

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

Natália Cunha Muniz

**Efeito do carvacrol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari:
Ixodidae) em condições seminaturais e citogenotoxicidade sobre
Brachiaria ruziziensis R. Germain & Evrard (Poacea)**

Juiz de Fora

2018

Natália Cunha Muniz

Efeito do carvacrol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) em condições seminaturais e citogenotoxicidade sobre *Brachiaria ruziziensis* R. Germ & Evrard (Poaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Maturano Pinheiro

Co-orientador: Profa. Danielle Maria de Oliveira Aragão

Juiz de Fora

2018

Natália Cunha Muniz

Efeito do carvacrol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) em condições seminaturais e citogenotoxicidade sobre *Brachiaria ruziziensis* R. Germ & Evrard (Poacea)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ralph Maturano Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

Dra. Marcia Cristina de Azevedo Prata
Pesquisadora Embrapa Pecuária Sudeste - Parasitologia

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri
Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

Dedico essa dissertação à minha família e amigos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo fim dessa etapa. A minha mãe, Maria, por todo o apoio nesses dois anos, ao Vagner por todo amor e paciência, a Sarah pela chegada, a minha irmã Lara pelo encorajamento.

A professora Danielle Aragão que está presente desde a graduação, ao professor Ralph Maturano por aceitar minha “guarda” numa situação tão delicada.

Aos colegas do laboratório de Artrópodes Parasitos da UFJF.

Aos amigos Rogério, Luana, Jober, Bruna e Natália Fernandes por todo companheirismo nos últimos 6 anos.

A CAPES pela bolsa concedida.

A Embrapa Gado de Leite pela parceria, carrapatos e Brachiarias.

Ao Dr. Elyabe Monteiro de Barros pela ajuda com as análises.

Ao Prof. Dr. Lyderson Viccini pelo laboratório, boa vontade e disponibilidade.

Aos membros presentes na banca de qualificação pela consideração e por suas contribuições.

Ao professor Erik Daemon (*in memoriam*) por ter mudado a minha vida pra sempre. Sinto sua falta.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	21
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
2.2 Controle de carrapatos	15
2.3 Carvacrol	16
2.4 Carvacrol e o controle de carrapatos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Local do estudo	21
3.2 Origem dos carrapatos	21
3.3 Origem e diluição do carvacrol	21
3.4 Origem e preparação dos vasos contendo <i>Brachiaria ruziensis</i>	21
3.5 Bioensaio	22
3.6 Análise de Citogenotoxicidade do carvacrol sobre <i>Brachiaria ruziensis</i>	24
3.7 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES	32

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> recuperadas dos vasos com <i>Brachiaria ruziziensis</i> tratadas com carvacrol em diferentes concentrações e eficácia dos tratamentos.....	26
Tabela 2 – Concentração letal 50% (LC50) e 90% (LC90) de carvacrol diluído em etanol 50% em larvas não ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> sob condições seminaturais.....	27
Tabela 3 – Porcentagem média de morte celular avaliado por Citometria de Fluxo.....	27

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural do carvacrol	17
Figura 2 – Cienciometria	19
Figura 3 – Preparação das <i>Brachiarias ruziziensi</i>	22
Figura 4 – Bioensaio.....	23
Figura 5 – Citometria de fluxo.....	24
Figura 6 – Histogramas	26

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade carrapaticida do carvacrol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* em lâminas foliares de *Brachiaria ruziziensis*, bem como a genotoxicidade desta solução sobre esta espécie de gramínea. Soluções de carvacrol em concentrações de 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 e 20,00 mg/mL foram aspergidas em vasos que haviam recebido larvas não alimentadas de *R. microplus*. Após um período de 24h da aplicação, foram contabilizados os sobreviventes e calculada a eficiência de cada tratamento. Nas menores concentrações, os percentuais de eficiência foram semelhantes ao grupo controle, enquanto nas maiores concentrações, 10,00 e 20,00 mg/ml, a eficiência do tratamento foi de 89,84% e 94,66%, respectivamente. Na avaliação de genotoxicidade de *B. ruziziensis*, feita por análise de citometria de fluxo, foram observados danos celulares de até 100%. Portanto, é possível concluir que o carvacrol é

uma alternativa no controle de carrapatos, visando a redução da utilização de produtos químicos.

Palavras-chave: Controle, Monoterpeno, Citometria, Teste de campo, Genotoxicidade.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate an acaricide activity of carvacrol on larvae of *Rhipicephalus microplus* in leaf blades of *Brachiaria ruziziensis* and the genotoxicity of this solution on this species of grass. Carvacrol solutions in concentrations of 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 e 20,00 mg/mL were sprayed on vessels that had previously received non-fed *R. microplus* larvae. After a 24-hour application period, the survivors were accounted for and the efficiency of each treatment was calculated. At the lowest concentrations, the efficiency percentages were similar to those of the control, while at the highest concentrations, 10.00 and 20.00 mg/mL, the treatment efficiency was 89.84% and 94.66%, respectively. In the evaluation of genotoxicity of *B. ruziziensis*,

made by flow cytometric analysis, cellular damage up to 100% was observed. Therefore, it is possible to conclude that carvacrol is an alternative in the control of ticks, aiming to reduce the use of chemicals.

Keywords: Control, Monoterpene, Cytometry, Field test, Genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

A família dos carrapatos duros, chamada Ixodidae, engloba mais de 700 espécies descritas (GUGLIEMONE et al., 2014), e aproximadamente 10% de todas as espécies conhecidas de carrapatos são possíveis vetores de patógenos, protozoários, riquetsias, espiroquetas e vírus, para animais e humanos (JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1888) é a espécie de maior importância econômica da América do Sul (NARI, 1995). Artrópode ectoparasito hematófago, prejudica e reduz a produtividade do gado no Brasil (ALVES e OLIVEIRA, 2005). Seu ciclo de vida é tipo monoxeno, que obtém recursos de apenas um único hospedeiro (GUGLEGIOME et al., 2006). Os patógenos vetorados por esses artrópodes, quando associados, provocam o quadro conhecido como "Tristeza Parasitária Bovina" (FURLONG, 2005) e diversas outras complicações como perdas na produção animal por espoliação sanguínea, eventuais mortes dos indivíduos parasitados e perdas no rendimento de leite e carne (GUGLEGIOME et al., 2006). O Brasil possui o maior rebanho bovino em exploração comercial no mundo, com 218,2 milhões de animais, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016). As perdas econômicas causadas por *R. microplus* no país atingem um valor estimado de 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014) e em aspecto global, entre US\$ 13,9 e US\$ 18,7 bilhões, como estimado por de Castro, 1997.

Relativo às iniciativas de controle deste carrapato, os acaricidas químicos são frequentemente utilizados, principalmente através de pulverizações nos animais parasitados, o que contribui exercendo pressão seletiva, e favorecendo dessa maneira o aparecimento de populações resistentes às formulações sintéticas (RECK et al., 2014).

O uso indiscriminado de acaricidas pode causar poluição do solo em seus diversos horizontes, contaminação de corpos d'água, danos aos aplicadores humanos, intoxicação e morte dos animais. A necessidade de controlar esses artrópodes, de forma eficiente e segura, levou à busca de novos ativos de base vegetal, que minimizam os efeitos nocivos do uso de carrapaticidas químicos (GUERRERO et al., 2012), dado que o custo de desenvolvimento de uma nova droga de assistência à sanidade animal tem seu custo estimado em US\$100 milhões de dólares e o tempo de pesquisa, desde seu

desenvolvimento até os testes, chega a 10 anos (GRAF et al., 2004) fazendo-se necessário que haja cada vez mais alternativas disponíveis nesse mercado exaurido.

