 201(1-2): 128-136, 2014.
- ROBLEDO S, OSORIO E, MUÑOZ D, JARAMILLO LM, RESTREPO A, ARANGO G, VELEZ I. *In vitro* and *in vivo* cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemi synthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.1652-1655, 2005.
- SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S.A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.98, p. 89–93, 2010.
- SCHMIDT, E.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ELLER, G.A.; STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; GEISSELER, M. Composition and antioxidant activities of the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) leaves from Sri Lanka. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 9, n.2, p. 170-182, 2006.
- SCORALIK, M.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, v.110, n. 2, p. 645-648, 2012.
- SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; SILVA, V.B.; SANTOS, S.R.L.; CAVALCANTI, S.C.H.; MENDONÇA, F.B.M.J.R. Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.10, n. 2, p. 201-210, 2014.
- SENRA, T.O.S.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p.1461–1466, 2013 a.
- SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; MATOS, R. S.; MELO, D.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p. 3471-6, 2013b.
- SINGH, R.; KOUL, O.; RUP, P.J.; JINDAL, J. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.29, n.2, p. 93–101, 2009.
- STONE, B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v.53, p. 563–578, 1962.



UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; MAZA, P.K.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; ALVIANO, D.S.; ROSA, M.S.S.; LOPES, A.H.C.S.; ALVIANO, C.S.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 1561–1568, 2002.

UMESH, B.T.; THOPPIL, J.E. Comparison of chemical constituents of tissue cultured and field grown plants of *Duchesnea indica*, (Andr.) Focke. **Journal Pharmacognosy Phytochemistry**, v.3, p. 68-70, 2014.

VALENTE, P.P.; AMORIM, J.M.; CASTILHO, R.O.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, M.F.B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.113, p. 417–423, 2014.

WILLIAMS, L.A.D.; SIMPSON, G.; JACKSON, Y. Antifertility effects of naturally occurring phenyl propanoid derivatives against *Boophilus microplus*. **Tropical Science**, v. 37, n. 2, p. 85-87, 1997.

## CAPÍTULO II

### **AValiação de Sinergismo e Desenvolvimento de Formulação com Timol, Carvacrol e Eugenol para o Controle de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888)**

## RESUMO

O presente estudo avaliou a atividade acaricida das combinações entre timol, carvacrol e eugenol, bem como verificou a eficácia das combinações incorporadas a uma formulação sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. A primeira etapa avaliou as substâncias isoladas nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5 e 25 mg/mL. Em seguida foram realizados testes com as substâncias combinadas na proporção de 1:1 de timol + carvacrol, carvacrol + eugenol, timol + eugenol nas concentrações de 3,125; 6,25 mg/mL, além do grupo controle tratado com o solvente. Na segunda etapa, foram testadas as combinações incorporadas a formulação, na concentração de 6,25 mg/mL, utilizando o teste de pacote de larvas e imersão de fêmeas. Nas associações não formuladas carvacrol + timol (3,125 mg/mL); carvacrol + eugenol e timol + eugenol (6,25 mg/mL) apresentaram efeito sinérgico, enquanto as demais associações apresentaram efeito aditivo. Nos experimentos com as formulações, foi verificado 100% de mortalidade em todas as combinações nos testes com larvas, porém nos experimentos com fêmeas, a eficácia no tratamento foi inferior a 15%. Desta forma pode-se concluir que a combinação de timol + carvacrol (3,125 mg/mL), carvacrol + eugenol e eugenol + timol (6,25 mg/mL) possui efeito sinérgico sobre fêmeas ingurgitadas, contudo, quando incorporadas na formulação proposta no presente estudo, apresentaram elevada atividade para larvas e baixa atividade para fêmeas. Este é o primeiro estudo para determinar a interação entre timol, carvacrol e eugenol sem e com substâncias associadas incorporadas a formulação sobre fêmeas de *Rhipicephalus microplus*.

**Palavras-chave:** *Rhipicephalus microplus*, controle, produtos naturais, monoterpenos, fenilpropanóides, efeito sinérgico.

## ABSTRACT

The acaricidal activity of combinations of thymol, carvacrol and eugenol was evaluated on larvae and engorged females of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. The first step assessed the substances alone, in concentrations of 3.125, 6.25, 12.5 and 25 mg/mL. Then tests were performed with the substances combined in the ratio of 1:1 of thymol + carvacrol, carvacrol + eugenol and thymol + eugenol at concentrations of 3.125 and 6.25 mg/mL, along with the control group treated with the solvent (3% DMSO). In the second step, combinations were tested incorporated in a formulation at the concentration de 6.25 mg/mL, using the larval packet and female immersion tests. The associations without formulation of carvacrol + thymol (3.125 mg/mL), carvacrol + eugenol and thymol + eugenol (6.25 mg/mL) presented a synergistic effect, while the other associations had an additive effect. In the experiments with the active substances included in the formulation, all the combinations caused 100% larval mortality, but the efficacy was under 15% against engorged females. Therefore, the combinations of thymol + carvacrol (3.125 mg/mL) as well as carvacrol + eugenol and eugenol + thymol (6.25 mg/mL) had a synergistic effect on engorged females, but when incorporated in the formulation proposed in the study, the activity was strong against larvae but weak against females. This is the first report of a study to determine the interaction of thymol, carvacrol and eugenol, with and without other substances incorporated in a formulation, for control of *R. microplus* females.

**Keywords:** *Rhipicephalus microplus*, control, natural products, monoterpenes, phenylpropanoids, synergistic effect.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século passado, pesquisadores vêm buscando alternativas para o controle do carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae), devido ao grande prejuízo econômico que este ixodídeo causa aos sistemas de produção de leite e carne, em diferentes regiões do mundo (Furlong et al., 2004; Martins et al., 2006; Pereira, 2008). No Brasil, estimativas apontam perdas em torno de 3,24 bilhões de dólares por ano (Grisi et al., 2014).

Existem registros de populações desse carrapato resistentes a todas as bases químicas disponíveis para o seu controle (Reck et al., 2014), o que evidencia a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para realizar o manejo e o controle de *R. microplus*. As substâncias de origem vegetal têm se mostrado alternativa promissora no controle desses ectoparasitos, por apresentarem propriedades biocidas (Regnault-Roger e Philogene, 2008), e ao mesmo tempo serem consideradas *eco-friendly*, uma vez que permanecem pouco tempo no ambiente (alta biodegradabilidade), além de que muitas delas constituem-se em complexos químicos que podem limitar a seleção de indivíduos resistentes (Miresmailli et al., 2006).

O timol e carvacrol são monoterpenos voláteis presente nos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris*.), orégano (*Origanum vulgare*) e do “alecrim-pimenta” (*Lippia sidoides*), espécies

pertencentes as famílias Lamiaceae e Verbenaceae (Pengelly, 2004; Neves, 2009). O eugenol é um fenilpropanoide, comumente encontrado no cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), folha de louro (*Laurus nobilis*) e noz-moscada (*Myristica fragrans*), pertencente as plantas aromáticas da família Myrtaceae (Pengelly, 2004; Neves, 2009). As atividades do timol, carvacrol e eugenol já foram evidenciadas sobre diferentes espécies de carrapatos (Novelino et al., 2007; Cetin et al., 2009; Daemon et al., 2009; Dolan et al., 2009; Monteiro et al., 2009; Monteiro et al., 2010; Mendes et al., 2011; Daemon et al., 2012; Senra et al., 2013 a, b; Valente et al., 2014).

Estudos demonstram que a utilização combinada de substâncias de origem vegetal (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides), quando comparada ao uso isolado das mesmas, pode ser responsável por potencializar a atividade devido à ação sinérgica obtida com certas misturas (Pavela, 2010). Efeito sinérgico a partir de associações dessas substâncias já foi evidenciado, em bactérias, nematoides e insetos (Didry et al., 1994; Ntalli et al., 2011; Gallardo et al., 2012). Recentemente foi demonstrado que combinações binárias entre certos terpenos e fenilpropanóides apresentam efeito sinérgico sobre larvas dos carrapatos *R. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), *Dermacentor nitens* Neuman, 1897 e *Amblyomma sculptum* Berlesee, 1888 (Novato et al., 2015; Araújo et al., 2016), contudo, ainda não existem estudos sobre outros estágios de desenvolvimento de carrapatos.

Para melhorar o uso de substâncias com finalidade medicinal é importante a incorporação do princípio ativo a uma formulação (Allen et al., 2007). Isso é fundamental para garantir a estabilidade do produto, prevenir a degradação e a contaminação microbiológica, além de melhorar a ação do princípio ativo, facilitar a aplicação e aumentar do período de permanência do produto no corpo do animal (Ferreira et al., 2017). Já foram conduzidos estudos em condições de laboratório, avaliando a atividade do timol incorporada em formulações, sobre *R. sanguineus* s.l. (Delmonte et al., 2017) e eugenol sobre larvas de *R. microplus* (Ferreira et al., 2017), contudo, ainda não foram conduzidos estudos avaliando a eficácia desses compostos em combinação binárias, incorporados em formulações.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito das combinações binárias entre timol, carvacrol e eugenol sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como, desenvolver formulação e avaliar a eficiência destes compostos sobre larvas e fêmeas deste carrapato.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento e procedência dos carrapatos

Os testes *in vitro* com carrapatos foram desenvolvidos no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas fêmeas de uma cepa sensível de *R. microplus*, mantida através de infestações artificiais em bezerros alocados no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil. Tal procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (registro CEUA - nº 28/2015). O desenvolvimento das formulações foi realizado no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

### 2.2 Procedência das substâncias

O timol (lote SLBK5653V), carvacrol (lote MKBP5684V) e eugenol (lote MKBH9640V) foram comprados na Sigma-Aldrich®, juntamente com emissão de certificados de grau de pureza igual ou superior a 99%. Para a diluição das substâncias foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) a 3% (DMSO + água destilada - v/v).

### 2.3 Bioensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Para a avaliação das combinações binárias entre as substâncias, foi utilizado o teste de imersão de fêmeas proposto por Drummond et al. (1973). Nessa metodologia, para a formação dos grupos, os carrapatos foram separados por peso homogêneo (20 por grupo) e, em seguida, cada grupo foi imerso por cinco minutos em 5 mL das soluções testadas. Após a imersão nos tratamentos, cada fêmea foi pesada e mantida individualmente em placa de Petri para realização de oposição (cada placa = uma unidade experimental). As unidades experimentais foram acondicionadas em câmara climatizada regulada a 27°C e UR>80% por 15 dias. Após esse período a massa de ovos de cada fêmea foi pesada e acondicionada em seringas plásticas com extremidade distal cortada e vedada com algodão hidrófilo. Essas seringas foram novamente acondicionadas em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura e umidade já mencionadas, e após 20 dias foi feita a avaliação dos percentuais de eclosão das larvas (Figura 1). Os valores do peso inicial das fêmeas, peso da massa de ovos e percentual de eclosão foram utilizados na fórmula proposta por Drummond et al. (1973) para avaliação do percentual de controle.



