

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

Valéria de Mello

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da eficácia carrapaticida de formulações de contato à base dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus*, *Syzygium aromaticum* e *Rosmarinus officinalis*

Juiz de Fora  
2014

Valéria de Mello

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da eficácia carrapaticida de  
formulações de contato à base dos óleos essenciais de  
*Cymbopogon winterianus*, *Syzygium aromaticum* e *Rosmarinus  
officinalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais Biotiavos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Penha Henriques do Amaral

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Márcia Cristina de Azevedo Prata

Juiz de Fora

2014

Valéria de Mello

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da eficácia carrapaticida de formulações de contato à base de óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus*, *Syzygium aromaticum* e *Rosmarinus officinalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais Biotiavos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 21/07/2014

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Maria da Penha Henriques do Amaral  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Marcelo Henrique Otênio  
Embrapa Gado de Leite – MG

Dedico este trabalho ao meu pai (*in memoriam*), ao meu padrinho Hélio (*in memoriam*), aos meus familiares e a todos os amigos presentes e ausentes.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de seguimento dos meus estudos

A CAPES, pelo apoio financeiro na forma de bolsa

A Embrapa Gado de Leite – MG, pela disponibilização do laboratório de Parasitologia para a realização dos experimentos

A Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas análises de CG/EM

A coordenação do curso de mestrado em Ciências Farmacêuticas

Aos membros da banca examinadora: Dr. Erik Daemon, Dr. Marcelo Otênio, Dra. Magda Narciso Leite e Dra. Marta Martins

A Profa. Dra. Maria da Penha Henriques do Amaral, pela orientação, dedicação e paciência

A Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata – co-orientadora, pela oportunidade da realização desta pesquisa na Embrapa Gado de Leite e suas orientações

A Profa. Dra. Miriam Aparecida de Oliveira Pinto, por suas orientações

Ao Prof. Dr. Marcio Roberto Silva, por suas excelentes aulas de estatística

A Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto, pelo auxílio na realização deste trabalho

Aos professores do mestrado em Ciências Farmacêuticas

Aos amigos do mestrado, pela agradável convivência, em especial a Flávia e o Gustavo.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, da Embrapa Gado de Leite, em especial Michele, pela disponibilidade e colaboração.

As estagiárias: Letícia, Renata e Luciane, pela colaboração e apoio.

A minha família, em especial às minhas irmãs Érica e Tatiana e à minha tia Rita, pelo apoio constante

A todos os amigos de caminhada, especialmente Fernanda Pereira e Salomé Dias.

## RESUMO

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) é responsável por sérios prejuízos à pecuária brasileira, considerando-se os custos do controle, perda de receita devido a menor produção de leite e carne, danos ao couro, além da transmissão de doenças. A utilização de plantas medicinais é considerada uma alternativa a resistência recorrente aos produtos químicos. Diante da necessidade de alternativas eficazes e com menores impactos ambientais o objetivo desse estudo foi desenvolver formulações de contato contendo os óleos essenciais das plantas Citronela-de-Java (*Cymbopogon winterianus*), Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e Alecrim-da-horta (*Rosmarinus officinalis*) e avaliar *in vitro* os efeitos acaricidas em diferentes etapas do ciclo do carrapato. Para tanto foram utilizadas concentrações que variaram de 0,5 – 15,0% dos óleos essenciais incorporados nas formulações. Os carrapatos provenientes de diferentes regiões geográficas foram tratados com as formulações e avaliados os efeitos das mesmas sobre o índice de produção de ovos, a eclosão larval e a eficácia carrapaticida. Os resultados obtidos foram comparados com produtos acaricidas comerciais. Após o 20º dia do tratamento as formulações contendo o óleo essencial de citronela tiveram eficácia acaricida entre 2,09 – 55,51%, com o óleo essencial de cravo-da-índia, 92,47 - 100% e 26,44 - 40,78% com o óleo essencial de alecrim. Na associação dos óleos essenciais obteve-se eficiência de 84,68 – 90,73% para a associação do cravo-da-índia com o óleo essencial de citronela e 30,54 – 64,25% na associação de citronela com o alecrim. Os resultados demonstraram a atividade carrapaticida das formulações testadas, quando comparadas com os produtos químicos utilizados pelos produtores. Estudos *in vivo* necessitam ser realizados para validar a eficiência das formulações em condições de campo, visando a utilização desses produtos como uma alternativa para o controle do carrapato bovino.

Palavras-chave: Ectoparasitismo. Formulação carrapaticida. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Carrapato bovino

## ABSTRACT

The cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) is responsible for serious losses to Brazilian cattle, considering the costs of control, loss of revenue due to lower production of milk and meat, leather damage, beyond the transmission of diseases. The use of medicinal plants is considered an alternative to the applicant chemical resistance. Facing the necessity to effective alternatives with lower environmental impacts, the objective of this study was to develop contacts' formulations containing essential oils of Citronella (*Cymbopogon winterianus*), Clove (*Syzygium aromaticum*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) plants and evaluate *in vitro* acaricidal effects on different stages of the cycle of the tick. For this purpose, concentrations were used ranging from 0.5 - 15.0% of essential oils incorporated into the formulations. Ticks from different geographic regions were treated with the formulations and their effects on the rate of egg production, larval hatching and its efficiency on ticks were evaluated. The results were compared with chemistry acaricidal products. After the 20th day of treatment formulations containing the citronella's essential oil had acaricidal efficacy between 2.09 to 55.51 %, with the clove's essential clove, 92.47 to 100% and 26.44 to 40,78 % with rosemary's essential oil. The association of clove essential oil with citronella essential oil obtained efficiency from 84.68 to 90.73% and for the association of citronella oil with rosemary oil, was 30.54 to 64.25%. The results showed the acaricidal activity of the tested formulations when compared to the chemicals acaricidal products. *In vivo* studies need to be conducted to validate the efficiency of the formulations under field conditions in order to use these products as an alternative for the control of cattle tick.

Keywords: Ectoparasitic. Acaricidal formulation. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cattle tick.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Carrapato dos bovinos .....	15
Figura 2 Ciclo de vida do carrapato dos bovinos.....	17
Figura 3 Biossíntese dos terpenos .....	25
Figura 4 Exemplo de terpenos .....	25
Figura 5 Biossíntese dos fenilpropanóides.....	26
Figura 6 Eugenol .....	27
Figura 7 Citronela-de-Java .....	28
Figura 8 Alecrim-da-horta.....	30
Figura 9 Cravo-da-Índia .....	31
Figuras 10 A Citronela sendo cortada .....	38
Figuras 10B Pesagem do Cravo-da-Índia .....	38
Figuras 10C Hidrodestilação do Alecrim .....	38
Figuras 11 A Formulação base .....	42
Figuras 11B Formulação contendo óleo essencial de alecrim a 10% .....	42
Figuras 11C Formulação contendo óleo essencial de citronela a 10% .....	42
Figuras 11D Formulação contendo óleo essencial de cravo-da-índia a 0,5% .....	42
Figuras 12 A Carrapatos de uma mesma população .....	44
Figuras 12 B Fêmeas mergulhadas na formulação.....	44
Figuras 12 C Fêmeas fixadas na placa de Petri.....	44
Figuras 12 D Ovoposição .....	44
Figuras 12 E Coleta da ovoposição.....	45
Figuras 12 F Ovos na seringa lacrada .....	45
Figura 13 Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de citronela, com destaque para o componente majoritário. ....	48
Figura 14 Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de cravo-da- índia, com destaque para o componente majoritário.....	49
Figura 15 Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de alecrim, com destaque para os componentes majoritários. ....	49



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais grupos químicos carrapaticidas de contato, empregados nas formas de aplicação: pulverização, imersão e <i>pour on</i> .....	19
Tabela 2 Principais grupos químicos de carrapaticidas sistêmicos, empregados nas formas de aplicação: injeção subcutânea, intramuscular e derrame dorsal no lombo do bovino .....	19
Tabela 3 Formulações contendo os óleos essenciais de <i>Cymbopogon winterianus</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i> nas diversas concentrações(%), formuladas para a avaliação carrapaticida sobre as populações de carrapatos provenientes da Embrapa Gado de Leite – MG, Votuporanga – SP e Perdizes – MG.....	41
Tabela 4 Formulações com as associações dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon winterianus</i> e <i>Syzygium aromaticum</i> e <i>Cymbopogon winterianus</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i> nas diversas concentrações (%), formuladas para a avaliação carrapaticida sobre as populações de carrapatos provenientes de Votuporanga – SP e Perdizes - MG .....	41
Tabela 5 Produtos químicos utilizados pela Embrapa para o Teste de Sensibilidade de Carrapatos a Carrapaticidas com código de identificação, composição e eficácia do tratamento (%C) para as populações de carrapatos de Votuporanga - SP; Perdizes - MG e do campo experimental José Henrique Bruschi (CEJHB/Embrapa) - MG.....	46
Tabela 6 Peso médio (g) de planta utilizada por extração, média de óleo obtido por extração e rendimento médio das extrações dos óleos essenciais de citronela, cravo-da-índia e alecrim.....	48
Tabela 7 Formulação base (veículo) para incorporação dos óleos essenciais .....	50
Tabela 8 Características organolépticas e pH das formulações incorporadas dos óleos essenciais nas concentrações de 0,5 – 15% .....	50
Tabela 9 Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% de óleo essencial de citronela sobre IPO, EL e %C testadas em populações de carrapatos provenientes da EMBRAPA Gado de Leite, MG e Votuporanga, SP .....	52