As substâncias de origem vegetal tem sido estudadas como potenciais vertentes no controle de carrapatos. A potencialidade de óleos essenciais de origem vegetal e seus constituintes como alternativas a serem usadas para suprimir esses ectoparasitos tem sido proeminente (REGNAULT-ROGER e PHILOGÈNE, 2008; MARTINEZ et al., 2011; NOVATO et al., 2015). Existe amplo espectro de uso dos componentes dos óleos essenciais em diferentes organismos alvo, dentre eles fungos (PASTER et al., 1995; MONTES-BELMONT e CARVAJAL, 1998; FENG e ZHENG, 2007), bactérias (BURT, 2004) e insetos (REGNAULT-ROGER, 1997). Dentre esses óleos e seus constituintes, carvacrol (2-Metil-5-(1-metil etil) fenol) destaca-se por atividades antifúngicas, desinfetante (AESCHBACH et al., 1994) e carrapaticida (CETIN et al., 2010; DOLAN et al., 2009; KOC et al., 2013), inclusive para *R. microplus* (COSTA-JÚNIOR et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013). Este monoterpene é encontrado no óleo essencial do tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerona (*Origanum majorana*) e orégano (*Origanum vulgare*) e é considerado seguro para consumo, sendo listado assim pela *United States Federal Drug Administration* para produtos alimentícios. No *European Commission* está aprovado como saborizante químico que pode ser encontrado em bebidas alcoólicas (SUNTRES et al. 2015). Tais propriedades fazem do carvacrol uma substância com potencial para, unida aos tratamentos atuais feitos no gado, iniciar um novo capítulo nas estratégias de controle de infestações por *R. microplus*.

A criação de gado de corte e de leite no Brasil é realizada predominantemente em pastagens. (MACEDO, 2009). No país, a área plantada com forrageiras se estende por mais de 100 milhões de acres, sendo que 85% dessa área é coberta por espécies do gênero *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* and *B. humidicola*) (SILVA et al., 2013). Dado que 95% dos carrapatos permanecem nas lâminas foliares das gramíneas que formam o pasto, e apenas 5% no hospedeiro, a aplicação de carrapaticidas diretamente na pastagem pode ser uma método eficaz de controle (LABRUNA et al., 2008).

Diante de tais perspectivas, esse trabalho verificou o potencial acaricida do carvacrol sobre larvas de *R. microplus* em folhas de *B. ruzizizensis* e também a atividade genotóxica desta substância sobre esta gramínea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Carrapatos estão entre os principais vetores de patógenos para humanos e animais domésticos (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1888), é a espécie de maior alcance geográfico e relevância para a indústria pecuária nas regiões tropicais e sub-tropicais mundiais (ALVES & OLIVEIRA, 2005). Proveniente da Índia, na Ásia Meridional, dispersou-se pelo mundo através do comércio e transporte de animais (NUÑES et al., 1982; LABRUNA et al., 2009; ESTRADA-PEÑA et al., 2012).

Esta espécie foi descrita como *Haemaphysalis micropla*, e posteriormente transferida para o gênero *Boophilus* (CURTICE, 1891). Recentemente, devido ao uso de ferramentas de biologia molecular, teve seu status taxonômico redefinido como *Rhipicephalus microplus* (GONZALES, 1974; LABRUNA et al., 2009). Evidências moleculares indicam que existem pelos menos duas espécies sinônimas denominadas *R. microplus*, reestabelecidas como linhagens americanas e africanas como *R. microplus* e a australiana como *Rhipicephalus australis* Fuller, 1899 (LABRUNA et al., 2009).

Uma vez que *R. microplus* é uma espécie monóxena, realiza todas as fases parasitárias de seu ciclo de vida em um único hospedeiro. A duração integral do período de parasitismo (larva à fêmea ingurgitada) compreende de 18 a 22 dias, podendo estender-se até 30 dias (BARROS et al., 2006). Cada fêmea ingurgitada chega a consumir 3 mL de sangue do hospedeiro, o que em infestações de grande volume, pode prejudicar severamente o animal (GONZALES, 1974).

Esse carrapato é vetor da bactéria *Anaplasma marginale* (KOCAN, 2007) e dos protozoários *Babesia bovis* (BABES, 1888) e *Babesia bigemina* (SMITH e KILBORNE, 1893), patógenos que, quando associados, resultam no quadro conhecido como “Complexo da Tristeza Parasitária Bovina”, causando grandes prejuízos aos pecuaristas e incapacitação dos animais, além de espoliação sanguínea, predisposição à miíases, estresse, anemia, redução de peso e produção de leite (GONÇALVES, 2000).

2.2 Controle de carrapatos

Inicia-se em 1896 o controle químico de carrapatos com a criação de um banho de arsênico diluído em água, eficiente mas extremamente tóxico ao gado. Em meados da década de 40 do século seguinte, começa o uso do DDT e outros organoclorados, substituindo os compostos de arsênico, cuja eficiência já havia sido reduzida. Em 1960, surgiram os organofosfatos que substituíram o uso dos organoclorados até a chegada das amidinas, sendo essas últimas substituídas no início dos anos 70 pelos piretróides, que se destacaram pelo seu amplo espectro de alcance em diferentes pragas, porém perdendo rapidamente sua eficácia nos anos 80 e 90. A classe mais recente em atuação são as benzofeniluréias, que tem como alvo a produção de quitina, que cabe salientar no que concerne ao controle de carrapatos, impede assim a muda de estágio dos mesmos e tem atuação destacada ao impedir que as larvas eclodam dos ovos, limitando a população de carrapatos na pastagem. (GRAF et al., 2004; FURLONG et al., 2007).

O controle de carrapatos é predominantemente feito através de acaricidas de bases químicas, que são classificadas de acordo com sua forma de atuação: de contato e sistêmicos. Os carrapaticidas de contato, que são empregados em pulverização, “pour on” ou imersão, atuam trespassando a cutícula ou orifícios do carrapato ao entrar em contato com esses artrópodes. Os carrapaticidas de ação sistêmica são aqueles que por derrame dorsal, injeções intramusculares ou pulverização, são absorvidos, metabolizados e distribuídos pela circulação sistêmica, chegando assim aos carrapatos que se alimentam no gado (FURLONG et al., 2007).

As diferentes classes de pesticidas atualmente no mercado possuem efeitos, persistência e impactos no ambiente muito diversos. Organoclorados são muito tóxico para humanos e artrópodes. Bioacumulativos, atingem diversos degraus da cadeia alimentar e são altamente persistentes no ambiente. Organofosfatos apresentam maior toxicidade em aves, mas sua persistência ambiental é menor que a dos organoclorados. Piretróides tem um acentuado efeito nocivo no meio ambiente, pois seu espectro de ação é amplo, atingindo também peixes e outros organismos aquáticos (KUNZ e KEMP, 1994).

O uso intensivo e não criterioso dos carrapaticidas resulta em pressão de seleção, aumentando assim a incidência de cepas resistentes. No entanto o desenvolvimento de resistência não ocorre em todos os indivíduos de uma população, nem com mesma intensidade dentro da mesma, sendo comum seu desenvolvimento em *R. microplus* devido às décadas de combate, aumentando assim a pressão seletiva sobre essa espécie (KUNZ e KEMP, 1994). Atualmente são comercializados no Brasil seis classes de acaricidas: organofosforados (clorpirifós), piretróides (cipermetrina), formamidinas (amitraz), avermectinas (ivermectina), fenilpirazóis (fipronil) e benzoilfeniluréias (fluazuron) (GIRALDI, 2016), havendo, porém, populações de *R. microplus* resistentes a todas elas (RECK et al., 2014).

Diferentes abordagens tem sido estudadas para controle desses ectoparasitos. Silenciamento gênico para produzir carrapatos estéreis ou com fertilidade reduzida (de la FUENTE et al., 2006), vacinas (WANG e NUTTALL, 1999; de la FUENTE et al., 1999; NUTTALL et al., 2006), óleos essenciais e seus componentes majoritários, em uma vertente que busca descobrir bases de origem vegetal para substituir ou atuar em conjunto com as bases sintéticas no mercado (ARAÚJO et al., 2016; NOVATO et al., 2015), nematóides (MONTEIRO et al., 2013; GOLO et al., 2016) e fungos entomopatogênicos (BITTENCOURT et al., 2003).

2.3 Carvacrol

Os óleos essenciais são compostos naturais voláteis derivados do metabolismo secundários de algumas plantas, e exercem papel de proteção contra herbivoria, fungos e bactérias. Caracterizam-se por serem compostos naturais, voláteis, líquidos, incolores,

lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos. Contém de 20 a 60 componentes, sendo que dois ou três desses, em concentrações mais altas, de 20 a 70%. O uso desses óleos para fins medicinais, estéticos, farmacêuticos, sanitários e agrícola é amplamente difundido, com registros que remontam ao período da Idade Média (BAKKALI et al., 2008). Devido à grande quantidade de constituintes, os óleos essenciais não possuem alvos celulares específicos (CARSON et al., 2002).