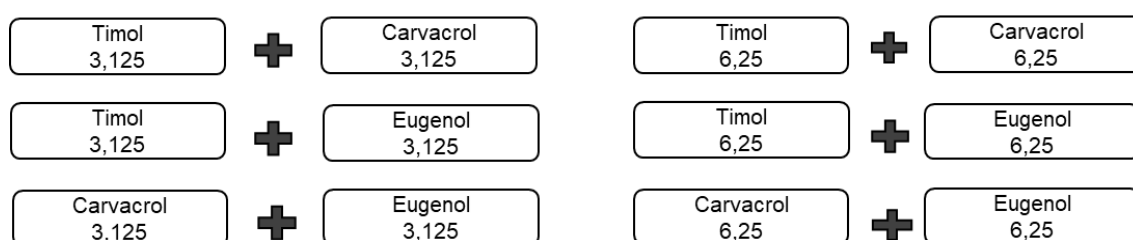
**Figura 1:** Metodologia empregada no teste de imersão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

### 2.4 Avaliação da combinação das substâncias

Para a avaliação da combinação das substâncias o teste de imersão de fêmeas foi realizado em duas etapas:

Na primeira etapa foi realizado o teste de imersão de fêmeas em um volume de 5 mL das substâncias isoladas em diferentes concentrações, para determinar a eficácia de cada uma. Timol e carvacrol foram testados, separadamente, nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5 mg/mL, enquanto o eugenol foi testado nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25 mg/mL. Além disso, foi feito um grupo controle com DMSO a 3%. Após a obtenção dos resultados dessa primeira etapa, foram escolhidas as concentrações para realização da segunda etapa do experimento.

Na segunda etapa, as substâncias foram testadas em combinações binárias, utilizando a proporção 1:1, totalizando seis combinações, sendo três combinações na concentração de 3,125 mg/mL e três na concentração de 6,25 mg/mL (timol x carvacrol; timol x eugenol; carvacrol x eugenol) (Figura 2).



**Figura 2:** Substâncias e concentrações testadas para avaliação da combinação sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

## 2.5 Desenvolvimento das formulações

Após os resultados das combinações foi desenvolvida uma formulação para a incorporação das substâncias. A formulação foi elaborada utilizando as combinações que apresentaram 100% de eficácia no teste com fêmeas ingurgitadas: timol + carvacrol (6,25 mg/mL); timol + eugenol (6,25 mg/mL) e carvacrol + eugenol (6,25 mg/mL). A fórmula-base utilizada para a incorporação dos princípios ativos constitui de uma solução etanólica à 30% a qual foi incorporada a um conservante, umectante, agente de penetração, tensoativo e cotensoativo (FERREIRA et al., 2017). Os componentes utilizados para elaboração da fórmula base utilizada para o desenvolvimento da formulação estão listados na tabela 1.

**Tabela 1** – Veículos presentes no desenvolvimento da fórmula base para a incorporação das substâncias e desenvolvimento das formulações.

Formulação	Componente	Função	Concentração
Formulação	Tween 80	Tensoativo	1 mL
	DMSO	Agente de penetração	2,5 mL
	Glicerina	Umectante	2,5 mL
	Lauril	Co-tensoativo	0,05 g
	Nipagin	Conservante	0,05 g

As substâncias combinadas foram incorporadas logo após o preparo da fórmula-base (veículos), previamente solubilizados em DMSO 3%.

## 2.6 Avaliação da eficácia das formulações por meio de teste de pacote de larvas e imersão de fêmeas ingurgitadas

Para avaliação da eficácia das formulações sobre larvas foi utilizado o teste de pacote (Stone e Haydoc, 1962), adaptado por Monteiro et al. (2012). Nesse procedimento, aproximadamente 100 larvas foram colocadas no centro de folha de papel filtro (6 x 6 cm). Em seguida, o papel filtro foi dobrado e as laterais foram fechadas com cliques binder. Posteriormente, o papel foi umedecido com 90 µL de cada lado com a solução testada, totalizando 180 µL. Os grupos foram acondicionados em câmaras climatizadas (27±1°C e UR>80±10), sendo utilizadas diferentes câmaras climatizadas para cada grupo. Após 24 horas a mortalidade das larvas foi avaliada e o percentual foi calculado através da fórmula:

$$\% M = \frac{\text{Total de larvas}}{\text{Total de larvas}} \times 100$$

Foram feitos três grupos tratados: timol + carvacrol (6,25 mg/mL + 6,25 mg/mL); timol + eugenol (6,25 mg/mL + 6,25 mg/mL) e carvacrol + eugenol (6,25 mg/mL + 6,25 mg/mL). Também foram formados dois grupos controle, um exposto a fórmula-base sem os princípios ativos e o controle exposto a água destilada. Para cada grupo (controle ou tratado) foram feitas 10 repetições.

Para avaliação sobre fêmeas ingurgitadas, foi utilizada a metodologia descrita no tópico 2.3, sendo formados grupos com as mesmas concentrações mencionadas no teste com larvas não ingurgitadas.

## 2.7 Análise dos dados

A análise estatística do peso das fêmeas, peso da massa de ovos e porcentagem de eclosão e os valores de mortalidade de larvas foram realizadas utilizando o software Biostat versão 5.0. Os valores percentuais foram transformados em  $\sqrt{\arcsen x}$ . Os valores médios de cada tratamento foram analisados por ANOVA seguidos do teste de Tukey. Para os dados que apresentaram distribuição não paramétrica, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (p <0,05).

Na avaliação do efeito das combinações foram utilizados os valores do percentual de controle dos tratamentos com as substâncias isoladas e associadas, para cálculo do Índice de Combinação (IC), utilizando o software CompuSyn® versão 1.0 (Chou e Martin, 2005). Os efeitos das combinações foram classificados de acordo com os resultados do índice de combinação (IC), seguindo as categorias propostas por Chou (2006) e adaptadas por Novato (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação do efeito da associação de substâncias de origem vegetal de acordo com os resultados do Índice de Combinação (IC), utilizando o programa CompuSyn® versão 1.0 (CHOU; MARTIN, 2005). Classificação adaptada por Novato et al., (2015).

Índice de Combinação (IC)	Efeito
---------------------------	--------



< 0,70	Sinergismo
0,70-0,90	Sinergismo moderado
0,90-1,10	Aditivo
1,10-1,45	Antagonismo moderado
>1,45	Antagonismo

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação de sinergismo

No teste com as substâncias isoladas, o carvacrol e o timol ocasionaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) do peso da massa de ovos a partir da concentração de 12,5 mg/mL, sendo observados valores de 0,0 e 7,2 mg, respectivamente, enquanto no controle o peso médio da postura das fêmeas foi de 122,8 mg. Para o eugenol, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas somente com a concentração 25 mg/mL, que inibiu completamente a postura das fêmeas. (Tabela 3). Com relação ao percentual de eclosão, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com carvacrol e timol a partir da concentração de 6,25 mg/mL, com valores de 42,6 e 43,7%, respectivamente, enquanto no controle, o percentual de eclosão foi de 90,6%. Para o eugenol, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram verificadas a partir da concentração de 12,5 mg/mL (43,7%). O carvacrol e timol apresentaram atividade semelhantes, com percentual de controle de 36,9 e 35,1% na concentração de 3,125 mg/mL, respectivamente, chegando a 100% na concentração de 12,5 mg/mL, enquanto o eugenol, na menor concentração, apresentou eficácia de 2,4%, alcançando 100% somente na concentração de 25 mg/mL (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores referentes a média e desvio padrão do peso inicial das fêmeas (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas (mg), percentuais de eclosão larval (%) e percentual de controle (%) de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes concentrações de carvacrol, timol e eugenol, sob condições de laboratório ( $27\pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $80\pm 10\%$ ).

Substância	Concentração	Peso inicial da fêmea (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão das larvas (%)	Percentual de controle (%)
DMSO 3%	Controle	213,4 <sup>a</sup> ±21,3 (10)	122,8 <sup>a</sup> ±15,0	90,6 <sup>a</sup> ±15,4	
Carvacrol	3,125 mg/mL	212,7 <sup>a</sup> ±34,6 (10)	103,3 <sup>a</sup> ±45,4	67,8 <sup>ab</sup> ±37,5	36,9
	6,25 mg/mL	216,2 <sup>a</sup> ±29,1 (10)	60,5 <sup>ab</sup> ±59,3	42,6 <sup>b</sup> ±32,5	77,1
	12,5 mg/mL	215,9 <sup>a</sup> ±24,2 (10)	0,0 <sup>b</sup> ±0,0	...	100,0
Timol	3,125 mg/mL	216,0 <sup>a</sup> ±61,1 (10)	97,4 <sup>a</sup> ±58,8	75,8 <sup>ab</sup> ±14,8	35,1
	6,25 mg/mL	214,9 <sup>a</sup> ±57,1 (10)	49,7 <sup>ab</sup> ±57,9	43,7 <sup>b</sup> ±20,2	80,9
	12,5 mg/mL	216,2 <sup>a</sup> ±44,3 (10)	7,24 <sup>b</sup> ±15,5	0,0*±0,0	100,0
Eugenol	3,125 mg/mL	214,3 <sup>a</sup> ±21,7 (10)	115,4 <sup>a</sup> ±20,3	94,4 <sup>a</sup> ±3,24	2,4
	6,25 mg/mL	213,2 <sup>a</sup> ±19,0 (10)	95,4 <sup>a</sup> ±38,8	75,7 <sup>ab</sup> ±14,29	34,9
	12,50 mg/mL	213,3 <sup>a</sup> ±15,9 (10)	53,7 <sup>ab</sup> ±45,6	43,7 <sup>b</sup> ±24,6	78,8
	25 mg/mL	214,4 <sup>a</sup> ±38,3 (10)	0,0 <sup>b</sup> ±0,0	...	100,0

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%;

\* – Análise estatística não realizada devido ao tamanho insuficiente da amostra (menos de três fêmeas ingurgitadas realizaram postura); ...

- Dado não coletado devido a ausência de postura no tratamento.

Nos experimentos com combinações binárias, todos os tratamentos causaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) no peso da massa de ovos das fêmeas ingurgitadas. Redução significativa ( $p < 0,05$ ) também foi observada no percentual de eclosão, com valores de 11,8 e 47,5% nas combinações entre carvacrol + timol (3,125 mg/mL) e carvacrol + eugenol (3,125 mg/mL), respectivamente, enquanto no controle o percentual foi de 84,5%. Nos tratamentos com a concentração de 6,25 mg/mL, não foi possível avaliar o percentual de eclosão, pois as fêmeas não realizaram postura em nenhum dos grupos. A associação carvacrol + timol apresentou melhor atividade, com percentual de controle de 96,1%, na concentração de 3,125 mg/mL, enquanto as associações carvacrol + eugenol e timol + eugenol apresentaram percentual de controle abaixo de 70% nessa mesma concentração. Todas as combinações testadas na concentração de 6,25 mg/mL apresentaram 100% de eficácia. (Tabela 4).