Tabela 10 Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% de óleo essencial de cravo-da-índia sobre IPO, EL e %C testadas em populações de carrapatos provenientes de Votuporanga, SP e Perdizes, MG.....	53
Tabela 11 Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% de óleo essencial de alecrim sobre IPO, EL e %C testadas em população de carrapatos provenientes de Perdizes, MG .....	54
Tabela 12 Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% da associação de óleo essencial citronela e de cravo-da-índia sobre IPO, EL e %C testadas em população de carrapatos provenientes de Votuporanga, SP .....	54
Tabela 13 Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% da associação dos óleos essenciais de alecrim e citronela sobre IPO, EL e %C testadas em população de carrapatos provenientes de Perdizes, MG.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%C	Eficiência do tratamento
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
EL	Eclosão Larval
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPO	Índice de Produção de Ovos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 CARRAPATO <i>RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS</i> .....	15
<b>2.1.1 Ciclo de vida do carrapato</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.2 Controle do carrapato</b> .....	<b>17</b>
2.1.2.1 Carrapaticidas de contato.....	18
2.1.2.2 Carrapaticidas sistêmicos.....	19
2.1.2.3 Vacinas.....	20
<b>2.1.3 Resistência aos carrapaticidas</b> .....	<b>20</b>
2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA AOS PRODUTOS CARRAPATICIDAS .....	21
<b>2.2.1 Óleos essenciais</b> .....	<b>22</b>
2.2.1.1. Biossíntese dos óleos essenciais .....	23
2.2.1.2. Terpenos .....	24
2.2.1.3 Substâncias aromáticas de baixo peso molecular.....	25
2.3 <i>CYMBOPOGON WINTERIANUS</i> JOWITT EX BOR – CITRONELA-DE- JAVA.....	27
2.4 <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> L. – ALECRIM-DA-HORTA .....	28
2.5 <i>SYZYGIUM AROMATICUM</i> MERRIL ET PERRY– CRAVO-DA-ÍNDIA .....	30
2.6 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES .....	31
<b>2.6.1 Desenvolvimento farmacotécnico</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6.2 Composição de formulações</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.3 Emulsão</b> .....	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DOS TRABALHOS .....	37
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	37
4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	37
4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	38
4.5 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	40

4.6 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	43
4.7 AVALIAÇÃO CARRAPATICIDA <i>IN VITRO</i> .....	43
<b>4.7.1 Seleção das fêmeas ingurgitadas .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7.2 Realização dos experimentos .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7.3 Avaliação do efeito do tratamento .....</b>	<b>45</b>
<b>4.7.4 Análise estatística .....</b>	<b>47</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS:.....	48
5.2 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	48
5.3 FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA .....	50
5.4 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE CARRAPATICIDA .....	51
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A agropecuária tem papel fundamental no desenvolvimento da economia de um país que vão desde o fornecimento de alimentos até a geração de emprego, renda e mercado consumidor para bens industrializados (BRASIL, 2014).

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e conseqüentemente da economia nacional, sendo a pecuária leiteira uma das atividades mais tradicionais do meio rural brasileiro, além da pecuária de corte ser considerada um dos pilares do agronegócio brasileiro (BRASIL, 2014).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, que totalizou, em 2011, 212.798 milhões de cabeças, concentrando-se na Região Centro-Oeste do País (34,1%). As perdas econômicas no país, relacionadas ao carrapato dos bovinos, estão estimadas em 3,24 bilhões de dólares por ano, perdas estas representadas tanto pela ação direta do parasito no bovino, bem como pelo custo dos sistemas de controle (ALVES *et al.*, 2012; BRASIL, 2011; CHAGAS *et al.*, 2011, GRISI *et al.*, 2014; OLIVO *et al.*, 2008, PEREIRA *et al.*, 2012).

A intensa atividade agrícola, a interação entre o homem e os animais domésticos e o histórico das mudanças climáticas no mundo são fatores que favorecem a disseminação de agentes infecciosos que podem ser transmitidos por carrapatos, levando ao surgimento e ressurgimento de diferentes agentes etiológicos (POLITI *et al.*, 2012).

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), além de causar espoliação sanguínea por hematofagismo no animal, provoca lesões no couro, além de ser o principal transmissor dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e da rickettsia *Anaplasma marginale*, causadores respectivamente da babesiose bovina e anaplasmoze, conhecidas popularmente como “tristeza bovina parasitária” (CHAGAS *et al.* 2002; TRINDADE *et al.*, 2011).

Os carrapaticidas sintéticos são o principal meio de controle deste parasito, entretanto sua utilização tem se tornando menos viável em termos práticos e econômicos devido ao fenômeno da resistência (PIVOTO *et al.*, 2010, SANTOS *et al.*, 2012).

De acordo com Graf *et al.* (2004), devido ao aparecimento dessa resistência, a oferta de acaricidas eficazes se tornará cada vez menor e medidas preventivas devem ser tomadas para ampliar o número de produtos; entretanto, o processo de desenvolvimento de novos acaricidas é longo e caro.

A necessidade de métodos mais seguros, menos agressivos ao homem e ao meio ambiente, tem estimulado a busca de novos acaricidas, como os obtidos a partir de plantas medicinais. Acredita-se que o uso de extratos vegetais e óleos essenciais, de forma isolada ou associada, possam reduzir o índice da resistência aos acaricidas comerciais (BROGLIO-MICHELETTI *et al.*, 2009; MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.*, 2011).

Relatos científicos apresentaram as famílias Poaceae, Myrtaceae e Lamiaceae, dentro outros, com propriedades acaricidas significativas (MARTINS e GONZÁLEZ *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009; WANY *et al.*, 2013).

A planta *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae), popularmente conhecida como Citronela-de-java ou Capim-citronela, apresenta propriedades repelente, acaricida, larvicida, além de atividades antifúngica e antibacteriana (AGNOLIN *et al.*, 2010; MARTINS 2006; OLIVO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2012). Já a planta *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & L.M. Perry (Myrtaceae), conhecida como Cravo-da-índia possui propriedades, além de acaricida, também antioxidante, antiagregante plaquetária, antimicrobiana e antifúngica, sendo amplamente utilizada na odontologia (AFFONSO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2009). O Alecrim-pimenta, *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), é utilizado na terapêutica de Parkinson e Alzheimer, possuindo ainda comprovadas atividades antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatória e carrapaticida (JALALI-HERAV *et al.*, 2011; MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2012).

No presente estudo foram desenvolvidas formulações de contato, contendo como princípios ativos os óleos essenciais de citronela, cravo-da-índia e alecrim, avaliando-se a atividade carrapaticida *in vitro*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), (Figura 1) é o mais importante ectoparasito em áreas de exploração pecuária, tanto em regiões tropicais quanto subtropicais, sendo responsável por severas perdas econômicas (AMERICA,1972; BROGLIO-MICHELETTI *et al.*, 2009; MICHELETTI *et al.*, 2010). Estas perdas estão em torno de 3,24 bilhões de dólares por ano no Brasil (GRISI *et al.*, 2014).

É um parasito extremamente bem adaptado às condições de clima de grande parte do país, e aliado à presença de seus hospedeiros distribuídos por mais de 80% do território nacional, se torna um problema de grandes proporções à bovinocultura brasileira (POTARROYO e SOSSAI, 2004).

Figura 1 Carrapato dos bovinos



Fonte: o autor (2014)

Por parasitar especificamente os bovinos é conhecido popularmente como carrapato bovino ou carrapato do boi, porém pode esporadicamente parasitar outros animais, como eqüinos e ovinos (CHAGAS *et al.*, 2003).

Segundo Brito *et al.* (2010), cada fêmea ingere durante sua fase parasitária 0,5mL a 1,0mL de sangue e determina uma perda média, no bovino, estimada em 1,0g de peso vivo/carrapato e 8,9mL de leite, resultando em anemia e perdas na produção de leite e carne. Nos pontos de fixação, as lesões e reações inflamatórias



causadas, e os danos ao couro do animal facilitam a penetração de larvas e moscas causadoras das bicheiras e do berne (FURLONG *et al.*, 2005).

O carrapato também é o vetor dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e da rickettsia *Anaplasma marginale*, que são os agentes causadores, respectivamente, da babesiose e da anaplasmose, constituindo juntos um complexo de enfermidades com sinais clínicos e epidemiologia similares denominando-se “Tristeza Bovina Parasitária”, causando altos índices de mortalidade aos animais (PEREIRA, 2012).