Os terpenóides, ou terpenos, constituem 90% das moléculas contidas nos óleos essenciais e devido à grande variedade de conformações estruturais que essas moléculas podem adotar, há amplo espectro de funções por elas exercidas (BAKKALI et al., 2008). Vários estudos demonstram a amplitude de atividades dessa classe química, como efeitos no sistema cardiovascular (SANTOS et al., 2011), preservativo e antioxidante da indústria farmacêutica e cosmética (MANOU et al., 1998), efeito inibidor de crescimento e germinação de sementes, e também de toxicidade severa em plantas vasculares (ASPLUND, 1968).

O carvacrol (Figura 1) é componente dos óleos essenciais extraídos de algumas plantas da família Lamiaceae, como orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e manjerona (*Origanum majorana*) (YANISHLIEVA et al., 1999; BAKKALI et al., 2008), e como a maioria dos óleos essenciais, em geral, é classificado como seguro para consumo (KABARA, 1991; SANTOYO et al., 2005).

Esta substância é um monoterpreno amplamente investigado por estudos que avaliam seu potencial antimicrobiano, antivirótico, antioxidante (SÖKMEN et al., 2004); suplemento alimentar veterinário (HASHEMIPOUR et al., 2013) e anticarcinogênico (ARUNASREE, 2010; KOPARAL e ZEYTINOĞLU, 2003; MEHDI et al., 2011). Porém, no trabalho de Xu et al. (2006), o carvacrol foi apontado como alérgeno epitelial e sensibilizante.

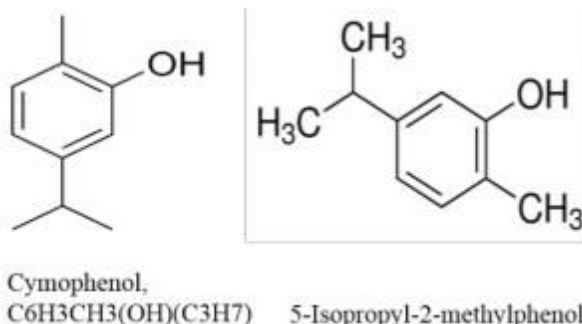


Figura 1 – Fórmula estrutural do carvacrol

2.4 Carvacrol e o controle de carrapatos

Uma série de resultados que corroboram a eficiência do carvacrol no controle de diferentes estágios e espécies de carrapatos tem sido documentada em literatura. Segundo o trabalho de Tabari et al. (2007) o carvacrol apresentou significativa diminuição nas taxas de eclosão de larvas de *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) com efeitos significativo em sua concentração mais baixa (concentração de 0,25% - taxa de eclosão 18%) e chegando a 100% de supressão de eclosão em concentração de 5%.

A volatilidade das soluções que utilizam carvacrol é um problema que da Silva-Lima et al. (2017) contornou utilizando uma técnica de microencapsulação com paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*, e comprovando a eficácia de tal técnica ao encontrar como resultado CL50 de 0,71 mg/mL com o carvacrol encapsulado contra uma CL50 de 1,82 mg/mL do composto não modificado, sobre larvas de uma cepa multirresistente de *R. microplus*.

Caracterizado por conter 75,70% de carvacrol como componente majoritário, o óleo essencial de *Origanum onites* L. demonstrou, no trabalho de Carrol et al. (2017), ser um eficiente repelente para ninfas de *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758); em biosensaio, o óleo alcançou 100% de repelência com 0,413 mg de óleo/cm² em papel filtro, porém quando testado sozinho em concentração de 0,075 mg de carvacrol/cm², a repelência foi de apenas 28,7% dos carrapatos.

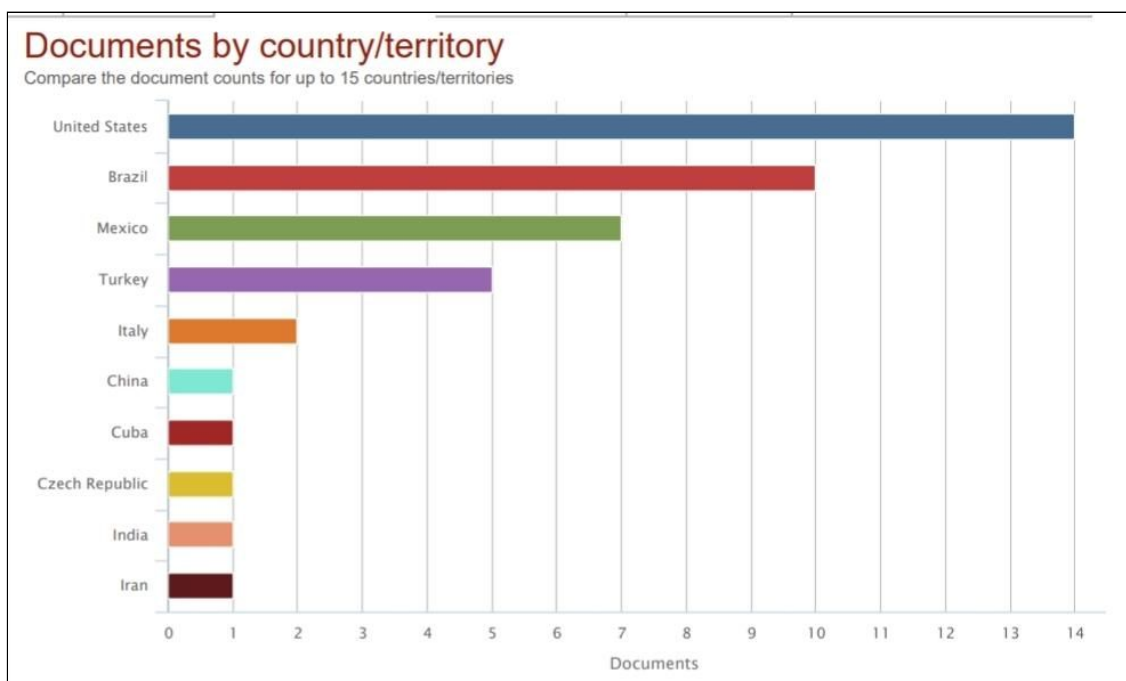
No estudo de Cetin et al. (2010), adultos não alimentados de *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), coletados em campo foram expostos a vapores de solução hidrodestilada de *Satureja thymbra* L., um óleo essencial que tem carvacrol (40%) e γ -terpineno (27%) como compostos majoritários. Como resultado deste ensaio, as câmaras de fumigação adaptadas que utilizaram concentrações de 40 μ L/L promoveram mortalidade total após 3 horas. No tratamento utilizando somente carvacrol a 10 μ L/L, após 24 horas foi verificada mortalidade de 57%.

Adultos não alimentados de *Rhipicephalus turanicus* (Pomerantsev, 1936) foram expostos através do teste de imersão, ao óleo essencial de *Origanum bilgeri* P.H. Davis,

cujo componente majoritário é carvacrol a uma concentração de 93,02%. Na maior concentração testada do óleo (8%), foi obtida mortalidade maior que 83%, demonstrando o potencial acaricida desse óleo para *R. turanicus* (KOC et al., 2013).

O efeito da associação de substâncias com potencial carrapaticida foi estudado por Araújo et al. (2016), com objetivo de avaliar atividade sinérgica, antagônica ou aditiva sobre as espécies *R. microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.). Ambas as espécies foram submetidas a teste de pacote de larvas utilizando combinações de eugenol, carvacrol e timol e como resultado. Os autores verificaram que todas as combinações possíveis, das citadas substâncias, agiram de forma sinérgica sob as larvas de *R. microplus*. Em relação a *R. sanguineus*, oito combinações de substâncias apresentaram efeito sinérgico, destacando que a associação de timol e carvacrol, que apresentou apenas um efeito sinérgico moderado.

Segundo análise cienciométrica, o Brasil está em segundo lugar no panorama mundial de pesquisas com carrapatos e carvacrol, em pesquisa realizada no Scopus (março de 2018) realizada avaliando o número de publicações por país nos últimos 20 anos - período compreendido entre 1998 e 2008 (Figura 2).