**Tabela 4** – Valores referentes a média e desvio padrão do peso inicial das fêmeas (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas (mg), percentuais de eclosão larval (%) e percentual de controle (%) de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com associação binárias entre carvacrol, timol e eugenol, em diferentes concentrações, sob condições de laboratório (27±1°C e UR 80±10%). Média ± desvio padrão.

Substância	Concentração	Peso inicial da fêmea (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão larvas (%)	Percentual de controle (%)
DMSO 3%	Controle	213,7 <sup>a</sup> ±20,2	119,8 <sup>a</sup> ±17,0	84,5 <sup>a</sup> ±24,5	
Carvacrol + Timol	3,125 + 3,125 mg/mL	213,6 <sup>a</sup> ±28,9	33,3 <sup>b</sup> ±34,8	11,8 <sup>b</sup> ±28,5	96,1 100
	6,25 + 6,25 mg/mL	213,4 <sup>a</sup> ±22,27	0,0 <sup>b</sup> ±0,00	...	
Carvacrol + Eugenol	3,125 + 3,125 mg/mL	213,7 <sup>a</sup> ±17,2	67,5 <sup>b</sup> ±49,6	47,5 <sup>b</sup> ±37,7	68,3
	6,25 + 6,25 mg/mL	213,1 <sup>a</sup> ±40,9	0,0 <sup>b</sup> ±0,00	...	100
Timol + Eugenol	3,125 + 3,125 mg/mL	213,8 <sup>a</sup> ±13,7	47,1 <sup>b</sup> ±53,3	64,0 <sup>a</sup> ±39,9	70,3
	6,25 + 6,25 mg/mL	213,7 <sup>a</sup> ±46,2	0,0 <sup>b</sup> ±0,00	...	100

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%; ...

– Dado de percentual de eclosão não coletado devido a ausência de postura no tratamento.

Na comparação dos percentuais de controle das substâncias isoladas e associadas para cálculo de sinergismo, três combinações apresentaram  $IC < 0,70$ , sendo classificadas como sinérgicas: carvacrol + timol (3,125 mg/mL); carvacrol + eugenol (6,25 mg/mL) e timol + eugenol (6,25 mg/mL). As demais associações apresentaram efeito aditivo (Tabela 5).

**Tabela 5** – Efeito de combinações binárias das substâncias carvacrol, timol e eugenol sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em condições de laboratório ( $27\pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR}>80\pm 10\%$ ).

Subst. A	Subst. B	Conc.(mg/mL)	Percentual de controle das substâncias isoladas e combinadas				Efeito
			A	B	A+B	I.C	
Carvacrol	Timol	3,125	36,9	35,1	96,1	0,68	Sinergismo
Carvacrol	Timol	6,25	77,1	80,9	100	0,94	Aditivo
Carvacrol	Eugenol	3,125	36,9	2,4	68,3	0,95	Aditivo
Carvacrol	Eugenol	6,25	77,1	34,9	100	0,68	Sinergismo
Timol	Eugenol	3,125	35,1	2,4	70,2	0,94	Aditivo
Timol	Eugenol	6,25	80,9	34,9	100	0,69	Sinergismo

Índice de Combinação (IC) < 0,70 = sinergismo; 0,70-0,90 = sinergismo moderado; 0,90-1,10 = aditivo; 1,10-1,45 = antagonismo moderado; >1,45 = antagonismo. Não foi observado mortalidade nos grupos controle.

### 3.2 Avaliação da atividade carrapaticida da formulação

Nos testes de pacote de larvas com a formulação-base incorporada as combinações binárias de timol + carvacrol, timol + eugenol e carvacrol + eugenol na concentração de 6,25 mg/mL, o percentual de mortalidade foi de 100% em todos os tratamentos, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos controle, onde não ocorreu mortalidade de larvas (Tabela 6).

**Tabela 6** – Valores referentes à média e desvio padrão da mortalidade das larvas não ingurgitadas *Rhipicephalus microplus*, tratados com combinações binárias entre timol, carvacrol e eugenol incorporadas a formulações, em condições de laboratório  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $> 80 \pm 10\%$ .

Tratamentos (mg/mL)	Timol + Carvacrol	Timol+ Eugenol	Carvacrol + Eugenol
Controle H <sub>2</sub> O	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0
Formulação-base	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0
Formulação-base + ativos 6,25 + 6,25	100,0 <sup>b</sup> ±0,0	100,0 <sup>b</sup> ±0,0	100,0 <sup>b</sup> ±0,0

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

Nos testes com fêmeas ingurgitadas não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados e grupos controle, em nenhum dos parâmetros biológicos avaliados. Em relação aos percentuais de controle, foram observados valores próximos a 10% para todos os tratamentos (Tabela 7).

**Tabela 7** – Valores referentes à média  $\pm$  DP) do peso inicial das fêmeas (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas (mg), percentuais de eclosão larval (%) e percentual de controle (%) de *Rhipicephalus microplus*, tratados com combinações binárias entre timol, carvacrol e eugenol incorporadas a formulações, em condições de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $> 80 \pm 10\%$ ).

Substância	Concentração mg/mL	Peso inicial da massa de fêmea (mg)	Peso da ovos (mg)	Percentual de eclosão larvas (%)	Percentual de controle (%)
Formulação					
Controle H <sub>2</sub> O		147,71 <sup>a</sup> ±16,44	81,89 <sup>a</sup> ±13,84	95,40 <sup>a</sup> ±5,97	...
Fórmula-base		148,24 <sup>a</sup> ±14,56	80,35 <sup>a</sup> ±12,65	97,88 <sup>a</sup> ±0,35	- 0,31
TIM+ CV	6,25 + 6,25	147,87 <sup>a</sup> ±27,85	80,65 <sup>a</sup> ±21,03	87,40 <sup>a</sup> ±30,75	10,14
TIM+ EUG	6,25 + 6,25	147,76 <sup>a</sup> ±19,98	76,19 <sup>a</sup> ±15,41	88,67 <sup>a</sup> ±27,63	13,82
CV+ EUG	6,25 + 6,25	148,94 <sup>a</sup> ±21,73	79,57 <sup>a</sup> ±13,62	88,70 <sup>a</sup> ±28,02	10,68

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%;

## 4 DISCUSSÃO

Estudos recentes evidenciaram a existência de efeito sinérgico na associação de monoterpenos e fenilpropanoides sobre estágios imaturos de *A. sculptum*, *D. nitens*, *R. microplus* e *R. sanguineus* (Novato et al., 2015; Araújo et al., 2016), entretanto, esses resultados ficaram restrito somente ao efeito sobre larvas não ingurgitadas. O presente estudo traz os primeiros dados a respeito do efeito sinérgico a partir da associação dos metabólicos secundários de plantas, timol, carvacrol e eugenol, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como o desenvolvimento e avaliação de eficiência de uma formulação contendo a associação desses compostos como princípios ativos.

Todas as combinações avaliadas no presente estudo resultaram em efeitos positivos (aditivo ou sinérgico). As combinações de carvacrol + timol (3,125 mg/mL), carvacrol + eugenol e timol + eugenol (6,25 mg/mL) apresentaram efeito sinérgico, enquanto as combinações entre carvacrol + timol (6,25 mg/mL), carvacrol + eugenol e timol + eugenol (3,125 mg/mL) apresentaram efeito aditivo. Esses resultados vão de encontro ao observado nos estudos com larvas de *R. microplus*, *R. sanguineus* s.l., *D. nitens* e *A. sculptum*. Em estudos com larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, Araújo et al. (2016) observaram interações sinérgicas em todas as combinações de carvacrol + timol, carvacrol + eugenol e timol + eugenol, porém para *R. sanguineus* s.l., a associação de carvacrol + timol (3,29 + 2,98 mg/mL) foi classificada como sinergismo moderado, enquanto as demais foram classificadas como sinérgicas. Novato et al. (2015) constataram efeito sinérgico e aditivo para combinações entre timol + carvacrol, dependendo da concentração, em larvas de *D. nitens*. Para *A. sculptum*, esses autores observaram efeito sinérgico moderado e aditivo para larvas de *A. sculptum*.

O efeito sinérgico também pode ser observado em outros organismos para as mesmas substâncias. Lima et al. (2011) ao avaliarem a combinação entre timol + carvacrol sobre adultos de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) também encontraram efeito sinérgico, o mesmo efeito foi observado em estudos com *Spodoptera littoralis* (Boisduval), Pavela (2010) verificou efeito sinérgico na associação de carvacrol e eugenol. O mesmo efeito foi verificado em bactérias (Didry et al., 1994) e nematoides (Ntalli et al., 2011). Segundo Bakkali et al. (2008), o timol e o carvacrol comprometem a seletividade da membrana de células eucariontes e procariontes. Quanto ao eugenol, já foi verificado o poder de romper a membrana de bactérias, causando o extravasamento de íons e outros componentes celulares (Devi et al., 2010). Em estudos realizados por Tak e Isman (2015) com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre larvas de *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803), os autores especulam que a mistura de diferentes óleos essenciais tem efeito farmacocinético em relação a solubilidade, ou seja, os compostos agem em diferentes sítios orgânicos. Desta forma, é possível inferir que o efeito sinérgico entre a interação de monoterpenos e fenilpropanoides pode estar relacionado aos diferentes sítios de ação.

Contudo, nem sempre a associação de timol, carvacrol e eugenol apresentam efeito sinérgico. Koul et al. (2013) relataram efeito antagônico na associação de timol e carvacrol sobre larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808), *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) e *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885). Singh et al. (2009) não encontraram efeito sinérgico nas combinações que continham carvacrol e eugenol sobre *C. partellus*. Essas diferenças encontradas no efeito da combinação de substâncias podem estar relacionadas com a espécie alvo estudada, indicando que as respostas são espécie/específico. Além disso, fatores como concentrações e solventes utilizados também podem interferir. Sendo assim, vários aspectos



devem ser considerados ao realizar a investigação a respeito da interação de substâncias de origem vegetal sobre diferentes organismos.

Embora todas as concentrações tenham apresentado efeito positivo (aditivo ou sinérgico), cabe destacar que as concentrações necessárias para resultar 100% de eficácia sobre fêmeas ingurgitadas foi superior ao necessário para observar o mesmo resultado para larvas não ingurgitadas. No presente estudo, 100% de eficácia só foi observado com a utilização de timol + carvacrol, timol + eugenol e carvacrol + eugenol na concentração de 6,25 + 6,25 mg/mL, enquanto para larvas, o mesmo foi verificado em concentrações menores de timol + carvacrol (1,53 + 1,76 mg/mL); timol + eugenol (1,76 + 4,67 mg/mL) e carvacrol + eugenol (1,53 + 4,67 mg/mL). Isso se deve ao fato que geralmente as fêmeas ingurgitadas serem mais resistentes a substâncias de origem vegetal do que larvas não ingurgitadas (Matos et al., 2014), e um dos motivos pode ser a cutícula mais espessa das fêmeas, visto que larvas possuem cutícula mais delgada para permitir a respiração tegumentar.