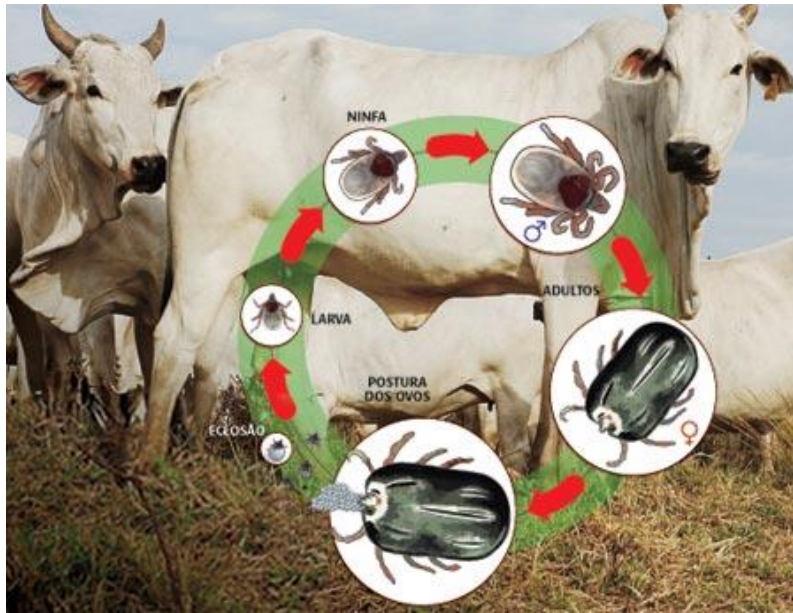
### **2.1.1 Ciclo de vida do carrapato**

O ciclo de vida do carrapato dos bovinos é monoxeno, ou seja, necessita de um hospedeiro em seu ciclo de vida (Figura 2). É dividido em duas fases distintas: uma nos bovinos, denominada de fase de vida parasitária, e a outra, no solo, denominada fase de vida livre (ROCHA, 2011; SONENSHINE, 1991).

Na fase de vida parasitária, a larva, fixada no bovino, se desenvolve respectivamente em metalarva, ninfa e metaninfa, que podem sair como machos (neandros) ou fêmeas (neógenas). As neógenas são fecundadas e iniciam o processo de ingurgitamento ainda no animal. Em aproximadamente 5 dias, tem o seu tamanho aumentado de 3 a 4 vezes, sendo denominadas teleóginas, fêmea ingurgitada ou fêmeas cheias de sangue. Ocorre, em seguida, o desprendimento do bovino, iniciando-se a fase de vida livre (AGNOLIN *et al.*, 2012).

Na fase de vida livre, no solo, a fêmea ingurgitada procura um local úmido e escuro para a realização da postura, que pode chegar a 3.000 ovos, morrendo após terem completado a postura. Num período de quatro semanas, aproximadamente, dependendo da temperatura (27°C) e da umidade do ar de, aproximadamente 70%, ocorre a eclosão larval. Estas larvas, por geotropismo negativo, se instalam no ápice do talo das plantas e ficam à espera do hospedeiro, o bovino, iniciando a fase parasitária (FURLONG *et al.*, 2005).

Figura 2 - Ciclo de vida do carrapato dos bovinos



Fonte: Barreto (2008)

Conhecendo-se o ciclo de vida dos carrapatos, nos diversos meses do ano, é possível melhorar a eficiência no seu controle, utilizando-se o chamado sistema estratégico de controle, que integrado com outras práticas de manejo relacionadas aos animais e à pastagem possibilitam a diminuição da população de carrapatos (MICHELETTI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2009).

### 2.1.2 Controle do carrapato

A aplicação de carrapaticida, com diferentes grupos químicos, é a maneira mais utilizada para controlar os carrapatos dos bovinos. Segundo Furlong *et al.* (2007), desde o século XIX ocorrem pesquisas com o intuito de obter novos produtos com ação neste ectoparasito.

A maioria dos produtos utilizados para controlar as pragas, especialmente na agricultura, era constituída de compostos inorgânicos e de extratos de vegetais, com destaque para a nicotina e a rotenona. O ano de 1939 marca uma brusca transição na metodologia do controle das pragas com a descoberta, por Paul Müller, das propriedades inseticidas do DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano). Pelo seu notável poder residual, o DDT foi amplamente divulgado e extensivamente utilizado como inseticida e carrapaticida em bovinos, porém este mesmo efeito residual levou à restrição do seu emprego devido à acumulação no ambiente e na cadeia alimentar,

assim como o aparecimento da resistência dos carrapatos a esta substância. Apenas os programas de controle da malária em áreas endêmicas continuaram utilizando este produto e houve proibição de uso em diversos países (LARINI, 1999).

Existem cerca de 7.222 produtos de uso veterinário autorizados para comercialização no país, com destaque para os antibióticos e os de combate aos ectoparasitos, em particular os carrapaticidas. Esses produtos são regulados exclusivamente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (SILVA *et al.*, 2012).

De acordo com Brasil (1997) para que um produto seja aprovado como carrapaticida e tenha autorizada a sua comercialização, a eficácia mínima deve ser de 95%, com os seguintes critérios para aprovação:

1) para testes de estábulos a eficácia média dos 23 dias pós-tratamento deverá ser no mínimo de 95%;

2) nos testes de campo a eficácia média nos dias (+ 7) e (+14), pós-tratamento, deverá ser no mínimo de 95%.

Um produto químico carrapaticida pode atuar por ação ixodicida direta, diminuindo, assim, a população de carrapatos, na inibição da produção de ovos e/ou no impedimento da eclosão larval. A maneira pela qual determinada substância acaricida atua sobre o carrapato indica a sua eficiência (MERLINI *et al.*, 1998).

O uso de acaricidas pode levar a intoxicações dos animais e ao impacto ambiental, pelo efeito residual na natureza. Também há um risco vigente relacionado à presença de resíduos de carrapaticidas nos alimentos. Muitos produtores não respeitam os prazos da carência e a proibição da utilização de determinados produtos em animais lactantes. Somado a isto, sabe-se que os produtores rurais não utilizam equipamentos de proteção individual, levando a riscos de toxicidade aguda e crônica durante a aplicação do produto no animal (CHAGAS *et al.*, 2002; Furlong *et al.*, 2007).

Os carrapaticidas podem ser divididos em “de contato” e sistêmicos. Outra classificação está relacionada ao grupo químico (Tabelas 1 e 2).

#### 2.1.2.1 Carrapaticidas de contato

Os produtos carrapaticidas tradicionais atuam por contato, intoxicando os carrapatos. Sua aplicação é realizada individualmente. São aplicados por meio de pulverização, imersão ou *pour on* (Tabela 1).

Para a pulverização, são diversos os equipamentos utilizados na aplicação de carrapaticida, tais como pulverizador costal, bomba de pistão manual, vários tipos de adaptação de bombas d'água elétricas e câmara atomizadora, em que os animais passam pelo túnel para serem molhados (AMARAL, 2008).

Tabela 1 - Principais grupos químicos carrapaticidas de contato, empregados nas formas de aplicação: pulverização, imersão e *pour on*

Grupos químicos	Substâncias	Características principais
Organofosforados	diclorvós clorpirivós	Grupo mais antigo Age no receptor acetilcolinesterase Baixo poder residual Comercializado em associação com piretróides
Amidínicos	amitraz	Sucedeu aos fosforados Alto poder residual
Piretróides	deltametrina cipermetrina alfametrina	Alto poder residual, que favoreceu ocorrência da resistência Comercializados associados aos organofosforados
Fenilpirazóis	fipronil	Atua sobre o sistema nervoso dos animais. Aplicado na forma de <i>pour on</i> . Não pode ser utilizado em animais em lactação.

Fonte: adaptada de Larini,1999; Brito *et al.*, 2010; Taylor, 2001, Furlong *et al.*,2007

### 2.1.2.2 Carrapaticidas sistêmicos

Os carrapaticidas sistêmicos (Tabela 2) são aplicados por meio de injeções subcutânea ou intramuscular e derrame dorsal no lombo do bovino.

Os princípios ativos chegam na circulação sanguínea, intoxicando os carrapatos. Não podem ser utilizados em animais no período de lactação.

Tabela 2 - Principais grupos químicos de carrapaticidas sistêmicos, empregados nas formas de aplicação: injeções subcutânea ou intramuscular e derrame dorsal no lombo do bovino

Grupos químicos	Substâncias	Características principais
Lactonas macrocíclicas	ivermectina moxidectina	Surgiram na década de 80. Endectocidas

(avermectinas)	doramectina abamectina eprinomectina moxidectina	Agem na neurotransmissão, nos canais de Cl- Receptor GABA Poder residual maior que os piretróides. Não pode ser utilizados em animais em lactação ou 30 dias antes do abate Aplicação: injetável ou <i>pour on</i>
Benzofenilureas	fluazuron diflubenzuron	Interfere na produção de quitina, substancia responsável pelo endurecimento da cutícula do carrapato. Não podem ser utilizados em animais em lactação ou 30 dias antes do abate

Fonte: adaptada de Larini,1999; Brito *et al.*, 2010; Taylor, 2001, Furlong *et al.*,2007

### 2.1.2.3 Vacinas

A vacinação é considerada alternativa de controle do carrapato dos bovinos. Estas são desenvolvidas a partir de uma proteína, conferindo proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações devido à redução do numero de carrapatos, da produção dos ovos e da fertilidade (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

### 2.1.3 Resistência aos carrapaticidas

Resistência é a habilidade que um organismo possui de sobreviver a doses letais para um organismo susceptível. Antes da administração de um novo acaricida, os alelos que conferem resistência são raros. Entretanto, quando um novo produto é utilizado, indivíduos resistentes apresentam a vantagem seletiva e sobrevivem ao tratamento, reproduzem e dão origem a populações de carrapatos também resistentes (POHL, 2012).