Fonte: Scopus, 2018

Figura 2 - Gráfico gerado pelo Scopus demonstrando o volume de pesquisas publicadas sobre Carvacrol e Carrapatos e os países correspondentes.

2.5 *Brachiaria ruzizensis*

No Brasil, a pecuária leiteira e de corte é alimentada majoritariamente através de pastagem, sendo 90% dos nutrientes alimentares do gado adquiridos por este meio (EUCLIDES et al., 2010). Segundo o último levantamento do IBGE, a área de forrageiras no Brasil diminuiu de 177,7 de para 162,9 milhões de hectares (IBGE, 2006).

Brachiaria é um gênero de plantas de regiões tropicais, de origem africana que abrange cerca de 80 espécies (DA COSTA MONTEIRO ET AL., 1974). O gênero foi primeiramente introduzido no Brasil em 1962 pelo Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias do Norte (IPEAN), com a *B. decumbens*. Devido a sua facilidade de se adaptar a diferentes tipos de solo, baixa manutenção, fácil cultivo, crescimento durante todo o ano, seguiram-se em anos subsequentes a introdução de mais subespécies, procurando explorar suas diferentes características, como *B. humidicola*, *B. ruzizensis* e *B. brizantha* (EUCLIDES et al., 2010).

Brachiaria ruzizensis Germain & Evrard, é também conhecida por "Congo signal grass", "Congo grass", "Ruzigrass" e "Kennedy Ruzi grass", é proximamente relacionada com *B. decumbens*. Semi-decumbente, apresenta até nove ráculos por inflorescência, ráquis de coloração púrpura, possui um aroma semelhante ao do capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.), raízes principalmente de hastes basais. A multiplicação dessa espécie é sexuada, o que viabiliza uma variabilidade genética e qualidade superior quando comparadas aos outros gêneros de *Brachiaria* (SOUZA SOBRINHO, 2005). aceitação de *B. ruzizensis* pelo gado é considerada boa, mesmo quando a planta não está nova (SERRÃO e SIMÃO NETO, 1971).

Embora seja a principal forrageira adotada nos pastos do Brasil, *Brachiaria* sp. pode causar a chamada fotossensibilização hepatógena, intoxicação que pode afetar bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos, mais comumente jovens. Tal toxicidade é fator limitante para essa cultura, e sua causa suspeita é a concentração de saponinas nas gramíneas, por razões ainda desconhecidas (RIET-CORREA, 2011).

A área plantada de forrageiras no Brasil excede 100 milhões de acres, sendo destes, 85% cultivares de *Brachiaria* spp. (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruzizensis* and *B. humidicola*) (SILVA et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Artrópodes Parasitos e no Laboratório de Genética e Biotecnologia, todos da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Origem dos carrapatos

As larvas de *R. microplus* foram obtidas através da ovipostura realizada por fêmeas ingurgitadas provenientes de criações de bovinos destinados à produção de leite no estado de Minas Gerais. Esses carrapatos foram gentilmente cedidos pela Embrapa Gado de Leite (EMBRAPA), localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

As fêmeas de carrapato foram depositadas em placas de Petri e mantidas em câmara climatizada controlada ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa superior a 80%) para realização da ovipostura. Após 15 dias, os ovos foram divididos em alíquotas de 100 mg e colocados em seringas plásticas com a região distal cortada e vedadas com algodão hidrofílico. Estas seringas foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade mencionadas para fêmeas ingurgitadas.

Para o experimento, foram utilizadas larvas com idade de 15 dias após a eclosão, sendo eleitas para o experimento as seringas com percentagem de eclosão acima de 95%.

3.3 Origem e diluição do carvacrol

O carvacrol foi adquirido da *Sigma-Aldrich* Corporation, com grau de pureza de 99.9%. As concentrações utilizadas nos testes foram de 1.25; 2.50; 5.00; 10.00; 20.00 mg/mL. A diluição foi feita utilizando solução hidroetanólica (1:1, água destilada: etanol).

3.4 Origem e preparação dos vasos contendo *Brachiaria ruziziensis*

Foram plantadas mudas de *B. ruziziensis* no início julho de 2015 em bandejas específicas. Após um mês, as mudas foram transferidas para vasos de plástico com medidas de 11 cm de altura e 14 cm de diâmetro.

Antes do início do experimento, todos os vasos plantados foram mantidos em uma área aberta com incidência direta de chuva e luz solar, localizada próxima ao Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (Figura 3A). As mudas foram regadas em dias alternados durante o período que precedeu o experimento. Para auxiliar no crescimento das plantas, a cada 20 dias foi feita aplicação de ureia, que cessou 30 dias antes do início do experimento. Na véspera do experimento as mudas foram podadas para que apenas a parte central dos potes contivesse grama, numa altura média de 40 cm (Figura 3B).

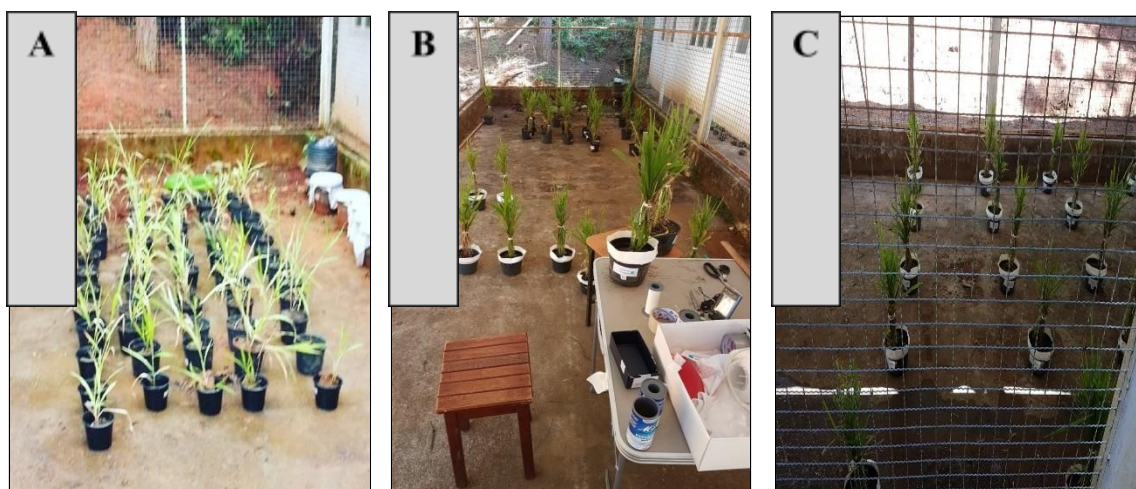


Figura 3 – Vasos contendo mudas de *Brachiaria ruziziensis*. A: vasos com mudas de *B. ruziziensis* em crescimento. B: Poda, amarra e colagem das fitas adesivas. C: Vasos preparados e local isolado para o início do experimento.

3.5 Bioensaio

No total, foram utilizados 28 vasos para os tratamentos (Figura 3C). O grupo controle contendo solvente foi formado por 4 vasos que receberam exclusivamente etanol 50%, sendo esse conhecido por apresentar baixa toxicidade as larvas de *R. microplus* (GONÇALVES et al. 2007). Outros 4 vasos formaram o grupo controle contendo apenas água destilada, estes últimos sem larvas, utilizado apenas como controle de citogenotoxicidade. O experimento teve início em 15 de março de 2017 sendo concluído em 72 horas. No primeiro dia, fitas adesivas foram afixadas ao redor dos vasos para prevenir o escape de larvas. Imediatamente após a colocação das fitas, as larvas foram depositadas na base da planta em cada um dos 24 potes (Figura 4A e 4B).

Após 24 horas, cada vaso foi examinado e verificada a migração das larvas para o ápice das folhas (Figura 4C). Em seguida, foram aplicadas as soluções referentes a cada grupo experimental. A aplicação foi feita com borrifador manual regulado para eliminar 25 mL de solução na parte superior da planta, onde as larvas estavam aglomeradas (Figura 4D). No momento da aplicação, cada pote foi levado até um local afastado dos demais vasos e, após a aplicação, os vasos foram mantidos abrigados da pluviosidade, dispostos em fileiras distantes entre si 60 cm. Devido à volatilidade do

carvacrol e do etanol, os potes dos grupos controle foram mantidos a uma distância mínima de 2m dos vasos dos grupos tratados.