De acordo com Ferreira et al. (2017), o desenvolvimento de uma formulação é de grande importância, pois será capaz de garantir a estabilidade do ativo, diminuir a degradação e a contaminação microbiológica, melhorar a sua ação, além de aumentar o tempo de permanência do produto no corpo do animal.

No presente estudo, a formulação manteve a atividade sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, sendo observado 100% de mortalidade para as três associações. Contudo, nos testes realizados com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, a formulação não apresentou resultado satisfatório, e para as três combinações foram observados valores de eficácia próximo a 10%, inferiores aos valores observados para as associações diluídas somente em DMSO. Ferreira et al., (2017) avaliaram a atividade do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-Índia) e eugenol diluídos em etanol 50% (solução hidroetanólica – etanol + água v/v) ou incorporados em uma formulação similar a desenvolvida no presente estudo (Glicerina + DMSO + Polissorbatato + Lauril + Metilparaben) sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Nesse estudo, os autores também observaram melhor atividade para o óleo e eugenol, quando diluídos em etanol. De acordo Ferreira et al. (2017), o desenvolvimento de formulações tem a vantagem de garantir a estabilidade e preservação dos ativos, porém, em alguns casos, determinados componentes da formulação (tensoativo, solventes e conservantes) ou a mistura desses componentes pode ocasionar na redução da atividade dos ativos. Assim, é recomendado realizar uma comparação da atividade do ativo incorporado a uma formulação com o ativo dissolvido em uma solução simples, utilizando apenas um solvente. Para melhor compreensão dos resultados, são necessários testes isolando os componentes da formulação, para identificar quais podem ter ocasionado a redução de atividade.

Desta forma, pode se concluir que a associação de timol + carvacrol, carvacrol + eugenol e timol + eugenol, nas concentrações testadas, apresentam efeito aditivo e/ou sinérgico sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Contudo, quando essas substâncias foram incorporadas na formulação desenvolvida no presente estudo, só foi observado elevada atividade sobre larvas não ingurgitadas, enquanto para fêmeas ingurgitadas foi observada baixa atividade. É necessário dar continuidade a estudos farmacotécnicos para o desenvolvimento e avaliação de eficiência das formulações contendo combinações dessas substâncias.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D. R.; SILVA, B. C.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol on larvae of cattle tick, *Rhipicephalus microplus* and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 377-382, 2016.

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

CETIN, H.; CILEK, J. E.; AYDIN, L.; YANIKOGLU, A. Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.160, p. 359-361, 2009.

CHOU, T. C. & MARTIN, N. CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. **CompuSyn**, Inc, 2005.

CHOU, T.C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological reviews**, v. 58, p. 621–681, 2006.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; ROSA, L. S.; CLEMENTE, M. A.; ARCOVERDE, A. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.105, p. 495-497, 2009.

DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. M. O.; SCORALIK, M. G.; MASSONI, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v.186, p. 542-545, 2012 a.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; FAZA, A.; AZEVEDO, P. M. C.; GEORGOPOULOS, S. L.; OLIVEIRA, L. F. C. Spectroscopic evaluation of thymol dissolved by different methods and influence on acaricidal activity against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.111, p. 1901-1906, 2012 b.

DELMONTE, C.; CRUZ, P.B.; ZERINGÓTA, V.; MELLO, V.; FERREIRA, F.; AMARAL, M.P.H.; DAEMON, E. Evaluation of the acaricidal activity of thymol incorporated in two formulations for topical use against immature stages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.116, n. 11, p. 2957–2964, 2017.

DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107 -115.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v.69, p. 25-28, 1994.

DOLAN, M. C.; JORDAN, R. A.; SCHULZE, T. L.; SCHULZE, C. J.; MANNING, M. C.; RUFFOLO, D.; SCHMIDT, J. P.; PIESMAN, J.; KARCHESY, J. J. Ability of Two Natural Products, Nootkatone and Carvacrol, to Suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme Disease Endemic Area of New Jersey. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p. 2316-2324, 2009.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, p. 30–133, 1973.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants: module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention**. Rome: FAO, p.25–77, 2004.

FERREIRA, F.M.; DELMONTE, C.C.; NOVATO, T.P.L.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; VILELA, F.M.P.; AMARAL, M.P.H. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.32, n.1, p 4147, 2017.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 23, p. 53–56, 2004.

GALLARDO, A.; PICOLLO, M.I.; GONZÁLEZ-AUDINO, P.; MOUGABURE-CUETO, G. Insecticidal Activity of Individual and Mixed Monoterpenoids of Geranium Essential Oil Against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Journal of Medical Entomology**, v.49, n.2, p. 332-335, 2012.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p.150-156, 2014.

KOUL, O.; SINGH, R.; KAUR, B.; KANDA, D. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. **Industrial Crops and Products**, 49: 428– 436, 2013.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; CARVALHO, S.M.; RODRIGUES, V.G.; GUIMARÃES, L.G.L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 35(4): 664-671, 2011.

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. Capítulo 9: Controle de carrapatos. In: Barros-Battesti, D. M.; Arzua, M.; Bechara, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, 145-154, 2006.

MATOS, R.S.; MELO, D.R.; MONTEIRO, C.M.O.; ZERINGOTA, V.; SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; PRATA, M.C.A.; DAEMON, E. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology research**, v.113, p. 669673, 2014.

MELLO, V.; PRATA, M. C. D. A.; DA SILVA, M. R.; DAEMON, E.; DA SILVA, L. S.; GUIMARÃES, F. D. G.; DE MENDONÇA, A. E.; FOLLY, E.; VILELA, F. M. P.; DO AMARAL, L. H.; CABRAL, L. M.; DO AMARAL, M. D. P. H. Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4431–7, 2014.

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

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) on Greenhouse tomato. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 2015-2023, 2006.

MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; CLEMENTE, M. A.; ROSA, L. S.; MATURANO, R. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.105, p. 1093-1097, 2009.

MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; SILVA, A.M.R.; MATURANO, R.; AMARAL, C. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.106, p. 615-619, 2010.

MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; CALMON, F.; SENRA, T.O.S.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111, p.1295–1300, 2012.

NEVES, Ana Paula. Ensaios sobre controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* através de processos agroecológicos. **Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de

PósGraduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, Santa Catarina, 2009.

NOVATO, T.; ARAUJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 331-335, 2015.

NOVELINO, A.M.S.; DAEMON, E; SOARES, G.L.G. Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.101, p. 809-811, 2007 a.

NTALLI, N.G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, 67: 341–351, 2011.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biopesticides**, v.3, n.3, p.573 – 578, 2010.

PENGELLY, A. **The Constituents of Medicinal Plants: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine**. Segunda edição, Allen&Unwin, 2004.

PEREIRA, M.C. Introdução. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência**. São Paulo: MEDVET. 2008a. p.1–5.

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

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B.J.R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p. 41-52, 2008.

SENRA, T.O.S.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (*E*)-cinnamaldehyde, trans-anethole and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p.1461–1466, 2013 a.

SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; MATOS, R. S.; MELO, D.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p. 3471-6, 2013b.

SINGH, R.; KOUL, O.; RUP, P.J.; JINDAL, J. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.29, n.2, p. 93–101, 2009.

STONE, B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). **Bulletin of Entomology Research**, v. 53, p. 563–578, 1962.

TAK, J.H.; ISMAN, M.B. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. **Scientific reports**, v. 5, n. 12690, 2015.

VALENTE, P.P.; AMORIM, J.M.; CASTILHO, R.O.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, M.F.B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.113, p. 417–423, 2014.

### **CAPÍTULO III**

**AÇÃO *IN VITRO* DE TIMOL E CARVACROL SOBRE DIFERENTES  
POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1888) COM  
DIFERENTES PERFIS DE RESISTÊNCIA**

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade acaricida do timol e carvacrol sobre 45 populações de *Rhipicephalus microplus* de diferentes fazendas e regiões do Brasil e uma cepa sensível (Cepa Porto Alegre – POA) pelos métodos teste de pacotes de larvas. Os testes de pacote de larvas foram realizados nas concentrações de 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0; 10 mg/mL, para o timol (25 populações + cepa sensível) e as concentrações de 0,31; 0,62; 1,25; 2,0; 2,5; 5,0 mg/mL para o carvacrol (20 populações + cepa sensível). Com o teste de pacote de larvas foi possível verificar que a cepa sensível (POA) apresentou CL<sub>50</sub> de 1,63 e 1,89 mg/mL para timol e carvacrol, respectivamente. Nas demais populações, o timol apresentou CL<sub>50</sub> entre 0,67 a 2,12 mg/mL e o carvacrol os valores foram de 0,55 a 3,21 mg/mL, sendo observado média da CL<sub>50</sub> das populações de 1,49 para timol e 1,75 mg/mL para carvacrol. Não houve diferença significativa entre as duas substâncias em relação ao valor da média da CL<sub>50</sub> e nem em relação a CL<sub>50</sub> da cepa sensível. A Embrapa Gado de Leite forneceu os dados dos testes de imersão de fêmeas com os carrapaticidas sintéticos. Os testes com imersão de fêmeas ingurgitadas foram realizados no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite. As fêmeas de *R. microplus* foram submetidas ao teste de imersão com os carrapaticidas piretroide, amidina e organofosforado preparados conforme descrito nas bulas. A partir dos dados fornecidos pela Embrapa foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para a comparação de médias. Foi possível verificar que todas as populações tratadas com piretroide não apresentaram eficácia no tratamento, com valores inferiores a 95% de eficiência. Para amidina apenas em uma população este carrapaticida apresentou eficácia no tratamento, porém para o organofosforado sete (28%) das 45 populações testadas apresentaram percentual de controle acima dos valores recomendados pelo Ministério da Agricultura (95%). Além disso, foi possível verificar, com os dados fornecidos pela Embrapa, com os testes realizados com as fêmeas, e a avaliação acaricida do timol e carvacrol sobre larvas, através de teste de correlação, que não há correlação entre valores de eficiência dos carrapaticidas com os valores de CL<sub>50</sub> para o timol e carvacrol. Com esses resultados conclui-se que existe uma ligeira variação de sensibilidade nas diferentes populações testadas ao timol e carvacrol. Além disso, pode-se



concluir que não existe resistência cruzada entre as bases químicas e as substâncias de origem vegetal testadas.