A pratica de utilização dos produtos químicos convencionais nem sempre é efetiva e sustentável (ALVES *et al.* 2012). O uso de acaricidas favorece a seleção de linhagens resistentes, diminuindo o período de proteção dos produtos e aumentando o custo do tratamento. Os produtores fazem uso indiscriminado desses pesticidas, especialmente da classe dos piretróides, causando, na maioria das vezes, redução de sua eficácia e gerando grandes possibilidades de desenvolvimento de resistência ao composto usado ( ANDREOTTI *et al.*, 2002).

Fatores tais como: falta de critério para a aquisição de carrapaticida, utilização de doses abaixo das preconizadas do produto, desconhecimento de eficácia terapêutica e da ação dos carrapaticidas, além da ausência de estratégia no combate do carrapato, por falta de conhecimento do ciclo biológico, levam ao aparecimento da resistência (MERLINI *et al.*, 1998)

O primeiro relato de resistência foi ao arsênico, em 1937, nas populações de carrapatos da Austrália e África do Sul (FURLONG e SALES, 2007). Segundo Merline *et al.* (1998), a partir da década de 70, vários trabalhos relataram focos de resistência aos produtos organofosforados no Rio Grande do Sul, sendo abolida a utilização deste grupo químico, neste estado, devido ao alto grau de resistência apresentado e, também, devido ao surgimento de novos carrapaticidas.

A troca indiscriminada de grupo químico carrapaticida, com rotação de produtos sem critério permite aos carrapatos o contato com os grupos químicos disponíveis, favorecendo o aparecimento de seleção de carrapatos resistentes (BRITTO *et al.*, 2010).

O grande motivador para o desenvolvimento de novos acaricidas foi a ocorrência da resistência, porém não se pode esperar que seja descoberto um novo princípio ativo a cada ocorrência de resistência, pois os custos para o desenvolvimento de novos produtos são elevados, além de pressões dos órgãos ambientais de baixos níveis de resíduos a alimentos e reduzida toxicidade ambiental (GRAF *et al.*, 2004)

O monitoramento das populações de carrapatos, em relação aos carrapaticidas por meio de testes *in vitro*, é um procedimento essencial na detecção precoce de problemas de resistência, tendo em vista que o uso de acaricidas ainda se constitui no principal instrumento de controle do carrapato bovino (SOUZA *et al.*, 2008).

## 2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA AOS PRODUTOS CARRAPATICIDAS

As plantas têm sido utilizadas devido as suas ações medicinais a milhões de anos. Inicialmente eram utilizadas na forma de tinturas, chás, emplastos entre outras formas farmacêuticas. O conhecimento relativo às mesmas foi repassado através de gerações. Na historia mais recente, a utilização de plantas envolve o isolamento de

substâncias com ação farmacológica específica, tais como a cocaína e a codeína (BALUNASA *et al.*, 2005).

As plantas medicinais se destacam como alternativa aos produtos químicos convencionais, fator condicionante à produção sustentável e tornaram-se base para pesquisas científicas no controle de doenças e parasitos. Tal fato deve-se a grande variedade de espécies vegetais existentes no Brasil, em torno de 55.000, sendo o Brasil considerado o país de maior biodiversidade do planeta (ALVES *et al.*, 2012; CHUNGSAMARNYART *et al.*, 1991).

Segundo Agnolin *et al.* (2009), as plantas são alternativas aos carrapaticidas comerciais devido a grande variabilidade de espécies existentes, baixo custo, fácil disponibilidade, rápida degradação, ausência de contaminação do ambiente e, conseqüentemente, dos animais e do homem.

A utilização de produtos naturais minimiza o desequilíbrio ecológico e a contaminação ambiental causada pelo uso intensivo de produtos químicos sintéticos, porém pesquisas nesta área da veterinária utilizando plantas medicinais, apesar de crescente, ainda é incipiente (ALVES *et al.*, 2012; AGNOLIN *et al.*, 2009).

Segundo Chagas *et al.* (2011), extrato de plantas contem substâncias que podem agir sinergicamente, dificultando a seleção de carrapatos resistentes.

Algumas plantas têm sido utilizadas em pesquisas de controle de carrapatos, como opção de redução da utilização de produtos acaricidas sintéticos, tais como o Nim (*Azadirachta indica*), o Capim-gordura (*Melinis multiflora* Beauv.), o Capim-colônião (*Panicum maximum*), o Timbó (*Ateleia glazioviana* Baill), Limão-bravo (*Zanthoxylum tingoassuiba*), Citronela-de-Java (*Cymbopogon winterianus*), Alecrim-da-horta (*Rosmarinus officinalis*) e Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (AGNOLIN, 2009; MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2014).

O controle de carrapatos com fitoterápicos eficazes poderá trazer grandes vantagens para o produtor, porém, se o extrato utilizado não for comprovadamente eficaz, existe o risco de infestação massiva no rebanho, com conseqüências severas, como queda na produção, além de perda de animais (CASTRO *et al.* 2010)

### **2.2.1 Óleos essenciais**

A *International Standard Organization* (ISO) define os óleos essenciais como os produtos obtidos de partes da planta mediante destilação por arraste com vapor

d'água. Essas substâncias com ações repelentes ou atraentes, são principalmente de natureza terpênica e se apresentam como moléculas de baixo peso molecular, sendo voláteis. Tais substâncias são conhecidas como aromáticas ou denominadas óleos essenciais, os quais são metabolizados em todos os órgãos vegetais: botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutas, raízes, cascas, madeira e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são distribuídos em um número limitado de famílias como Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae e Piperáceas (NOGUEIRA *et al.*, 2014; TUREK e STINTZING, 2013).

Os óleos se apresentam como líquidos voláteis, lípidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com uma densidade, em geral, menor do que a da água. Podem conter cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações, caracterizando-se por dois ou três componentes principais em concentrações relativamente elevadas (20-70%) em comparação com os outros componentes presentes em menores concentrações. Geralmente os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008).

A composição química varia com o clima, estação do ano, condições geográficas, período de colheita e técnica de destilação (KNAAK e FIUZA, 2010).

As propriedades medicinais são várias: adstringentes, analgésicas, antidepressivas, antipiréticas, antivirais, bactericidas, bacteriostáticas, béquicas, desodorantes, estimulantes, fungicidas, fungistáticos, imunestimulantes e inseticidas (TUREK e STINTZING, 2013).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nos artrópodes ainda é desconhecido, mas sugere-se que por meio do contato, podem interagir com o tegumento do inseto agindo em enzimas digestivas e neurológicas, ocorrendo o rápido aparecimento de sinais tóxicos (KNAAK e FIUZA, 2010).

#### 2.2.1.1. Biossíntese dos óleos essenciais

Os produtos naturais, através de reações químicas ocorridas no metabolismo primário, sintetizam substâncias essenciais a vida: carboidratos,



lipídeos, aminoácidos e proteínas, ácidos nucleicos. O metabolismo secundário é característico de cada espécie vegetal e está relacionado à produção de substâncias que proporcionem defesa, garantindo a sobrevivência das espécies no ecossistema. Geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, atividades biológicas e são encontrados em quantidades relativamente baixas, sendo específicos de determinadas espécies de plantas (STEFFENS, 2010)

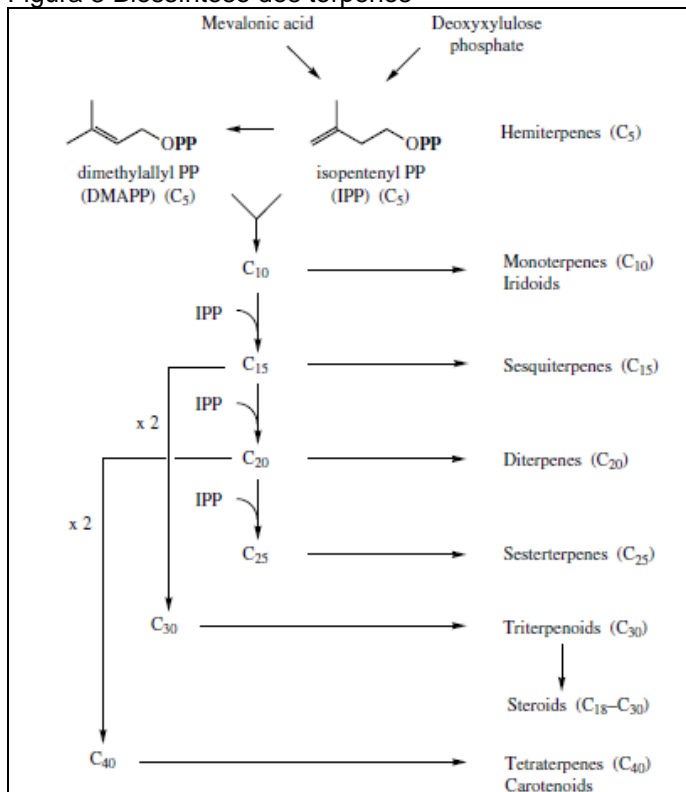
Os óleos essenciais, originários do metabolismo secundário, são terpenos, originários da via do acetato-malonato, e ainda, substâncias aromáticas de baixo peso molecular, originários da via do chiquimato (NERIO *et al.* , 2010).