Após completar 24 horas da aplicação das soluções, cada pote foi analisado individualmente, e as lâminas de *B. ruzizensis* que continham larvas foram cortadas com tesouras (Figura 4E), acomodadas em placas de Petri e levadas para o Laboratório de Artrópodos Parasitos, onde as larvas sobreviventes foram contadas utilizando bomba de vácuo (Figura 4F). Os indivíduos que permaneceram imóveis ou não responderam a estímulos tais como exposição a gás carbônico foram considerados mortos.

O número de larvas vivas encontradas no grupo controle foi comparada com os números de sobreviventes em cada grupo tratado. A eficácia dos tratamentos foi calculada pela fórmula adaptada de Bittencourt et al., (2003): $\% \text{ eficácia} = \frac{(B-A) \times 100}{A}$, onde A= média do número de larvas no grupo controle B= média do número de larvas em cada grupo tratado. O cálculo das concentrações letais (CL 50 % e CL 90 %) foi realizada pela análise de Probit

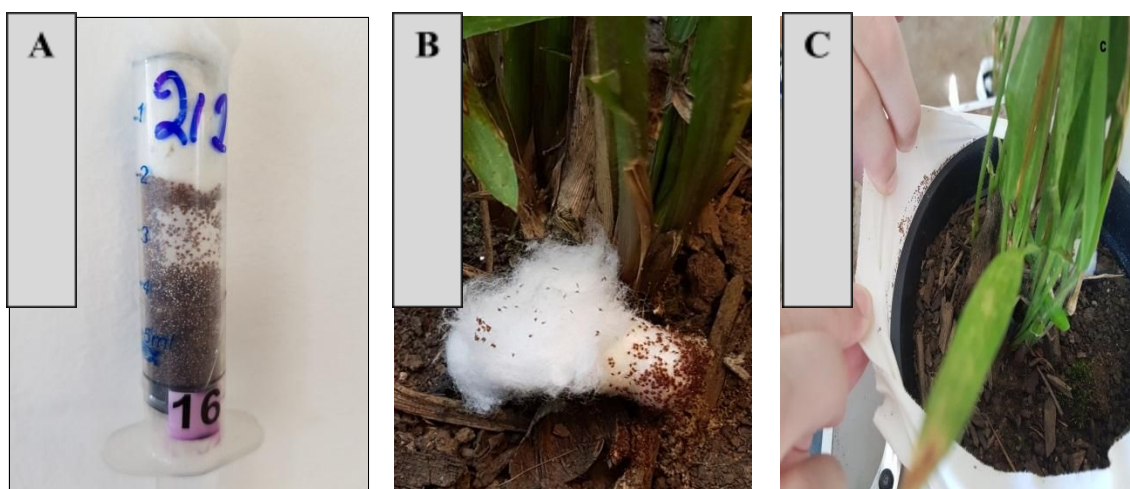




Figura 4 – Bioensaio. A: Seringa com larvas de *Rhipicephalus microplus*. B: Algodão com larvas depositadas ao pé da folhagem. C: Escape de larvas contido pela fita adesiva. D: Aplicação dos tratamentos. E: Poda das folhas com larvas no ápice. F: Contagem dos carrapatos sobreviventes.

3.6 Análise de Citogenotoxicidade do carvacrol sobre *Brachiaria ruziziensis*

Para quantificar percentual de células vivas e mortas, 48 horas após aplicação das soluções, aproximadamente 25 mg de folhas de *B. ruziziensis* foram cortadas e levadas ao Laboratório de Genética e Biotecnologia, onde foram maceradas em placas de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado usando lâmina de bisturi para liberação dos núcleos na suspensão (Dolezel et al. 1989) (Figura 5A). Os núcleos foram filtrados em membrana de nylon com malha de 50 μm e corados usando 30 μL de uma solução de iodeto de propídeo (PI, Sigma, USA) a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em cada amostra. As análises foram feitas em citômetro de fluxo (FACSCantoITM; Becton, Dickinson and Company, USA) (Figura 5B e 5C). Neste procedimento, cada unidade experimental do bioensaio anterior foi replicado três vezes, totalizando 12 amostras por tratamento.

Foram analisadas três amostras para cada indivíduo para avaliar a variação do conteúdo de DNA entre as amostras.

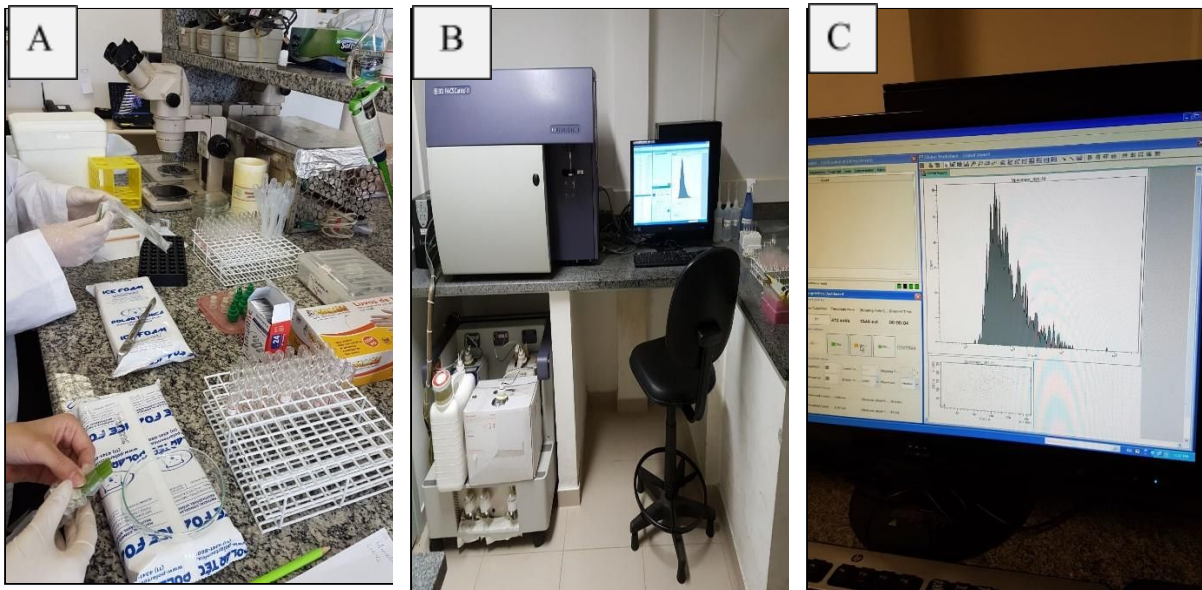


Figura 5 – Citometria de fluxo. A: Preparação das amostras a serem lidas. B: Citômetro de fluxo realizando leitura. C: Um histograma gerado a partir de uma das amostras tratadas.

3.7 Análise Estatística

Para comparação entre os tratamentos, foi utilizado o programa Biostat versão 5.0. Uma vez que os dados apresentaram distribuição não paramétrica, os valores foram comparados pelos testes Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) (FINNEY, 1971). Para o cálculo das concentrações letais, foi escolhida a análise de Probit

4 RESULTADOS

Houve, em média, menos de 500 larvas vivas nos tratamentos com as concentrações 5,0; 10,0 e 20,0 mg/mL, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do grupo controle (Tabela 1). Nos tratamentos com concentrações de 1,25; 2,50 e 5,00 mg/mL, a média de larvas vivas foi estatisticamente igual ao do grupo controle ($p > 0,05$). Nas concentrações mais baixas, os valores de eficácia dos tratamentos foram 4,85% e 5,58%, respectivamente. Os valores dos demais tratamentos foram 54,80% para a concentração de 5,00 mg/mL; 89,84% para 10 mg/mL e 94,66% no tratamento 20,00 mg/mL (Tabela 1). Os valores de concentração letal 50 e 90 (LC50 e LC90) foram 5,03 mg/mL e 12,17 mg/mL respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1. Média de larvas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas dos vasos com *Brachiaria ruziziensis* tratadas com carvacrol em diferentes concentrações e eficácia dos tratamentos (%) (média \pm erro padrão).