**Palavras-chave:** *R. microplus* acaricidas, monoterpenos, susceptibilidade, resistência cruzada.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the acaricidal activity of thymol and carvacrol on 45 populations of *Rhipicephalus microplus* from different farms and regions of Brazil and a sensitive strain (Porto Alegre - POA) by methods of larval packet test and immersion of engorged females. The larval package tests were carried out at concentrations of 0.31; 0.62; 1.25; 2.5; 5.0; 10 mg / mL, for thymol (25 populations + sensitive strain) and concentrations of 0.31; 0.62; 1.25; 2.0; 2.5; 5.0 mg / mL for carvacrol (20 populations + sensitive strain). The results of larval package tests showed that the LC<sub>50</sub> of sensitive strain (POA) were 1.63 and 1.89 mg / mL for thymol and carvacrol, respectively. In the farm populations, the LC<sub>50</sub> of thymol ranged from 0.67 and 2.12 mg / mL and LC<sub>50</sub> of carvacrol ranged from 0.55 to 3.21 mg / mL, with a mean LC<sub>50</sub> of 1.49 for thymol and 1.75 mg / mL for carvacrol. There was not a significant difference between the two substances in relation to the mean value of LC<sub>50</sub> and neither in relation to the LC<sub>50</sub> for the sensitive strain. The tests with immersion of engorged females to evaluate the susceptibility of the different populations to the synthetic acaricides were realized in the Laboratório de Parasitologia, Embrapa Gado de Leite, Minas Gerais, Brazil. The engorged females of *R. microplus* were submitted to the immersion test with the pyrethroid, amidine and organophosphorus acaricides prepared as described by the manufacturers. From the data provided by Embrapa, the Kruskal-Wallis test was performed, followed by the Student-Newman-Keuls test for comparison of means. Overall, of the 45 populations tested, pyrethroid (deltamethrin) did not show efficacy in all populations, with values lower than 95%. For the amidine (amitraz) only one treatment (2.2%) was efficient and for the organophosphate (chlorfenvinphos) seven treatments (15.6% ) were efficient, all with values higher than 95% as recommended by the Ministry of Agriculture .In summary, the results of tests performed with the engorged females and larvae showed no correlation between the efficacy of commercial acaricides with the LC<sub>50</sub> values for thymol and carvacrol. Thus it can be concluded that there is no cross-resistance between commercial acaricides and substances of vegetable origin tested.

**Key words:** *Rhipicephalus microplus*, acaricides, monoterpenes, susceptibility, crossresistance.

## 1 INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é popularmente conhecido como carrapato dos bovinos (GUIMARÃES et al., 2001). Possui grande importância devido aos impactos causados na pecuária bovina, com perdas econômicas estimadas em cerca de 3,24 bilhões de dólares por ano no Brasil (GRISI et al., 2014). As primeiras tentativas de controle de *R. microplus* ocorreram no final do século XIX, com a descoberta de uma formulação com arsênico, porém após 40 anos de uso, surgiram os primeiros casos de resistência (FURLONG et al., 2007). Desde então, outras bases químicas com diferentes moléculas apareceram no mercado como: organoclorados, organofosforados, amidínicos, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis e benzofenilureas, mas com o passar dos anos, boa parte das formulações contendo princípios ativos dessas bases químicas foram perdendo a eficácia (FURLONG et al., 2007; CUORE et al., 2007; RECK et al., 2014). Atualmente, tem-se verificado a existência de cepas multirresistentes, incluindo cepas resistentes a todas as bases químicas comercialmente disponíveis (RECK et al., 2014; KLAFKE et al., 2016)

O uso de forma indiscriminada dos acaricidas, além de selecionar populações resistentes, pode ocasionar a contaminação do ambiente, dos animais e do homem (MONTEIRO; PRATA, 2013). Para tentar contornar esse cenário, muitos estudos estão sendo realizados com substâncias de origem vegetal, buscando alternativas eficientes e sustentáveis de controle, que possam também diminuir a contaminação do ambiente (ADENUBI et al., 2016).

Com base nesses estudos, uma série de metabólitos secundários obtidos de plantas tem sido selecionados como promissores para o desenvolvimento de novos carrapaticidas (GOMES et al., 2012; CRUZ et al., 2013; SENRA et al., 2013ab). Dentre esses, podemos citar o timol e carvacrol, monoterpenos voláteis com odor característico, que podem ser encontrados no óleo essencial de algumas plantas das famílias Lamiaceae e Verbenaceae (GIRI; MUKERJI, 2002). No Brasil, esses monoterpenos já tiveram sua atividade carrapaticida comprovada *in vitro* para

*R. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, e *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (DAEMON et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; SENRA et al., 2013; NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016).

Recentemente foi realizado um estudo, com duas populações de *R. microplus*, uma sensível e outra resistente a organofosforado e constatou que o carvacrol foi 3,2 vezes mais tóxico para população resistente, quando comparado com a população sensível, enquanto o timol apresentou toxicidade similar para as duas populações (resistente e sensível) (COSTAJÚNIOR et al., 2016). Situação semelhante ocorre com relação a fungos entomopatogênicos, agentes com potencial para controle biológico de carrapatos. Os resultados de diferentes estudos têm evidenciado que existem uma grande variação na susceptibilidade de diferentes populações de *R. microplus* a um mesmo isolado de fungo (FERNANDES et al. 2011; PERINOTTO et al. 2012, WEBSTER et al. 2017).

Alguns autores mencionam que uma das vantagens dos compostos isolados de plantas, é o fato de não existir resistência cruzada com relação aos princípios ativos presentes nos pesticidas comerciais, e que tal fato estaria relacionado a mecanismos de ação diferentes (ROSADO-AGUILAR et al., 2017), contudo, existem poucas investigações sobre este aspecto. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade carrapaticida dos monoterpenos timol e carvacrol em populações de *R. microplus* com diferentes perfis de sensibilidade aos acaricidas sintéticos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção de amostras de carrapatos de diferentes populações

As populações de *R. microplus* utilizadas foram obtidas a partir de amostras de carrapatos (fêmeas ingurgitadas) enviadas por produtores de diferentes regiões do país ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite (LPEGL). Parte da amostra de cada população foi utilizada para o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (DRUMONND et al., 1973), para determinação da sensibilidade dos carrapatos aos carrapaticidas sintéticos. Este bioensaio foi realizado no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite.

A outra parte das fêmeas ingurgitadas foi acondicionada em placa de Petri e mantidas em câmara climatizada a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $80\pm 10\%$ , para realização de postura. Ao final de 15 dias, a massa de ovos foi pesada e acondicionada em seringas plásticas, com extremidade distal cortada e vedada com algodão hidrófilo. As seringas foram mantidas em câmara climatizada, nas mesmas condições citadas anteriormente para eclosão das larvas. Após a obtenção das larvas, foram conduzidos os testes de pacotes de larvas adaptado por Monteiro et al. (2012), utilizando timol e carvacrol. Foram utilizadas larvas com idades de 15 a 21 dias, após a eclosão.

### 2.2 - Obtenção e diluição do timol, carvacrol e carrapaticidas

Os monoterpenos timol (Lote SLBK5653V) e carvacrol (Lote MKBP5684V) foram adquiridos comercialmente, juntamente com emissão de certificados de grau de pureza igual ou superior a 99%, junto a empresa Sigma-Aldrich. Para a realização do teste de pacote de larvas, essas substâncias foram diluídas em etanol 70° GL (água-etanol v/v).

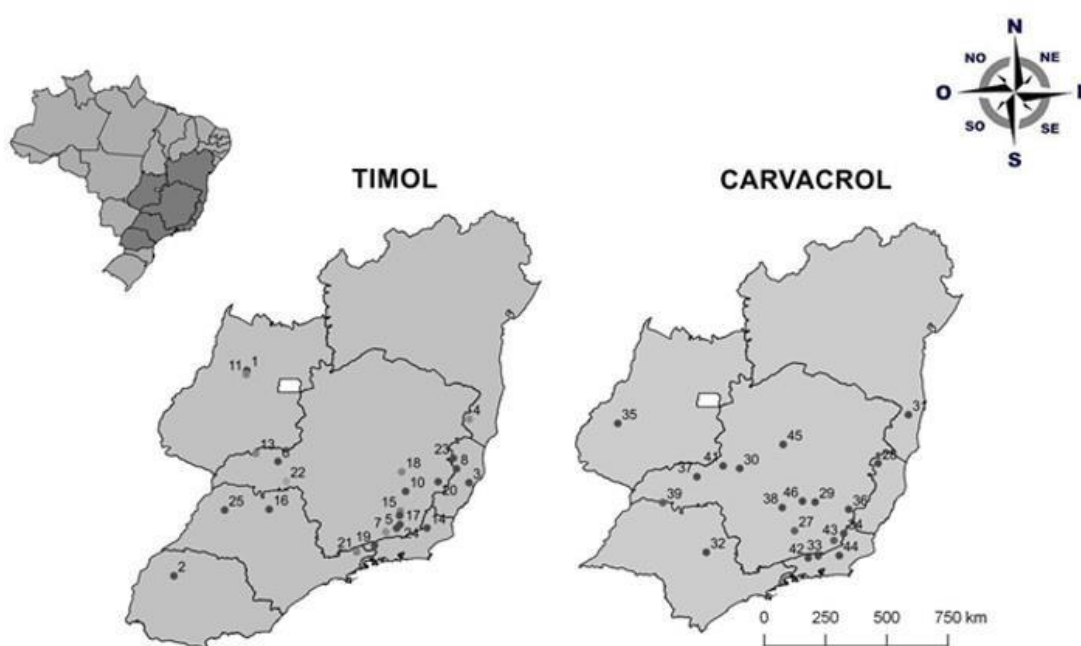
Para o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas, foi utilizada a concentração comercial dos seguintes carrapaticidas: deltrametrina (Butox P®, MSD Saúde Animal), amitraz (Triatox®, MSD Saúde Animal) e clorfenvinfós (UCB VET - Saúde Animal). Esses carrapaticidas foram diluídos em água, seguindo as recomendações técnicas indicadas pelos respectivos fabricantes. Informações dos carrapaticidas, a respeito do nome comercial, empresa, grupo químico e princípio ativo são fornecidos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Produtos utilizados nos testes *in vitro* para determinação da sensibilidade de fêmeas ingurgitadas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* aos carrapaticidas, em condições de laboratório (27±1°C e UR de 80±10%).

Nome Comercial	Empresa	Grupo Químico	Princípio ativo	Concentração
Butox®	MSD Saúde Animal	Piretroide	Deltametrina	25,0 g
Triatox®	MSD Saúde Animal	Amidínico	Amitraz	12,5 g
Supokill®	UCBVET - Saúde Animal	Organofosforado	Clorfenvinfós (Supona)	50,0 g

### 2.3 Avaliação da susceptibilidade de diferentes populações de larvas de *R. microplus* ao timol e carvacrol

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), localizado em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Foram realizados testes com amostras de 25 populações para o timol (Populações de 1-25) e 20 populações para o carvacrol (Populações de 21 a 40), provenientes dos estados do Paraná (1), São Paulo (5), Minas Gerais (26), Rio de Janeiro (5), Espírito Santo (3), Bahia (2) e Goiás (3) (Figura 1).



**Figura 1** – Distribuição geográfica das populações de *Rhipicephalus microplus* utilizadas nos testes com timol e carvacrol.

Para a realização dos experimentos foi empregado o teste de pacote de larvas (STONE; HAYDOCK, 1962), modificado por Monteiro et al. (2012). Nesse procedimento, aproximadamente 100 larvas foram colocadas no centro de papel de filtro com dimensões de 6x6 cm e, na sequência, estes papeis foram dobrados ao meio e as bordas vedadas por cliques. Posteriormente, cada lado do papel de filtro foi umedecido homoganeamente com 90 µL da solução testada.