#### 2.2.1.2. Terpenos

Segundo Dewick (2002), os terpenos são formados por unidades de isopreno, com 5 carbonos. Os monoterpenos são compostos por duas unidades de isopreno (10 carbonos), os sesquiterpenos por 3 unidades de isopreno (15 carbonos), os diterpenos são formados por 4 unidades de isopreno (20 carbonos), os triterpenos por 5 unidades de isopreno (30 carbonos). Os monoterpenos são as substâncias mais abundantes dos óleos essenciais, em torno de 90% (Figura 3).

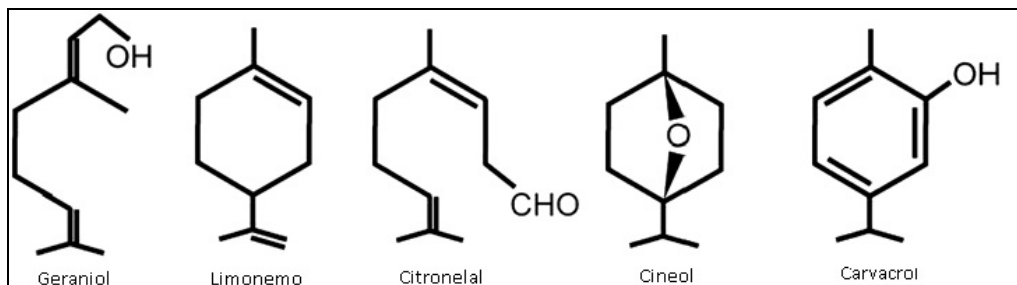
Alguns exemplos de terpenos são: geraniol, limoneno, citronelal, cineol e carvacrol (Figura 4).

Figura 3 Biossíntese dos terpenos



Fonte: Dewick (2002)

Figura 4 Exemplo de terpenos



Fonte: Saad *et al.* (2013)

### 2.1.2.3 Substâncias aromáticas de baixo peso molecular

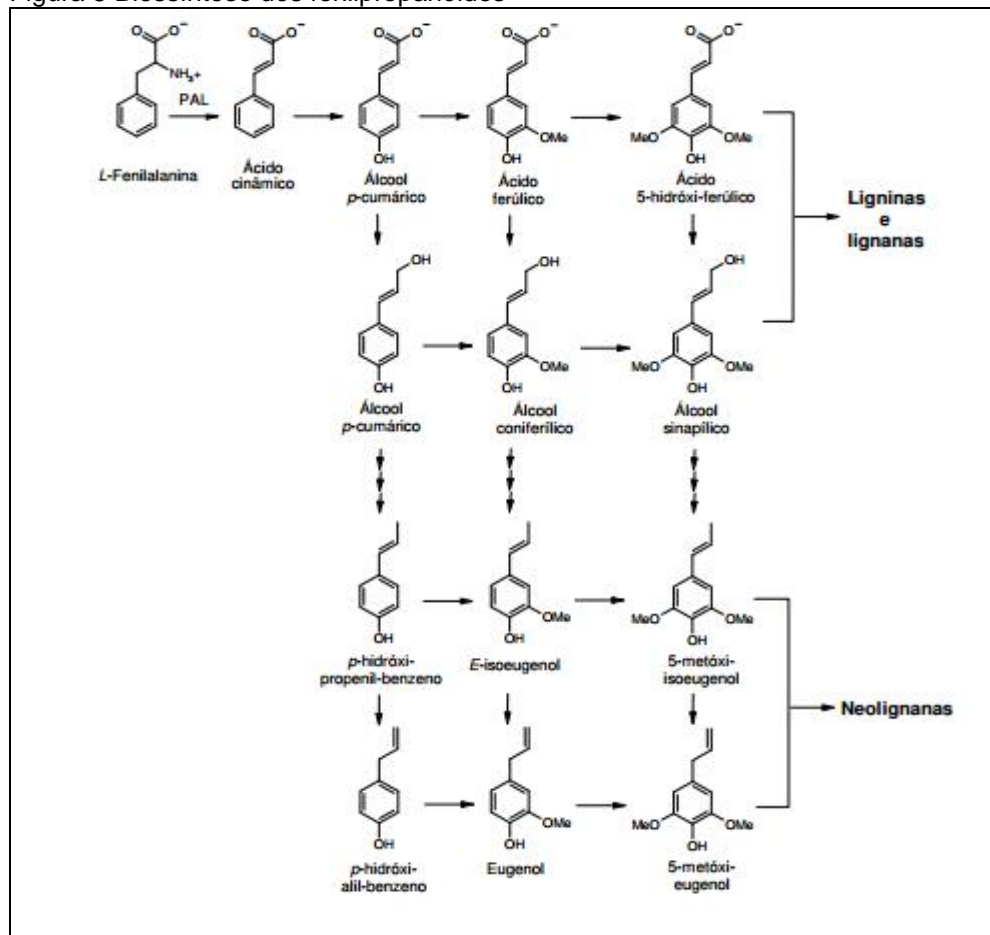
De acordo com Andrade (2010), os fenilpropanóides são menos abundantes nos óleos essenciais do que os terpenoides e possuem em suas estruturas um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos, que apresentam uma dupla ligação e podem ter um grupo funcional com oxigênio. São compostos aromáticos que derivam da rota que se inicia com a formação do ácido chiquímico.

O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose -4-fosfato que, por sua vez, formam a

fenilalanina e a tirosina, resultando na formação dos ácidos cinâmico e p-cumárico, que apresentam em sua estrutura uma cadeia lateral que contém três átomos de carbono ligados ao anel aromático. Por meio de várias reações de redução, oxidação e ciclização, os ácidos cinâmico e p-cumárico levam à formação de fenilpropanóides (Figura 5) (DEWICK, 2002).

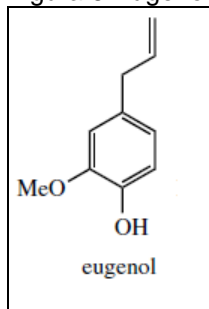
Apesar de aproximadamente 90% da composição dos óleos essenciais serem compostos de terpenos, no óleo essencial do cravo-da-índia o eugenol (Figura 6), um fenilpropanóide, é o composto mais abundante, com teores maiores de 70% (ANDRADE, 2010).

Figura 5 Biossíntese dos fenilpropanóides



Fonte: Dewick (2002)

Figura 6 Eugenol



Fonte: Saad *et al.* (2013)

### 2.3 CYMBOPOGON WINTERIANUS JOWITT EX BOR – CITRONELA-DE-JAVA

A planta medicinal *Cymbopogon winterianus* (Figura 7), também conhecida como Citronela-de-Java ou Capim-citronela pertence a família Poaceae, originária do Sudeste da Ásia, especificamente da Ilha de Java. Possui folhas verdes longas, simples, lineares, alternas e com lígula entre o limbo e a bainha. É uma planta herbácea tropical, de ciclo perene, que pode atingir até 1,5 metros de altura. A Índia é um dos importantes produtores do óleo essencial de citronela, sendo a planta popularmente conhecida por suas propriedades repelentes (DEKAA *et al.*, 2011; GALVÃO, 2004).

O genero *Cymbopogon* tem aproximadamente 140 espécies e 52 ocorrem na África, 45 na Índia, 6 na Austrália e América do Sul, 4 na Europa, 2 na América do Norte e o restante se distribuem pela África. O óleo da citronela pode ser obtido da *Cymbopogon nardus*, denominada Citronela do Ceilão, e da planta *Cymbopogon winterianus*, denominado Citronela de Java. Os óleos diferem na composição e nos teores dos seus componentes (WANY *et al.*, 2013)

Figura 7 Citronela-de-Java



Fonte: o autor (2014)

O óleo extraído de suas partes aéreas é utilizado na indústria farmacêutica, na produção de cosméticos e principalmente na perfumaria. É comumente empregado na produção de desodorantes, perfumes, repelentes para mosquitos e ainda realçando o sabor e aroma de bebidas. Apresenta como principais propriedades sensoriais qualitativas o frescor, a intensidade cítrica, e o aroma levemente frutal semelhante ao óleo de capim-limão (GALVÃO, 2004).