Tratamentos (mg/mL)	Larvas vivas (Média \pm SEM)	Eficácia dos tratamentos (%)
Controle (etanol 50° GL)	989,5 ^a \pm 105.27	
1,25	941,5 ^a \pm 135.32	4,85 ^a
2,50	934,25 ^a \pm 62.57	5,58 ^a
5,00	447,25 ^{ab} \pm 78.66	54,80 ^{ab}
10,00	100,5 ^b \pm 11.75	89,84 ^b
20,00	52,75 ^b \pm 11.12	94,66 ^b

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

Tabela 2. Concentração letal 50% (CL50) e 90% (CL90) de carvacrol diluído em etanol 50% em larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* sob condições seminaturais IC = intervalo de confiança.

CL50 (mg/mL)	IC (95 %)	CL90 (mg/mL)	IC (95 %)
5,03	4,27	12,17	9,37

Os dados obtidos na análise de citometria de fluxo e também através dos histogramas gerados, caracterizam-se pela aglomeração majoritária de partículas na região sub G1. Em todos os tratamentos e também nos grupos controle etanol 50% e H2O , foram observados morte celular superior a 50%, sendo 55,00 % para o controle H2O; 60,63% (Figura 6A), controle etanol, 70,43% (Figura 6A) e 100% para as duas últimas concentrações, de 10,00 mg/mL, 20,00 mg/mL. (Figura D) (Tabela 3).

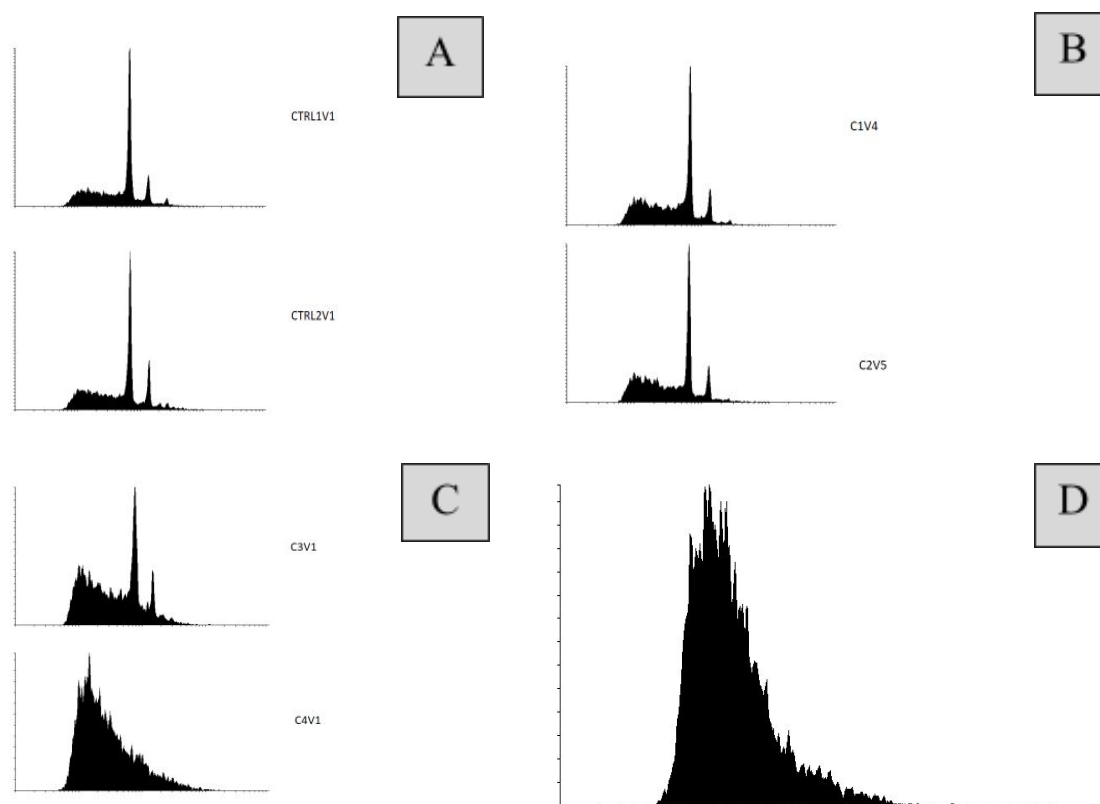


Figura 6 - Histogramas: A: Controle etanol 50% e H2O. B: Concentrações 1,25 mg/mL e 2,50 mg/mL. C: Concentrações 5,00 mg/mL e 10 mg/mL. D: Concentração 20,00 mg/mL.

Tabela 3. Porcentagem média de morte celular avaliado por Citometria de Fluxo e respectivas concentrações de carvacrol diluído em etanol 50% em *B. Ruzizensis* (média \pm desvio padrão).

Tratamentos (mg/mL)	Dano celular (%)
Controle (etanol 50° GL)	60,63 \pm 0,05 ^a
Controle H2O	55,00 \pm 0,08 ^a
1,25	70,43 \pm 0,07 ^{ab}
2,50	62,59 \pm 0,02 ^a
5,00	77,42 \pm 0,07 ^{ab}
10,00	100 \pm 0,00 ^b
20,00	100 \pm 0,00 ^b

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

5 DISCUSSÃO

Carvacrol é tóxico para larvas de *R. microplus*, conforme observado no presente estudo e também relatado na literatura para testes *in vitro* (SENRA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015). Um monoterpene isômero do carvacrol, o timol, apresenta ação neurotóxica que afeta os receptores GABA de insetos e supõe-se que seja esse o sítio de ação também em carrapatos (RATTAN, 2010) e, possivelmente, o mesmo ocorra quanto ao carvacrol. Utilizando a técnica do pacote modificado de larvas, Senra et al. (2013) obtiveram 100% de mortalidade na menor concentração testada (2,5 µl/ml). Tal eficiência pode ser atribuída ao ambiente laboratorial controlado, no qual são fornecidas condições ideais para que o produto aplicado fique em contato constante com as larvas. Em condições experimentais semelhantes às do presente estudo, Araújo et al. (2015) verificaram mortalidade superior a 90% para concentrações acima de 10,0 mg/mL de timol sobre *R. microplus*. No presente trabalho, embora a CL 50 seja diferente da de Araújo et al. (2015) (3,45 mg/mL para estes autores) o intervalo de confiança da CL50 de ambos os trabalhos se sobrepõe, o que sugere eficiências equivalentes.

Dolan et al. (2009) obtiveram êxito na supressão da abundância de ninfas de *Ixodes scapularis* (Say) e *Amblyomma americanum* (Linnaeus) em condições naturais por meio da aplicação de carvacrol na concentração de 5%. O presente trabalho conseguiu resultado semelhante com a formulação em sua maior concentração (20,0 mg/mL ≈ 2%). A supressão no presente trabalho não foi total, possivelmente devido às diferenças quanto às espécies e condições climáticas.

Confrontando-se com o emprego dos fitoterápicos, que ainda que sejam reconhecidos por sua eficácia e reprodutibilidade de resultados em controle de carrapatos (FIGUEIREDO, 2017) os fitoterápicos são extratos vegetais, uma mistura de diferentes compostos e variáveis proporções dos mesmos, o que pode comprometer a ação em alvos específicos (YUNES et al., 2001; CARSON et al., 2002). O presente trabalho apresenta um refinamento farmacológico, pois utiliza-se de uma só substância, já isolada, testada, classificada de acordo com sua eficácia e riscos de seu uso

(KABARA, 1991; SANTOYO et al., 2005; XU et al., 2006, SUNTRES et al. 2015;). Os dados sobre citogenotoxicidade em plantas da Família Poacea utilizando como ferramenta a citometria de fluxo são escassos. Esta ferramenta tem sido utilizada rotineiramente para estudos taxonômicos, de biologia reprodutiva e citogenéticos destes organismos (BAUMEL et al., 2003; PRICE et al., 2005; CONSAUL et al., 2008). No presente trabalho foi possível verificar que a aglomeração de partículas na região sub G1, correspondem à morte celular, como observado no trabalho de Faisal et al., (2013) que detectou picos de células em apoptose na região sub-G1 e redução das mesmas na fase G1, em uma análise citométrica da apoptose em raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), quando avaliou os perigos citotóxicos de nanopartículas de óxido de zinco sobre este vegetal. Já no estudo de Oliveira (2015), os autores observaram desintegração de material genético e aumento de sub-G1 na análise de citogenotoxicidade em *Allium cepa* utilizando citometria de fluxo como ferramenta.