Foram utilizadas as concentrações de 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0; 10 mg/mL para o timol e as concentrações de 0,31; 0,62; 1,25; 2,0; 2,5; 5,0 mg/mL para o carvacrol, com 10 repetições para cada tratamento. Além disso, foi formado um grupo controle, onde os pacotes foram umedecidos somente com o solvente etanol (70°GL). Os pacotes foram acondicionados em câmara climatizada (27±1° C e UR 80±10%) por 24h e após esse período, foi feita a avaliação do percentual de mortalidade através da contagem de larvas vivas e mortas, feita com utilização de uma bomba de vácuo. O percentual de mortalidade foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade (\%)} = (\text{total de larvas mortas} / \text{total de larvas}) \times 100$$

#### **2.4 Teste de sensibilidade de fêmeas ingurgitadas aos carrapaticidas**

Os testes de sensibilidade aos carrapaticidas foram realizados no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, com amostras das mesmas populações utilizadas nos testes com larvas (Figura 1). Nesse procedimento, fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram submetidas ao teste de imersão proposto por Drummond et al. (1973). Inicialmente as fêmeas foram lavadas em água corrente, secas em papel toalha e separadas em quatro grupos, com 10 carrapatos (cada um referente a um tratamento), contendo pesos homogêneos.

Em seguida, as fêmeas foram imersas por cinco minutos nas soluções testadas, dose comercial dos carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós. Também foi formado um grupo controle, onde as fêmeas foram imersas em água. Após a imersão, as fêmeas foram colocadas em uma placa de Petri (9 x 9 cm), e acondicionadas em câmara climatizada (27±1° C e UR 80±10%), para realização de postura. Após 15 dias, as massas de ovos das 10 fêmeas de cada grupo foram pesadas e acondicionadas em seringas plásticas, com extremidade distal cortada e vedada com algodão hidrófilo. As seringas foram mantidas por 20 dias, em câmara climatizada, seguindo as mesmas condições anteriormente citadas, e após esse período foi realizada a avaliação do percentual de eclosão de larvas.

A partir dos valores do peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão de larvas, foi realizado o cálculo do percentual de controle de acordo com (DRUMONND et al., 1973). O Ministério da Agricultura (1987) preconiza que para um carrapaticida é considerado aceitável se a eficiência do produto for acima de 95%.

#### **2.4 Análise dos dados**

Para determinação da variação na susceptibilidade de diferentes populações de *R. microplus* ao timol e carvacrol, foi feito o cálculo de concentração letal necessária para matar 50% da população (CL<sub>50</sub>), utilizando a análise Probit, no programa POLOPC. Os valores de CL<sub>50</sub> média para o timol e carvacrol e eficácia média dos princípios ativos carrapaticidas deltametrina, amitraz a clorfenvinfós foram comparadas por teste paramétrico do Anova

seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o Software Biostat, versão 5.0. Também foi feita análise de *Cluster*, utilizado a distância *euclidiana*, para avaliar a similaridade entre as populações testadas para o timol e carvacrol, com uso do Software R versão 3.5.1.

Para avaliar possível correlação entre a sensibilidade das populações de carrapatos ao timol ou carvacrol e aos carrapaticidas, foi empregado o teste de correlação de *Pearson* ( $P > 0,05$ ), utilizando o software Biostat 5.0.

### 3 RESULTADOS

Na determinação da  $CL_{50}$  foram observados valores de 0,67 a 2,12 mg/mL para o timol, com valor médio de 1,49 mg/mL, enquanto para o carvacrol, os valores variaram de 0,55 a 3,21 mg/mL, com média de 1,75 mg/mL. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores médios de  $CL_{50}$  do timol e carvacrol. A diferença entre a maior e menor  $CL_{50}$  para o timol entre as populações foi de 3,2, enquanto para o carvacrol, essa diferença foi de 5,83 (Tabela2).

**Tabela 2** – Valores de concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) do timol (mg/mL) e carvacrol (mg/mL) para populações de *Rhipicephalus microplus* com diferentes perfis de resistência. Estudo conduzindo em condições de laboratório 27±1°C e UR de 80±10%.

Timol				Carvacrol			
População	Município de origem	CL <sub>50</sub>	I.C.	População	CL <sub>50</sub>	I.C.	
Cepa Sensível	Porto Alegre	1,63	1,47-1,81	Cepa Sensível	Porto Alegre	1,89	1,69-2,13
1	Nova Glória – GO	0,67	0,59-0,77	26	Manhuaçu – MG	0,55	0,40-0,76
2	Cianorte – PR	0,90	0,82-1,00	27	Coromandel - MG	0,98	0,89-1,09
3	Luz – MG	1,01	0,89-1,15	28	Valença – RJ	1,12	0,99-1,27
4	Itanhém – BA	1,02	0,90-1,16	29	Eunápolis – BA	1,50	1,35-1,67
5	Juiz de Fora – MG	1,07	0,93-1,24	30	Barão do Monte Alto – MG	1,50	1,38-1,63
6	Uberlândia – MG	1,14	0,99-1,30	31	Uberlândia – MG	1,62	1,48-1,76
7	Lima Duarte – MG	1,16	1,00-1,34	32	São Carlos – SP	1,63	1,47-1,80
8	Pancas – ES	1,24	1,08-1,42	33	Leopoldina – MG	1,69	1,48-1,94
9	Silverânia – MG	1,42	1,29-1,56	34	Riolândia – SP	1,70	1,54-1,88
10	Dom Silvério – MG	1,46	1,28-1,66	35	Alegre – ES	1,75	1,60-1,92
11	Ceres – GO	1,50	1,33-1,69	36	Bom Jardim – RJ	1,75	1,63-1,88
12	Silverânia – MG	1,58	1,47-1,69	37	Palestina de Goiás - GO	1,82	1,68-1,98
13	Centralina –MG	1,62	1,47-1,78	38	São João Del Rey – MG	1,90	1,70-2,12
14	Itaocara – RJ	1,62	1,52-1,73	39	Várzea da Palma - MG	1,95	1,81-2,09
15	Dores do Turvo – MG	1,63	1,45-1,82	40	Pato de Minas - MG	1,96	1,76-2,18
16	Monte Azul Paulista – SP	1,68	1,53-1,83	41	Santa Bárbara - MG	2,00	1,75-2,28
17	Silverânia – MG	1,69	1,60-1,80	42	Belo Horizonte - MG	2,00	1,83-2,19
18	Passabém – MG	1,71	1,55-1,89	43	Ecoporanga – ES	2,16	1,94-2,40
19	Quatis – RJ	1,77	1,63-1,91	44	Carmo do Cajuru - MG	2,27	2,06-2,50
20	Taparuba – MG	1,80	1,59-2,03	45	Paraíba do Sul - RJ	3,21	2,87-3,58
21	Cachoeira Paulista – SP	1,81	1,71-1,92				
22	Uberaba – MG	1,87	1,73-2,02				
23	Mantena – MG	1,91	1,73-2,11				
24	Goianá – MG	1,97	1,82-2,13				

25 Santo Antônio do Aracanguá – SP 2,12 1,93-2,33

**Tabela 2.** (continuação)

---

67

---

	CL 50		CL 50
Média ± desvio padrão	1,49 <sup>a</sup> ±0,37	Média ± desvio padrão	1,75 <sup>a</sup> ±0,53

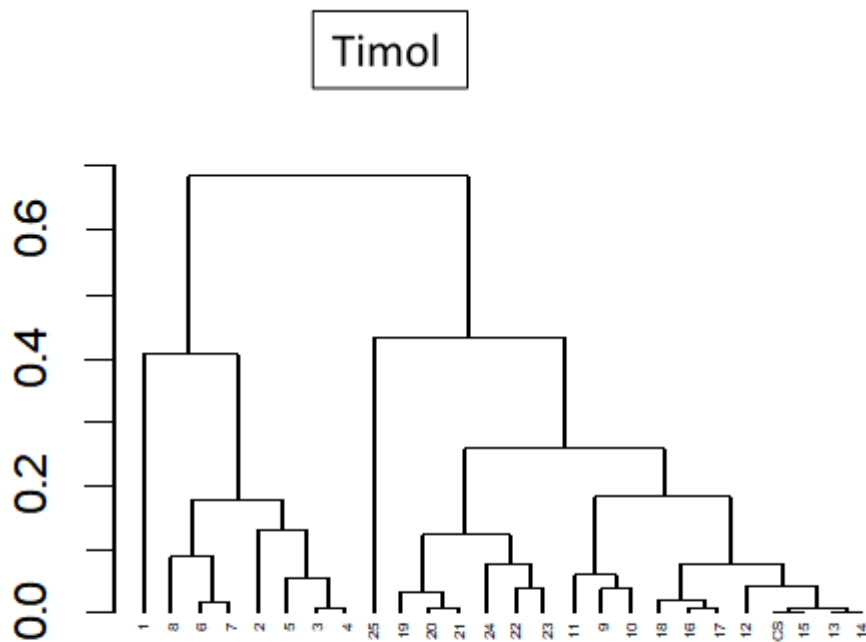
---

(CL<sub>50</sub>) = Concentração Letal 50; (I.C) = Intervalo de confiança. Médias comparadas por Análise de Variância/Tukey, com nível de significância de 5%.



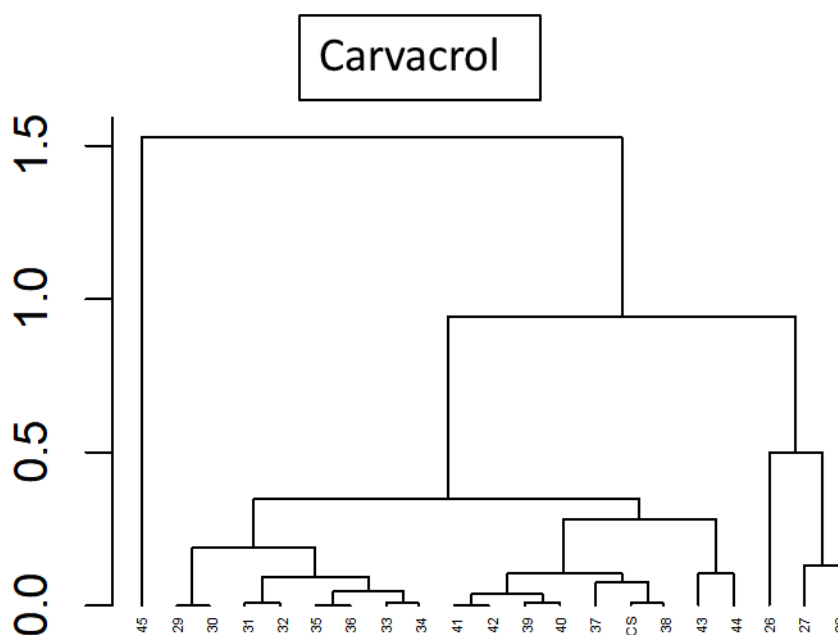


Na análise de *Cluster*, as populações testadas com timol formaram dois grupos distintos, sendo o primeiro grupo com populações de 1 a 8, e o segundo com populações de 9 a 25 (Figura 2). A cepa sensível (CS) apresentou valor da  $CL_{50}$  de 1,63 mg/mL. Esse resultado foi também observado na população 15 e está próximo as populações 13 e 14, o que justifica estarem no mesmo grupo. Foi possível observar maior similaridade entre as populações 3 e 4; 16 e 17; e 20 e 21, pois apresentam as menores distâncias *euclidianas* (Figura 2).