O óleo essencial é composto por monoterpenos e sesquiterpenos. A principal forma de obtenção do óleo essencial é por hidrodestilação. O rendimento com base na matéria-prima *in natura* é de aproximadamente 0,5 – 1,0%.

Por identificação através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) foram relatados aproximadamente 30 componentes, sendo os componentes majoritários o citronelal, o citronelol e o geraniol (BENETI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2008).

O óleo essencial de citronela possui propriedades anticonvulsivantes, larvicidas, antibacterianas, antifúngicas e estudos demonstraram, ainda, a ação carrapaticida (AGNOLIN *et al.*, 2010; OLIVO *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011).

Um dos componentes presentes no óleo de citronela, o citronelal, obtido por síntese, tem sido utilizado em associação a um piretróide, a cipermetrina e a um organofosforado, o clorpirifós em formulações carrapaticidas comerciais.

#### 2.4 ROSMARINUS OFFICINALIS L. – ALECRIM-DA-HORTA

O Alecrim-da-horta, *Rosmarinus officinalis* (Figura 8), é uma planta da família Lamiaceae. Nativa da região mediterrânea, pode ser encontrada no Iran, norte da Africa e no sul da Europa. Possui porte subarbusivo lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. As folhas, muito aromáticas, medem de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. As partes utilizadas das plantas são as folhas e as sumidades floridas, de onde é obtido o óleo essencial (CLEFF *et al.*, 2012; HENTZ *et al.*, 2007)

É utilizada como medicamento para ansiedade, inchaço, enxaqueca, hipertensão e anorexia, além de uso tópico analgésico, dores musculares e doenças reumáticas. Devido às propriedades farmacológicas, é utilizado na terapêutica de Parkinson e Alzheimer, além de possuir comprovadas propriedades antidiabética, antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatória e carrapaticida (JALALI-HERAV, 2011; MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2012).

Seu óleo essencial é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos: linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila,  $\alpha$ -pinemo,  $\beta$ -pinemo, canfeno, limonemo, além dos componentes majoritários 1,8-cineol, borneol e canfora. A principal forma de obtenção do óleo essencial também é por hidrodestilação. O rendimento com base na matéria-prima *in natura* é de aproximadamente 0,5 – 1,0%.

A composição química pode apresentar variação devido a fatores ambientais e de manejo das plantas bem como da forma de extração e armazenamento (BARNES *et al.*, 2012; ; JIANGA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Figura 8 Alecrim-da-horta



Fonte: o autor (2014)

## 2.5 *SYZYGIUM AROMATICUM* MERRIL ET PERRY– CRAVO-DA-ÍNDIA

A planta *Syzygium aromaticum* (Figura 9) pertence à família Myrtaceae. É uma árvore de grande porte, podendo atingir de 12 a 15 m de altura e o seu ciclo vegetativo alcança mais de cem anos. O cravo-da-índia é a gema floral seca da planta. Originária da Indonésia, foi disseminada pelos alemães para outros países. Zanzibar e Madagascar são os principais produtores de Cravo-da-índia, seguidos pela Indonésia. No Brasil, praticamente apenas a Bahia, na região do Baixo Sul produz esta especiaria na forma comercial (AFFONSO *et al.*, 2012; MAZZAFERA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

É uma das especiarias mais cultivadas no mundo juntamente com a pimenta-do-reino e o gengibre (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O óleo essencial de seus botões florais pode ser extraído por hidrodestilação. Possui como componente majoritário o eugenol, um fenilpropanóide volátil de amplo uso nas indústrias farmacêuticas e contém ainda em sua composição, acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno (AFFONSO *et al.*, 2012; BARNES *et al.*, 2012).

Figura 9 Cravo-da-Índia



Fonte: o autor (2014)

O eugenol (Figura 5), principal constituinte químico do óleo essencial de cravo-da-índia, apresenta comprovadas atividades como antibacteriano, antimicótico, antimicrobiano, antiinflamatório, anestésico, anti-séptico, antioxidante, repelente e carrapaticida (BARNES *et al.*, 2012; ZERINGÓTA *et al.*, 2013).

## 2.6 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES

Desde o século XIX com o crescimento da indústria do gado, os carrapatos tornaram-se um problema econômico e conseqüentemente, medidas de controle começaram a ser desenvolvidas. O comércio de carrapaticidas iniciou-se como um mercado atraente gerando esforços de pesquisa e desenvolvimento em empresas de saúde animal. Atualmente, a resistência crescente dos carrapatos aos produtos tem sido o grande desafio e o maior motivador para a pesquisa de novos ativos (GRAF *et al.* 2004).

De acordo com dados disponibilizados pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), em 2013, o faturamento anual com produtos veterinários foi de R\$ 3.956.000.000,00, 7,49% maior que em 2012. Os antiparasitários contribuíram com 25%, R\$989.000.000,00.

De acordo com o MAPA, os produtos de uso veterinário são toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou



equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais.

Um novo ativo, pleiteado como acaricida, necessariamente deve ter, inicialmente, níveis aceitáveis de toxicidade aos seres humanos, aos animais e ao ambiente. Em seguida, caso o novo ativo tenha comprovada segurança é iniciado estudos de eficácia e do desenvolvimento de formulação (GRAF *et al.*, 2004).

Para ser liberado para fabricação, comercialização e uso o produto deve ser registrado no MAPA.

Na Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários a solicitação de registro do produto é analisada para verificar se o mesmo cumpre com os requisitos técnicos exigidos para sua aprovação. O produto veterinário deve ser seguro para o animal, para o aplicador e para as pessoas que consomem a carne, o leite, os ovos, o pescado e o mel provenientes dos animais tratados, sempre preservando o meio ambiente (COSTA *et al.*, 2012).

A instrução normativa n.15, de 9 de maio de 2005 determina os critérios para a realização de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos veterinários, a fim de prever, determinar e monitorar o prazo de validade dos produtos.

### **2.6.1 Desenvolvimento farmacotécnico**

A Farmacotécnica é a parte da ciência que trata da preparação de produtos farmacêuticos. Estuda o preparo, a purificação, as incompatibilidades físicas e químicas e a escolha da forma farmacêutica mais adequada a finalidade pretendida (FERREIRA, 2011).

Cada produto farmacêutico é uma formulação única. Além de princípios ativos, uma formulação também contém diversos componentes não terapêuticos, os adjuvantes farmacotécnicos, que caracterizam a aparência física e a composição química. Para a garantia da estabilidade da formulação e eficácia do produto, em sua vida útil, durante a comercialização, esta deve ser preservada contra a contaminação microbiológica, degradação química e oxidação (THOMPSON, 2009).

Para facilitar a administração de um fármaco pelas vias sistêmica, tópica ou endovenosa são preparadas e formuladas formas farmacêuticas tais como: comprimidos, cápsulas, injetáveis, supositórios, óvulos, velas, suspensões,

soluções, pomadas, emulsões, géis entre outras. Cada uma destas formas destina-se a conter quantidade específica do princípio ativo. A escolha de cada forma farmacêutica será determinada pelo objetivo final da formulação. O produto deverá ter características atraentes de cor, odor, textura, embalagem adequada, rótulo claro e bula clara e completa, além de ter o ativo liberado na quantidade apropriada, com o início de ação esperado e duração do efeito do tratamento adequado (ANSEL *et al.*, 2002).

### **2.6.2 Composição de formulações**

De acordo com Ferreira (2011), as fórmulas farmacêuticas são compostas por:

- Princípios ativos: responsáveis pela ação farmacológica
- Coadjuvantes técnicos ou adjuvantes farmacotécnicos: substâncias, em geral inertes, cuja função é estabilizar a fórmula em nível químico, físico ou microbiológico.
- veículo ou excipiente: parte da formula onde são incorporados os princípios ativos.

Os adjuvantes farmacotécnicos se classificam em:

- Agentes acidificantes: acidificam o meio com objetivo de fornecer estabilidade ao produto. Exemplos: ácido cítrico, ácido acético.
- Agentes alcalinizantes: alcalizam o meio com o objetivo também de fornecer estabilidade ao produto. Exemplos: hidróxido de sódio, trietanolamina entre outros.
- Conservantes: São utilizados em preparações líquidas e semi-sólidas para prevenir o crescimento fúngico e microbiano. Como exemplo, temos os parabenos, cloreto de benzalcônio, álcool benzílico.
- Antioxidantes: Substâncias que inibem a oxidação, prevenindo a deterioração da preparação por processos oxidativos, tais como ácido ascórbico, BHA, BHT, metabissulfito de sódio.
- Tensoativos: Também denominados emulsificantes, detergentes ou agentes molhantes. Promovem e mantem a dispersão finamente dividida em

partículas de um líquido em um veículo no qual ele é imiscível, por reduzirem a tensão superficial entre estes dois líquidos. O produto final é denominado emulsão.

- Umectantes: Previnem o ressecamento de preparações devido à propriedade de retenção de água. Como exemplo: glicerina, propilenoglicol e sorbitol.