É denominada alelopátia o conjunto de interações químicas entre plantas, que de algum modo influenciam no crescimento, desenvolvimento ou supressão dos mesmos entre elas (EINHELLIG, 1995; AZIRAK e KARAMAN, 2000). Os danos severos que alcançaram até 100% de destruição celular, observados nas concentrações mais altas desse estudo, podem ser parcialmente creditados ao carvacrol, uma vez que devido à sua estrutura química, monoterpênóide, pode causar danos fisiológicos e anatômicos em vegetais, conforme relatado por Almeida et al. (2010), e podendo inclusive degenerar organelas e núcleo celular de células vegetais (AZIRAK e KARAMAN, 2000).

Uma vez que *B. ruziziensis* é uma espécie de hábito perene (BOGDAN, 1977) e as plantas utilizadas tinham idade aproximada de 1 ano e 8 meses no momento da análise por citometria de fluxo, é possível que a idade das mesmas, devido a rapidez de seu ciclo de rebrota tenha interferido na mortalidade, o que explica a alta porcentagem de morte celular dos grupos controle (água destilada e etanol). Entretanto, os grupos dos tratamentos com carvacrol nas concentrações mais elevadas apresentaram dano celular estatisticamente diferente dos grupos controle. Porém, é interessante considerar a aplicação da concentração 5,00 mg/mL, visto que apresentou eficiência de 54,80% sobre as larvas de *R. microplus* e não apresentou dano celular estatisticamente maior que a água, fato que pode viabilizar o uso do carvacrol em baixas concentrações em estratégias manejo integrado de pragas.

O presente trabalho representa mais uma etapa na busca por avançar na linha de pesquisa que visa controlar carrapatos com fitoterápicos. Com base nos resultados alcançados, é possível que as próximas etapas abordem o controle em campo de maneira sistêmica, permitindo analisar o efeito desse composto na microbiota de solo, seu poder residual, toxicidade de ingestão e contato em mamíferos, e se há percolação para diferentes horizontes do solo com essa formulação, de maneira a avançar na vertente de controle de carrapatos no ambiente, justificando um novo modelo de abordagem paralelo ao atual já preconizado, que trata os animais parasitados.

6 CONCLUSÕES

- A solução de carvacrol diluído em etanol 50 é eficiente no controle de larvas de *R. microplus* em condições seminaturais;
- A partir do tratamento 10 mg/mL de carvacrol, as mudas de *B. ruziense* apresentam porcentagem de dano celular significativo;

O carvacrol apresenta potencial para se tornar uma vertente viável e eficiente a ser adotada no controle de *R. microplus*

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi realizado com a expectativa de oferecer novas vertentes de soluções a longo prazo para o controle de *R. microplus* através do uso de substâncias de origem vegetal ainda não empregadas em larga escala, o que elimina problemas com populações resistentes a esses ativos, dada a existência de alarmantes relatos de populações de *R. microplus* que demonstram resistência a múltiplos acaricidas (FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2012) e também de linhagens que não mais respondem a nenhuma das bases químicas disponíveis no mercado e usadas em estratégias controle no Brasil (RECK et al., 2014). O emprego do carvacrol como um coadjuvante aos já estabelecidos protocolos de tratamento e controle de carrapatos também apresenta como vantagem a volatilidade dessa molécula e seu já citado uso na indústria alimentícia (SUNTRES et al. 2015). Observamos assim, um potencial produto com reduzido impacto ecológico e com menor residual em relação a sua solubilidade, toxicidade e disponibilidade no ambiente, o que o favorece em relação aos acaricidas atualmente empregados que vem acompanhados de risco de contaminação e permanência na cadeia trófica (KISS et al., 2012).

REFERÊNCIAS

AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., SCOTT, B. C., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B., ARUOMA, O. I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 31-36, 1994.

ALVES, C. D., DE OLIVEIRA, P. R. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, 2005.

ARAÚJO, L. X., NOVATO, T. P. L., ZERINGOTA, V., MATOS, R. S., SENRA, T. O. S., MATURANO, R., MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. **Parasitology research**, v. 114, p. 3271-3276, 2015.

ARAÚJO, L. X., NOVATO, T. P. L., ZERINGOTA, V., MATURANO, R., MELO, D., DA SILVA, B. C., MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and veterinary entomology**, v. 30, n. 4, p. 377-382, 2016.

ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 581-588, 2010.

ASPLUND, R. OWEN. Monoterpenes: relationship between structure and inhibition of germination. **Phytochemistry**, v. 7, n. 11, p. 1995-1997, 1968.

AZIRAK, SEBILE; KARAMAN, SENGUL. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, v. 58, n. 1, p. 88-92, 2008.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARROS-BATTESTI, D. M., ARZUA, M., BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 2006.

BAUMEL, A. ET AL. Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina* × *neyrautii* re-examined. **Plant Systematics and Evolution**, v. 237, n. 1-2, p. 87-97, 2003.

BITTENCOURT, V. R. E. P., BAHIENSE, T. C., FERNANDES, E. K., SOUZA, E. J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 38-42, 2003.

BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants**. Longman, 1977.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CARROLL, JOHN F. et al. Repellency of the *Origanum onites* L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito. **Natural product research**, v. 31, n. 18, p. 2192-2197, 2017.

CARSON, CHRISTINE F.; MEE, BRIAN J.; RILEY, THOMAS V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

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 γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 170, p. 287-290, 2010.

CHAGAS, A. C. S., DE SENA OLIVEIRA, M. C., 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.

CONSAUL, LAURIE L.; GILLESPIE, LYNN J.; WATERWAY, MARCIA J. Systematics of three North American polyploid arctic alkali grasses (*Puccinellia*, Poaceae): morphology, ploidy, and AFLP markers. **Botany**, v. 86, n. 8, p. 916-937, 2008.

COSTA-JÚNIOR, L. M., MILLER, R. J., ALVES, P. B., BLANK, A. F., LI, A. Y., & DE 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.

CUNHA, A. P., BELLO, A. C. P. P., LEITE, R. C., OLIVEIRA, P. R., MARTINS, J. R., RIBEIRO, A. C. C. L., ROSA, R. C. D. Efeito da adubação com ureia em pastagem, sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 17, p. 64-68, 2008.

DA COSTA MONTEIRO, MARIA DO CARMO; DE LUCAS, ENÉSIO DELGADO; SOUTO, SEBASTIÃO MANHÃES. Estudo de seis espécies forrageiras do gênero *Brachiaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 17-20, 1974.

DA SILVA LIMA, ALDILENE et al. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 190-194, 2017.

DE CASTRO, JULIO J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary parasitology**, v. 71, n. 2-3, p. 77-97, 1997.

DE LA FUENTE, J. RODRIGUEZ, M., MONTERO, C., REDONDO, M., GARCIA-GARCIA, J. C., MÉNDEZ, L., RAMOS, E. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 15, n. 3-5, p. 143-148, 1999.

DE LA FUENTE, J., ALMAZÁN, C., NARANJO, V., BLOUIN, E. F., MEYER, J. M., KOCAN, K. M. Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA

interference. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 344, n. 1, p. 332-338, 2006.

DOLAN, M. C., JORDAN, R. A., SCHULZE, T. L., SCHULZE, C. J., MANNING, M. C., RUFFOLO, D., 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.

DOLEZEL, J., BINAROVA, P., LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, p. 113–120, 1989.

EINHELLIG, FRANK A. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy.

ESTRADA-PEÑA, A., VENZAL, J. M., NAVA, S., MANGOLD, A., GUGLIELMONE, A. A., LABRUNA, M. B., FUENTE, J. D. L. Reinstatement of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. **Journal of medical entomology**, v. 49, n. 4, p. 794-802, 2012.

EUCLIDES, VALÉRIA PACHECO BATISTA et al. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 151-168, 2010.

FAISAL, M., SAQUIB, Q., ALATAR, A. A., AL-KHEDHAIRY, A. A., HEGAZY, A. K., MUSARRAT, J. Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: a study on mechanism of cell death. **Journal of hazardous materials**, v. 250, p. 318-332, 2013.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food control**, v. 18, n. 9, p. 1126-1130, 2007.