**Figura 2** – Dendrograma obtido através da Análise de *Cluster* utilizando as  $CL_{50}$  do timol (Populações de 1 a 25) e a cepa sensível para larvas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus*. Experimentos realizados em condições de laboratório ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e UR de  $80\pm 10\%$ ).

Nas populações testadas com carvacrol, ocorreu a formação de três grupos, o primeiro com as populações 26, 27 e 28, o segundo incluindo as populações de 29 a 44, enquanto a população 45 se distingue das demais formando um grupo externo (Figura 3). A CS apresentou  $CL_{50}$  de 1,89 mg/ml apresentando grande proximidade da população 38. As menores distâncias euclidianas foram observadas nas populações 33 e 34; 35 e 36; 39 e 40, 41 e 42.



**Figura 3** – Dendrograma obtido através da Análise de *Cluster* utilizando as  $CL_{50}$  do carvacrol (Populações de 21 a 40) e a cepa sensível para larvas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus*. Experimentos realizados em condições de laboratório ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e UR de  $80\pm 10\%$ ).

Os dados fornecidos pela Embrapa Gado de Leite, com o teste de imersão de fêmeas, demonstram que a deltametrina (piretroide) não atingiu eficiência acima de 95% em nenhuma das 45 populações. Já o amitraz (amidínico), apenas numa população (2,22%) foi verificada eficiência superior a 95%, enquanto para o clorfenvinfós (organofosforado), esse nível de eficiência foi observado em sete populações (15,5%). Considerando as populações de 1 a 25, utilizadas nos testes com o timol, a média de eficiência da deltametrina foi de 12,1%, diferindo significativamente ( $P>0,05$ ) das médias do amitraz (61,3%) e clorfenvinfós (69,7%). O mesmo foi observado para as populações de 26 a 45, com diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre a média de eficiência da deltametrina (11,1%) em relação os valores observados para o amitraz (47,3%) e clorfenvinfós (59,7%). Entre o amitraz e clorfenvinfós não foram observadas diferenças significativas entre as populações utilizadas no teste com timol ou carvacrol ( $p>0,05$ ) (Quadro 1).





**Tabela 3.** (continuação)

	P (%)	AM (%)	OF (%)		P (%)	AM (%)	OF (%)
Média±Desvio padrão	12,1 <sup>a</sup> ±18,9	61,3 <sup>b</sup> ±27,7	69,7 <sup>b</sup> ±28,1	Média±Desvio padrão	11,1 <sup>a</sup> ±13,9	47,3 <sup>b</sup> ±25,1	59,7 <sup>b</sup> ±25,4

P = Piretroide (Deltametrina); AM = Amidina (Amitraz); OF = Organofosforado (Clorfenvinfós). NA = não avaliado





Na análise de correlação entre os níveis de sensibilidade de *R. microplus* aos ingredientes ativos deltametrina, amitraz ou clorfenvinfós e os valores de CL<sub>50</sub> do timol e carvacrol não foi significativa ( $p > 0,05$ ), com coeficiente de *Pearson* variando entre -0,47 a 0,34 (Tabela 3).

**Tabela 3** – Análise de correlação entre o nível de sensibilidade de *Rhipicephalus microplus* aos carrapaticidas e os valores de CL<sub>50</sub> do timol e carvacrol.

Testes de Correlação	Associação	R (Pearson)/ Coeficiente de Pearson	p valor
Correlação de Pearson	Timol – Piretroide	0,23	0,27
Correlação de Pearson	Timol – Amitraz	0,34	0,10
Correlação de Pearson	Timol - Organofosforado	0,19	0,38
Correlação de Pearson	Carvacrol - Piretroide	- 0,47	0,03
Correlação de Pearson	Carvacrol – Amitraz	- 0,01	0,96
Correlação de Pearson	Carvacrol - Organofosforado	0,19	0,41

Princípios ativos - Deltametrina (P = Piretroide), Amidínico (A = Amitraz), Clorfenvinfós (O = Organofosforado).

## 4 DISCUSSÃO

Timol e carvacrol são monoterpenos, cuja atividade sobre carrapatos tem sido reportada na literatura (SENRA et al., 2013). Embora os resultados tenham evidenciado o potencial dessas substâncias para o desenvolvimento de carrapaticidas, existem alguns estudos, com espécies ou populações de carrapatos distintas, que apresentam dados um pouco divergentes com relação a ordem de atividade dessas substâncias (CRUZ et al., 2013; NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016; COSTA-JUNIOR et al., 2016). Estudos recentes demonstraram haver acentuada variação na susceptibilidade de populações de *R. microplus* a fungos entomopatogênicos (WEBSTER et al., 2016). Esta divergência nos dados pode ser um indicativo da existência de diferenças não somente interespecíficas, mas também intraespecíficas, sugerindo que a sensibilidade varia de acordo com as populações de carrapatos.

A partir dos valores de  $CL_{50}$  do timol e carvacrol para as diferentes populações, obtidos neste experimento, foi possível verificar a amplitude da sensibilidade dessas substâncias em diferentes populações de *R. microplus*, tais como: carvacrol  $CL_{50}$  entre 0,55 e 3,21 mg/mL e timol entre 0,65 e 2,12 mg/mL. Esses dados ampliam os dados obtidos por Araújo et al. (2016) ao avaliarem a ação carrapaticida do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *R. microplus*, verificaram melhor atividade do timol, com  $CL_{50}$  de 1,53 mg/mL, seguido do carvacrol ( $CL_{50}$  de 1,76 mg/mL). Ordem semelhante foram encontrados por Novato et al. (2015) em teste com timol e carvacrol, sendo verificado  $CL_{50}$  de 2,04 e 3,49 mg/mL para *Amblyomma sculptum* e 2,17 e 3,33 mg/mL para *Dermacentor nitens*, respectivamente. Entretanto, nos estudos realizados por Novato et al. (2018) o carvacrol ( $CL_{50}$  - 0,83 mg/mL) apresentou melhor atividade que o timol ( $CL_{50}$  - 1,26 mg/mL) sobre larvas de *R. microplus*. A mesma ordem de atividade foi observada por Cruz et al. (2013) em estudo também com larvas de *R. microplus*, com o carvacrol e timol apresentando  $CL_{50}$  de 0,22 mg/mL e 3,86 mg/mL, respectivamente. A partir dos resultados encontrados nesse estudo, foi possível verificar que realmente existem diferenças de sensibilidade entre as populações e tal fato explica essas pequenas diferenças na ordem de atividade desses monoterpenos nas pesquisas realizadas com carrapatos.

Embora tenha sido verificado diferença entre a sensibilidade de populações de *R. microplus* para os dois monoterpenos, cabe destacar que no presente estudo o timol ( $CL_{50}$  de 1,63 mg/mL) foi mais tóxico para cepa sensível do que o carvacrol ( $CL_{50}$  de 1,89 mg/mL). Esse resultado corroboram com os encontrados por Costa Júnior et al. (2016), que ao avaliarem uma cepa sensível e uma cepa resistente com timol e carvacrol, verificaram que o timol foi mais tóxico para a cepa sensível, enquanto que o carvacrol foi mais tóxico para a cepa resistente.

A partir da análise de *Cluster*, com base nos valores de  $CL_{50}$  e o intervalo de confiança, foi possível observar que as populações testadas com timol formaram dois grupos distintos. O primeiro composto pelas populações de 1 ao 8, enquanto o segundo foi formado pelas populações de 9 a 25, sendo que neste grupo se encontra a cepa sensível (CS). Já as populações testadas com carvacrol formaram três grupos, o primeiro com as populações de 26 a 28, o segundo com as populações de 29 a 44, estando presente neste grupo a cepa sensível (CS) e o último a população 45. Esses resultados indicam que a variação na sensibilidade das populações de *R. microplus* para esses terpenos parece ser mais acentuada para o carvacrol.

Embora exista diferenças entre a sensibilidade das populações de *R. microplus* ao timol e carvacrol, quando foi feito o cálculo do valor médio da  $CL_{50}$ , considerando todas as populações testadas (exceto a cepa sensível), os valores foram de 1,49 e 1,75 mg/mL para o timol e carvacrol, respectivamente, não sendo observada diferença significativa. A cepa sensível (CS) também apresetaram valores de  $CL_{50}$  de 1,63 (intervalo de confiança de 1,47 – 1,81) para

timol, e 1,89 (intervalo de confiança de 1,69 – 2,13) para carvacol. Esses valores médios da CL<sub>50</sub> encontrados nas populações e o valor da CL<sub>50</sub> da cepa sensível são próximos aos encontrados para o timol (1,53 mg/mL) e carvacol (1,76 mg/mL) em estudos realizados por Araújo et al. (2016), com larvas de uma única população de *R. microplus*.

Variação na sensibilidade de populações de fungos entomopatogênicos (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2012; WEBSTER et al., 2017), que são microrganismos com potencial para o controle biológico de carrapatos (FERNANDES et al., 2012) tem sido relatada. Estudos realizados com o fungo *Beauveria bassiana* sobre duas populações de *R. microplus*, demonstraram que após 30 dias, o percentual de mortalidade foi de 100% para larvas da população obtida através de infestação natural, enquanto na população obtida através de infestação artificial, o percentual de mortalidade foi de 80% (FERNANDES et al., 2011). Perinotto et al. (2011) avaliaram a variação de susceptibilidade de duas populações de *R. microplus* aos fungos *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.), isolado Ma 959 e *Beauveria bassiana* sensu lato, (s.l.), isolado Bb 986 verificaram que a populações PESAGRO e FAIZ apresentaram uma pequena variação na susceptibilidade para *M. anisopliae* (s.l.), com TL<sub>90</sub> (Tempo letal) de 22,9 e 19,5 dias, enquanto para *B. bassiana* (s.l.), essa variação foi maior, com TL<sub>90</sub> de 35,8 e 26,7 dias. Webster et al., (2016) investigando a virulência de um isolado *Metarhizium anisopliae* sobre 67 populações de *R. microplus* encontraram variações no valor da TL<sub>50</sub> de 2,6 a 24,9 dias, e percentual de mortalidade de 26,3 a 100%, entre as populações testadas. Segundo esses autores, essa ampla diversidade de respostas deve ser levada em consideração em qualquer estudo de campo, teste de eficácia ou programa de controle de carrapatos.