- Agente de viscosidade: Utilizados para aumentar a consistência de preparações, fornecendo maior resistência ao escoamento. Possibilitam ainda o aumento do tempo de ação do principio ativo no local de ação. Exemplos: acido algínico, bentonita, carbômero, hidroxipropilcelulose, goma adraganta.

### 2.6.3 Emulsão

De acordo com Prista *et al.* (1995), emulsão é uma forma farmacêutica caracterizada por conter dois líquidos imiscíveis, em geral água e o óleo, no qual um deles está disperso no outro em forma de gotículas líquidas. Apresentam uma fase dispersa (interna ou descontínua) e uma fase dispersante (externa ou contínua) estabilizada por uma fase interfacial (emulsionante ou tensoativo).

Quando a fase interna é a água e a externa é o óleo, a emulsão é denominada A/O. O oposto, quando a fase interna é o óleo e a externa é a água, a emulsão é denominada O/A.

Em geral a composição de uma emulsão se distribui da seguinte forma.

- Fase aquosa: umectante, espessante, quelante, conservante de fase aquosa.

- Fase oleosa: emolientes, espessantes de fase oleosa, antioxidante e conservante de fase oleosa.

De acordo com Thompson (2009), a estabilidade das emulsões pode ser observada macroscopicamente pela ocorrência ou não de separação de fases e aspecto heterogêneo. Microscopicamente através da avaliação do número e tamanho de glóbulos por unidade de volume ou peso de fase contínua.

Podem ocorrer os seguintes fenômenos de instabilidade:

- Cremeação/ sedimentação: Partículas menos densas tendem a subir ao topo. A emulsão restante tem duas porções. Representa um problema menos sério, pois nenhuma das partículas se juntam. Pode ser revertido pela agitação.

- Flocculação: Partículas da fase interna formam associação reversível e fraca. Isto é tipicamente causado pela carga superficialmente inadequada nas micelas, que reduz a força repulsiva entre elas. Pode ser revertido por agitação.

- Coalescência: Quando duas gotículas da fase interna se aproximam o suficiente, podem combinar para formar uma gotícula maior. Este processo representa um problema de estabilidade mais sério porque é irreversível. Se suficientes partículas coalescem, o resultado é uma separação completa das duas fases que não pode ser revertido por agitação.

- Inversão das fases oleosa e aquosa: Quando uma inversão de fases ocorre, a fase externa se torna a fase interna e vice-versa.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar *in vitro* o efeito carrapaticida de formulações contendo os óleos essenciais das plantas *Cymbopogon winterianus*, *Syzygium aromaticum* e *Rosmarinus officinalis*

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair os óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus*, *Rosmarinus officinalis* e *Syzygium aromaticum*

Avaliar a composição química dos óleos essenciais obtidos

Desenvolver formulação contendo os óleos essenciais

Avaliar a ação carrapaticida *in vitro* da formulação contendo os óleos essenciais de citronela, cravo-da-índia e alecrim

Analisar a estabilidade macroscópica das formulações, através das características organolépticas e leitura do pH

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DOS TRABALHOS

As extrações dos óleos essenciais e o preparo das formulações foram realizados no laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

A análise dos óleos em CG/EM foi realizada no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A avaliação carrapaticida *in vitro* foi realizada no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG.

### 4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As folhas de *Cymbopogon winterianus* foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizado no município de Juiz de Fora - Minas Gerais. Todas as coletas foram realizadas pela manhã, no período de outubro de 2012 a março de 2014. A exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger - CESJ (UFJF) sob o nº 55790.

As folhas de *Rosmarinus officinalis* foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizado no município de Juiz de Fora - Minas Gerais. Todas as coletas foram realizadas pela manhã, no período de junho de 2013 a abril de 2014. A exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger - CESJ (UFJF) sob o nº 482530.

Os botões florais secos de *Zygyzium aromaticum* foram adquiridas no comércio da cidade de Juiz de Fora - Minas Gerais, no período de janeiro de 2013 a março de 2014.

### 4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas por hidrodestilação, utilizando-se aparelho de Clevenger modificado. As amostras foram colocadas em

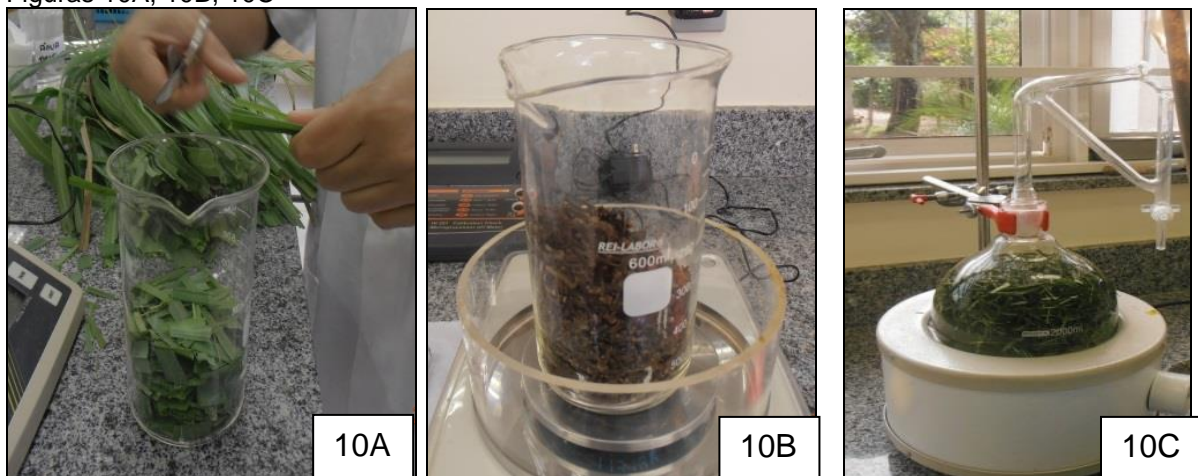
balão de fundo redondo com capacidade de 2000,0 mL com 1300,0 mL de água destilada. O tempo médio de extração foi de aproximadamente 3,0 horas.

Para a extração do óleo essencial de citronela foram utilizadas, em média, 136,45g de folhas frescas cortadas (Figura 10A) para cada extração. Para a extração do óleo essencial de alecrim (Figura 10C), foram utilizadas, em média, 132,77 g de folhas frescas.

Para a obtenção do óleo essencial do cravo-da-índia, foram utilizadas aproximadamente 129,90 g dos botões florais secos (Figura 10B). Inicialmente foi obtido o óleo emulsionado (misturado com a água), este foi deixado em congelador e após um período de 2 dias, o óleo foi separado da água com o auxílio de um funil de separação.

Todos os óleos essenciais extraídos foram acondicionados em embalagens de vidro, lacrados e mantidas em temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Figuras 10A, 10B, 10C



10A - Citronela sendo cortada; 10B – Pesagem do Cravo-da-índia; 10C – Hidrodestilação do Alecrim  
Fonte: o autor (2014)

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As análises qualitativas dos óleos foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ-BR). As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso modelo QP 2010 ultra (SHIMADZU) acoplado a espectrômetro de massas quadrupolar EM Chromopack Workstation Saturno CP3800 (SHIMADZU) a 70 eV e a coluna capilar

empregada apresentava como fase estacionária 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano (Rtx-5MS\_ Restek, EUA) e como fase móvel foi utilizado gás hélio.

A faixa de massas foi de  $m/z$  41-300. Para a obtenção dos espectros de massas foi utilizada varredura linear e monitoramento seletivo de íons para determinação das amostras.

Uma avaliação qualitativa dos picos obtidos foi realizada por meio da comparação entre similaridade dos espectros de massa dos picos obtidos em relação ao banco de dados da biblioteca de espectros (NIST11) do equipamento; considerou-se satisfatória uma similaridade maior ou igual a 90%.

Os parâmetros de análise cromatográfica para cada óleo utilizado foram os indicados a seguir:

- Óleo essencial de citronela

Para a preparação da amostra, foi realizada uma diluição de 1:100 utilizando o acetato de etila como solvente. A injeção foi realizada utilizando um volume de 1  $\mu$ L com divisão de fluxo de 1:20.

Para cada análise cromatográfica foi utilizada a seguinte condição de injeção: temperatura inicial da coluna 40 °C até 220 °C com taxa de aquecimento de 3°C/minuto. As temperaturas de injetor e interface foram mantidas em 200°C e 280°C respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com fluxo de 1 mL/min (CASSEL *et al.*, 2006).

- Óleo essencial de cravo-da-índia:

Para a preparação da amostra, foi realizada uma diluição de 1:100 utilizando o acetato de etila como solvente. A injeção foi realizada utilizando um volume de 1  $\mu$ L com divisão de fluxo de 1:10.

Para cada análise cromatográfica foi utilizada a seguinte condição de injeção: temperatura inicial da coluna 100 °C até 220 com taxa de aquecimento de 3°C/minuto. As temperaturas de injetor e interface foram mantidas em 250°C e 280°C respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com fluxo de 1 mL/min (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

- Óleo essencial de alecrim:



Para a preparação da amostra, foi realizada uma diluição de 1:100 utilizando o acetato de etila como solvente. A injeção foi realizada utilizando um volume de 1  $\mu\text{L}$  com divisão de fluxo de 1:10.