FERNANDES, E. K. K., BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, n. 1-4, p. 71-93, 2008.

FERNÁNDEZ-SALAS, A., RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I., ALONSO-DÍAZ, M. A. (2012). First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. **Veterinary parasitology**, v. 183, p. 338-342.

FIGUEIREDO, AMANDA. Avaliação dos efeitos de princípios fitoterápicos e homeopáticos no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e comparação de técnicas para estimativa de eclosão de larvas in vitro. 2017.

FINNEY, D. J. Probit analysis. **New York, Ny**, v. 10022, p. 32, 1971.

FURLONG, J. Carrapato: problemas e soluções. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, v. 65, 2005.

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, p. 26-32, 2007.

GIRALDI, MAICON DEISON. Avaliação ecotoxicológica do Fluazuron: efeitos sobre a espécie "Eisenia andrei". 2016.

GOLO, P. S., DOS SANTOS, A. S. D. O., MONTEIRO, C. M. O., DE SOUZA PERINOTTO, W. M., QUINELATO, S., CAMARGO, M. G., BITTENCOURT, V. R. E. P. Lab-on-a-chip and SDS-PAGE analysis of hemolymph protein profile from *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) infected with entomopathogenic nematode and fungus. **Parasitology research**, v. 115, n. 9, p. 3459-3468, 2016.

GONÇALVES, K., TOIGO, E., ASCOLI, B., VON POSER, G., RIBEIRO, V. L. S. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology research**, v. 100, p. 1267-1270, 2007.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, 2000.

GONZALES, J. C. O carrapato do boi: vida, resistência, controle. **Mestre Jou**, 1974.

GRAF, J.-F. et al. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S427-S442, 2004.

GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R. D. S., BARROS, A. T. M. D., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H. D., VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GROSS, A. D., TEMEYER, K. B., DAY, T. A., DE LEÓN, A. A. P., KIMBER, M. J., COATS, J. R. Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target. **Chemico-biological interactions**, v. 263, p. 1-6, 2017.

GUGLIELMONE, A. A., ROBBINS, R. G., APANASKEVICH, D. A., PETNEY, T. N., ESTRADA-PEÑA, A., HORAK, I. **The hard ticks of the world**, p. 738, 2014.

GUGLIELMONE, A.A.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.S.; ESTRADA-PEÑA, A. 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, p. 115-124, 2006.

GUERRERO, F. D., LOVIS, L., MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 1-6, 2012.

HASHEMIPOUR, H., KERMANSHAHI, H., GOLIAN, A., VELDKAMP, T. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry science**, v. 92, n. 8, p. 2059-2069, 2013.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2016. Sistema IBGE de Recuperação Automática., Acesso em: 12 março. 2018.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.

KABARA, J. J. Phenols and chelators. **Food preservatives**, p. 200-214, 1991.

KARKABOUNAS, S., KOSTOULA, O. K., DASKALOU, T., VELTSISTAS, P., KARAMOUZIS, M., ZELOVITIS, I., SKOUFOS, I. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Experimental oncology**, v. 28, n. 2, p. 121-125, 2006.

KISS, TIMEA; CADAR, DÁNIEL; SPÎNU, MARINA. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Veterinary parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 357-366, 2012.

KOC, S., OZ, E., CINBILGEL, I., AYDIN, L., CETIN, H. (2013). Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* PH Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component,

carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 193, p. 316-319, 2013.

KOPARAL, A. T.; ZEYTINOĞLU, M. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. In: **Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects**. Springer, Dordrecht, p. 207-211, 2003.

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 13, n. 4, p. 1249-1286, 1994.

LABRUNA, M. B. Capítulo 5: Combate contra *R. (B.) microplus*. In: Pereira MC (ed) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, controle e resistência*. **MedVet Livros**, São Paulo, pp 65–80, 2008.

LABRUNA, M. B., NARANJO, V., MANGOLD, A. J., THOMPSON, C., ESTRADA-PEÑA, A., GUGLIELMONE, A. A., DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 46, 2009.

MACEDO, M. C. M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 1, p. 133-146, 2009.

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**, v. 48, p. 822-827, 2011.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M., CASTILLO-HERRERA, G. A., ROSARIO-CRUZ, R., FLORES-FERNANDEZ, J. M., LOPEZ-RAMIREZ, J., HERNANDEZ-GUTIERREZ, R., & DEL CARMEN LUGO-CERVANTES, E. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 108, p. 481-487, 2011.

MONTEIRO, C. M. O., ARAÚJO, L. X., MATOS, R. S., DA SILVA GOLO, P., ANGELO, I. C., DE SOUZA PERINOTTO, W. M., PRATA, M. C. A. Association

between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 112, n. 10, p. 3645-3651, 2013.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 616-619, 1998.

NAVA, S., BEATI, L., LABRUNA, M. B., CÁCERES, A. G., MANGOLD, A. J., & GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, p. 252-276, 2014.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 153-165, 1995.

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.

NOVATO, T. P. L., ARAÚJO, L. X., DE MONTEIRO, C. M. O., MATURANO, R., SENRA, T. D. O. S., DA SILVA MATOS, R., 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, n. 3-4, p. 331-335, 2015.

NUÑEZ, J. L.; MOLTEDO, M. E. Título: *Boophilus microplus*. la garrapata comun del ganado vacuno. P. imprenta: **Hemisferio Sur. Buenos Aires. (AR)**, p. 184 1982.

NUTTALL, P. A., TRIMNELL, A. R., KAZIMIROVA, M., LABUDA, M. NUTTALL, P. A. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite immunology**, v. 28, n. 4, p. 155-163, 2006.

DE OLIVEIRA CRUZ, ELIZANGELA MÉRCIA et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 198-202, 2013.

OLIVEIRA, P. R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13(suplemento 1), p. 118, 2004.

OLIVEIRA, CYNTHIA ELAINE DE et al. Citometria de fluxo como metodologia para análise de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: uma abordagem comparativa com a citogenética. 2015.

PASTER, N.; MENASHEROV, M.; RAVID, U.; JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 81-85, 1995.

PÉREZ DE LEÓN, A. A., TEEL, P. D., AUCLAIR, A. N., MESSENGER, M. T., GUERRERO, F. D., SCHUSTER, G., MILLER, R. J. Integrated strategy for sustainable cattle fever tick eradication in USA is required to mitigate the impact of global change. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 195, 2012.

PRICE, H. JAMES et al. Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 219-227, 2005.

REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, n. 1, p. 25-34, 1997

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B. J. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 1-2, p. 41-52, 2008.

RECK, J., KLAFKE, G. M., WEBSTER, A., DALL'AGNOL, B., SCHEFFER, R., SOUZA, U. A., DE SOUZA 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.

RIET-CORREA, BEATRIZ et al. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 183-192, 2011.

ROMÁRIO, A. C. D. S. C., FURLONG, C. L. J., PRATES, H. T., PASSOS, W. M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v. 33, 2003.

SANTOS, Márcio RV et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.

SCORALIK, M. G., DAEMON, E., DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M., 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, p. 645-648, 2012.

SENRA, T. D. O. S., ZERINGÓTA, V., DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M., CALMON, F., MATURANO, R., GOMES, G. A., 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.

SERRÃO, EA DE S.; SIMAO NETO, MIGUEL. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Everard. **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1971.

SILVA, P. I., MARTINS, A. M., GOUVEA, E. G., PESSOA-FILHO, M., FERREIRA, M. E. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p. 17, 2013.

SOBRINHO, F. Souza; LÉDO, F. J. S.; KOPP, Maurício Marini. Estacionalidade e estabilidade de produção de forragem de progênes de *Brachiaria ruziziensis*. **Ciênc. Agrotec.**, v. 35, n. 4, p. 685-691, 2011.

SUNTRES, Z. E., COCCIMIGLIO, J., ALIPOUR, M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, p. 304-318, 2015.

TABARI, MOHADDESEH ABOUHOSSEINI et al. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 245, p. 86-91, 2017.

WANG, H.; NUTTALL, P. A. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 56, n. 3-4, p. 286-295, 1999.

XU, HAOXING et al. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 628, 2006.

YUNES, ROSENDO A.; PEDROSA, ROZANGELA CURI; CECHINEL FILHO, VALDIR. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