No presente estudo, foi observado que não existe correlação entre valores de eficiência dos carrapaticidas com os valores de CL<sub>50</sub> para o timol e carvacol. No caso de resistência cruzada, o esperado seria encontrar correlação, com os maiores valores de CL<sub>50</sub> associados com as populações onde os carrapaticidas tivessem menor eficiência. A possibilidade de não existir resistência cruzada com relação às bases químicas presentes nos pesticidas comerciais e as substâncias testadas, é uma das vantagens mencionadas por alguns autores para o desenvolvimento inseticidas ou acaricidas a partir de metabólicos secundários de plantas. Isso por que, acredita-se que os mecanismos capazes de conferir resistência para artrópodes aos pesticidas comerciais não seriam capazes de conferir resistência para as substâncias de origem vegetal, uma vez que os modos de ação seriam diferentes (ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Concluímos que existe variação na sensibilidade de populações de *R. microplus* ao timol e carvacol, contudo essa variação é discreta. Assim, na realização de estudos futuros, com metabólicos secundários de plantas para controle de carrapatos, essa diferença na sensibilidade entre populações deve ser considerada para aspectos como: elaboração do delineamento experimental, avaliação dos resultados e discussão dos dados. Para homogeneizar os resultados e possibilitar a comparação entre estudos, a utilização de cepas de referência pode ser uma boa alternativa. São necessários mais estudos a respeito de resistência cruzada, e a confirmação da ausência desse tipo de resistência entre carrapaticidas sintéticos e metabólicos secundários de plantas, pode ser um bom indicativo para realização de estudos com busca de ação sinérgica entre esses compostos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENUBI, O.T.; FASINA, F.O.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 178–193, 2016.
- ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D. R.; SILVA, B. C.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol on larvae of cattle tick, *Rhipicephalus microplus* and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 377382, 2016.
- BRASIL. **Portaria 48, de 12 de maio de 1997**. MAPA. Brasília, 1997.
- CAMILLO, G.; VOGEL, F.F.; SANGIONI, L.A.; CADORE, G.C.; FERRARI, R. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** [online], v. 39, n. 2, p. 490-495, 2009.
- COSTA-JÚNIOR, L.M.; MILLER, R.J.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; LI, A.Y.; LEÓN, A.A.P. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60-64, 2016.
- CRUZ, E.M.O.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.A.; ARAUJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.195, p.198– 202, 2013.
- CUORE, U., TRELLES, A., SANCHIS, J., GAYO, V., SOLARI, M.A. Primer diagnostico de resistencia al Fipronil en la garrapata comun del ganado *Boophilus microplus*. **Veterinaria**, v. 42, p. 35–41, 2007.
- DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; ROSA, L.S.; CLEMENTE, M.A.; ARCOVERDE, A. 2009. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** v.105, p.495–497, 2009.
- DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, p. 30–133, 1973.
- FERNADES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307 – 318, 2011.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. & PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, n.159, 2007.

GIRI, B. E MUKERJI, K.G. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.18, n.5, p. 459- 463, 2002.

GOMES, G.A.; MONTEIRO, C.M.O; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R.S.; DAEMON, E.; GOIS, R.W.S.; SANTIAGO, G.M.P.; CARVALHO, M.G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, 2423 - 2430, 2012.

GRISI, L., LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATESTI, D. M. Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP, São Paulo, 2001.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25 (2), p. 163 – 171, 2016.

KLAFKE, G.M., 2008. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M.C. et al. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, controle e resistência***. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-105.

MONTEIRO C.M.O.; DAEMON E.; SILVA A.M.R.; MATURANO R.; AMARAL C. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** v.106, p.615-619, 2010.

MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; CALMON, F.; SENRA, T.O.S.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111, p.1295–1300, 2012.

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. **Controle biológico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e**

**desafios.** In: Controle do carrapato do boi. Controle no pasto, 2013, Nova Odessa. Controle do carrapato do boi. Controle no pasto, 2013.

NOVATO, T.; ARAUJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 331-335, 2015.

NOVATO, T.P.L.; GOMES, G.A.; ZERINGÓTA, V.; FRANCO, C.T.; OLIVEIRA, D.R.; MELO, D.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O. *In vitro* assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 260, 1 – 4, 2018.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M.G.; SÁ, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257 -260, 2012.

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

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

SENRA T.O.S.; ZERINGOTA V.; MONTEIRO C.M.O.; CALMON F.; MATURANO R.; GOMES G.A.; FAZA A.; CARVALHO M.G.; DAEMON E. 2013a. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (*E*) -cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p.1461-1466, 2013a.

SENRA, T.; CALMON, F.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.; MATURANO, R.; MATOS, R.; MELO, D.; GOMES, G.; CARVALHO, M.; DAEMON, E. 2013b. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 112, n.10, p. 3471-3476, 2013b.

STONE B.F, HAYDOCK K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Canestrini). **Bulletin of Entomological Research**, v.53, p.563-578, 1962.

WEBSTER, A.; PRADEL, E.; SOUZA, U.A.; MARTINS, J.R.; RECK, J.; SCHORANK, A.; KLAFKE, G. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, p. 270-274,2017.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

### CAPÍTULO I

1. Timol, carvacrol e eugenol e seus derivados acetilados acetato de timila, acetato de carvacrila e acetato de eugenila apresentam atividade sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*.
2. O acetato de carvacrila, acetato de timila e acetato de eugenila possuem atividade para larvas de *R. microplus* inferior que os seus precursores timol, carvacrol e eugenol.
3. Entre os derivados acetilados, o acetato de carvacrila é a substância que apresenta maior atividade sobre *R. microplus*.

### CAPÍTULO II

1. Timol, carvacrol e eugenol apresentam atividade sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
2. Carvacrol e timol isolados apresentam atividade superior ao eugenol sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
3. A associação carvacrol + timol na concentração de 3,125 mg/mL apresenta efeito sinérgico sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
4. A associação de carvacrol + eugenol e timol + eugenol na concentração de 6,25 mg/mL apresenta efeito sinérgico sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
5. A associação de timol + carvacrol, timol + eugenol e carvacrol + eugenol incorporados a uma formulação apresentam efeito deletério sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*.
6. A associação de timol + carvacrol, timol + eugenol e carvacrol + eugenol incorporados a uma formulação não apresentaram eficácia sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

### CAPÍTULO III

1. Existe baixa variação na sensibilidade de populações de *R. microplus* aos monoterpenos timol e carvacrol.
2. Existe ampla variação de sensibilidade das populações aos princípios ativos deltametrina, amitraz e clorfenvinfós.
3. Não existe correlação entre valores de eficiência dos carrapaticidas com os valores de CL<sub>50</sub> para o timol e carvacrol.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Rhipicephalus microplus* é conhecido por causar grande prejuízo a produtores de leite e até o presente o momento o uso de acaricidas sintéticos são a principal forma de controle. Porém é crescente o número de populações de carrapatos resistentes a essas bases químicas e a busca por novas moléculas de origem vegetal tem aumentado a cada dia. Estudos com a modificação estrutural dessas moléculas estão sendo realizados, bem como a utilização das mesmas de forma associada. Isso poderá contribuir para a potencialização da atividade desses acaricidas sobre carrapatos, além de retardar o processo de resistência destes ixodídeos.

No primeiro capítulo foram constatadas a atividade carrapaticida, sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, de moléculas que tiveram a substituição do grupo hidroxila pelo grupo acetato. No segundo capítulo foram demonstrados a atividade acaricida da associação de monoterpenos timol e carvacrol e o fenilpropanoide eugenol sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como a atividade acaricida das associações incorporadas a formulação sobre larvas *R. microplus*, porém as formulações apresentaram baixa eficácia sobre fêmeas ingurgitadas desse ixodídeo. Embora os resultados com a formulação sobre larvas não ingurgitadas sejam animadores, é necessário dar continuidade aos estudos para tentar melhorar a atividade dessas formulações sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O método de controle com substâncias de origem vegetal ainda se encontra em fase de pesquisa, porém além de verificar a atividade carrapaticida dessas substâncias é necessário conhecer o perfil de sensibilidade de diferentes populações desses ixodídeos a esses novos acaricidas. Desta forma, o terceiro capítulo foram conduzidos com o objetivo de verificar a susceptibilidade de diferentes populações de *R. microplus* provenientes de diversas regiões do Brasil, aos monoterpenos timol e carvacrol. Os resultados encontrados permitiram verificar que as populações apresentam pequena variação de sensibilidade aos monoterpenos, sendo importante considerar essa variação no delineamento experimental. Além disso, o estudo possibilitou verificar que não há resistência cruzada entre carrapaticidas sintéticos e as moléculas estudadas.

## ANEXO

### **Artigo publicado:**

NOVATO, T., GOMES, G.A., ZERINGÓTA, V., FRANCO, C.T., OLIVEIRA, MELO, D., CARVALHO, M.G., DAEMON, E., MONTEIRO, C.M.O., 2018. In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 260, p. 1 – 4.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)



Short communication

## *In vitro* assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)



Tatiane Novato<sup>a,\*</sup>, Geovany Amorim Gomes<sup>b</sup>, Viviane Zeringóta<sup>c</sup>, Cristiane Teixeira Franco<sup>d</sup>, Débora Ramos de Oliveira<sup>e</sup>, Diego Melo<sup>f</sup>, Mário Geraldo de Carvalho<sup>e</sup>, Erik Daemon<sup>g,1</sup>, Caio Márcio de Oliveira Monteiro<sup>c,5</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), 23.890-000, Seropédica, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, 62040-730, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, s/n, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36.036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23.890-000, BR-465, Km 7 - Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, BR-465, Km 7 - Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>g</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, 74605-050, rua 35, s/n, Goiânia, Goiás, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Giant tick  
Carvacrol acetate  
Thymol acetate  
Eugenol acetate

### ABSTRACT

This study reports the comparative evaluation of the activity of carvacrol, thymol, eugenol and their respective acetylated derivatives (carvacrol acetate, thymol acetate and eugenol acetate) on *Rhipicephalus microplus*, to verify the possible influence of the acetate group. The acetylated derivatives were prepared from reactions of the phenolic compounds with acetic anhydride/pyridine. The formation of the products was confirmed by analysis of hydrogen and carbon-13 nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) spectra. The larval packet test was used to evaluate the acaricidal activity, with concentrations of 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 and 15.0 mg/mL. Thymol and carvacrol resulted in 100% mortality starting at the concentration of 2.5 mg/mL, while the same was observed for carvacrol acetate starting at the concentration of 5.0 mg/mL. For the other treatments, 100% mortality was only achieved in the groups treated with the highest concentration (15.0 mg/mL). The LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values (mg/mL) of carvacrol acetate (2.49, 4.21), thymol acetate (2.97, 8.52) and eugenol acetate (4.25, 13.10) were higher than those for the corresponding precursor molecules carvacrol (0.83, 2.02), thymol (1.26, 2.21) and eugenol (2.77, 5.35). The acetylation process did not enhance the activity of these substances on unengorged larvae of *R. microplus*, since the precursor substances (carvacrol, thymol and eugenol) had greater efficacy.