Para cada análise cromatográfica foi utilizada a seguinte condição de injeção: temperatura inicial da coluna 40 °C até 180 °C com taxa de aquecimento de 4°C/minuto e 180°C até 280 °C com taxa de aquecimento de 20°C/minuto e mantido isotermia por 7,0 minutos. As temperaturas de injetor e interface foram mantidas em 250°C e 280°C respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com fluxo de 1 mL/min (RIBEIRO *et al.*, 2012).

#### 4.5 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

A formulação base desenvolvida para a incorporação dos óleos essenciais em estudo, constituiu-se de um polímero não iônico, derivado da celulose, conservante parabeno, agentes umectante e de penetração, tensoativo e co-tensoativo e água destilada como veículo. Os óleos foram incorporados na formulação base nas concentrações de 0,5 – 15,0% (Tabelas 3 e 4) (Figuras 11 A, 11B, 11C, 11D).

O desenvolvimento iniciou-se com a preparação de uma solução gel contendo o agente gelificante, o conservante e a água como veículo.

Foi realizada a pesagem dos sólidos: agente gelificante e o conservante. Uma parte da água foi aquecida. Em seguida os sólidos foram incorporados sob agitação na água quente. O restante da água foi adicionado e o produto foi homogeneizado, obtendo-se uma solução de gel fluida e transparente.

Tabela 3 - Formulações contendo os óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus*, *Syzygium aromaticum* e *Rosmarinus officinalis* nas diversas concentrações(%), formuladas para a avaliação carrapaticida sobre as populações de carrapatos provenientes da Embrapa Gado de Leite – MG, Votuporanga – SP e Perdizes – MG

Planta	Concentrações (%)																	
	0,5			1,25			2,50			5,0			10,0			15,0		
	Embrapa	Votup	Perd	Embrapa	Votup	Perd	Embrapa	Votup	Perd	Embrapa	Votup	Perd	Embrapa	Votup	Perd	Embrapa	Votup	Perd
<i>Cymbopogon winterianus</i>	X			X			X			X	X		X	X			X	
<i>Syzygium aromaticum</i>			X					X	X		X	X		X	X		X	X
<i>Rosmarinus officinalis</i>			X					X				X			X			X

Fonte: o autor (2014)

Embrapa – População de carrapatos provenientes da Embrapa Gado de Leite, Votup - População de carrapatos provenientes de Votuporanga – SP, Perd - População de carrapatos provenientes de Perdizes – MG

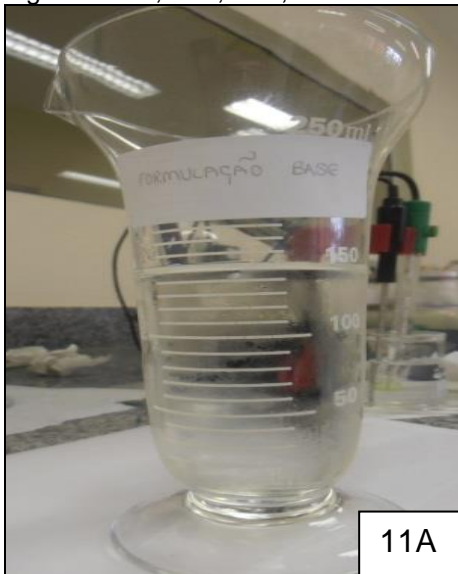
Tabela 4 - Formulações com as associações dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* e *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon winterianus* e *Rosmarinus officinalis* nas diversas concentrações (%) , formuladas para a avaliação carrapaticida sobre as populações de carrapatos provenientes de Votuporanga – SP e Perdizes - MG

Planta	Concentrações (%)											
	0,5 + 5,0		1,25 + 5,0		2,50 + 5,0		5,0 + 5,0		10,0 + 5,0		15,0 + 5,0	
	Votup	Perd	Votup	Perd	Votup	Perd	Votup	Perd	Votup	Perd	Votup	Perd
Associação de <i>Cymbopogon winterianus</i> e <i>Syzygium aromaticum</i>					X		X		X		X	
Associação de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Cymbopogon winterianus</i>		X				X		X		X		

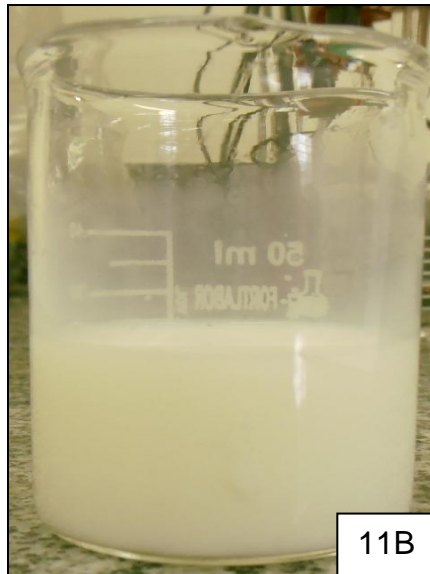
Fonte: o autor (2014)

Votup - População de carrapatos provenientes de Votuporanga – SP, Perd - População de carrapatos provenientes de Perdizes – MG

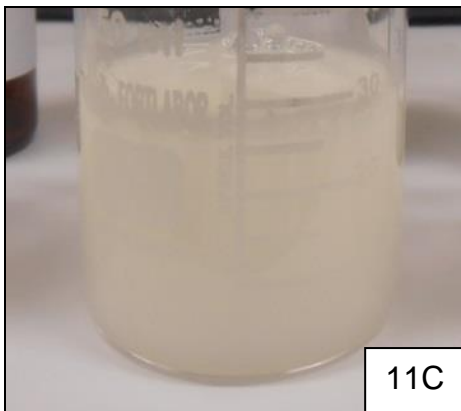
Figuras 11 A, 11B, 11C, 11D



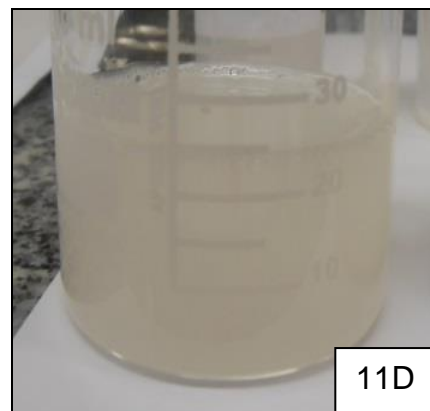
11A



11B



11C



11D

11A – Formulação base; 11B – Formulação contendo óleo essencial de alecrim a 10%; 11C - Formulação contendo óleo essencial de citronela a 10%; 11D - Formulação contendo óleo essencial de cravo-da-índia a 0,5%  
 Fonte: o autor (2014)

Em seguida foram pesados: tensoativo, co-tensoativo, agente de penetração e umectante. Estes foram incorporados a solução gel base e homogeneizados.

Esta fórmula base serviu de veículo para a incorporação dos óleos essenciais que variaram nas concentrações de 0,5% - 15,0% (Tabelas 3 e 4) que foram previamente tratados com o tensoativo para favorecer a incorporação na base hidrofílica.

A adição de óleo em água requer a presença de tensoativos e co-tensoativos favorecendo a miscibilidade de componentes incompatíveis, aumentando a estabilidade e evitando a separação das fases oleosa e aquosa (RODRIGUES-ROJO *et al.*, 2012).

A adição desse polímero na composição da formulação teve como principal objetivo o aumento da viscosidade e a formação de uma película sobre o tegumento do carrapato, visando assim um aumento dos tempos de retenção e de ação dos óleos essenciais.

As formulações testes foram observadas sob o ponto de vista organoléptico (aspecto, cor, odor, sensação ao tato) e pH, após 180 dias de conservação em temperaturas ambiente e sob refrigeração (BRASIL, 2004).

#### 4.6 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O delineamento do estudo foi inteiramente ao acaso. Os tratamentos foram a formulação com as diversas concentrações dos óleos essenciais de citronela, cravo-da-índia e alecrim, com utilização de 10 carrapatos por grupo experimental.

#### 4.7 AVALIAÇÃO CARRAPATICIDA *IN VITRO*

##### 4.7.1 Seleção das fêmeas ingurgitadas

As fêmeas foram selecionadas de um montante de aproximadamente 300 espécimens, fornecidos pelo laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite – MG, tendo as seguintes origens geográficas: Votuporanga-SP; Perdizes-MG e do Campo experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite, no município de Coronel Pacheco-MG.

##### 4.7.2 Realização dos experimentos

O desenvolvimento dos testes foi fundamentado pela técnica de Drummond *et al.* (1973), utilizando-se fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Na amostra de carrapatos (Figura 12A) as fêmeas foram selecionadas de acordo com os critérios de tamanho e mobilidade e separadas em grupos 10, que foram tratadas com as formulações em variadas concentrações.

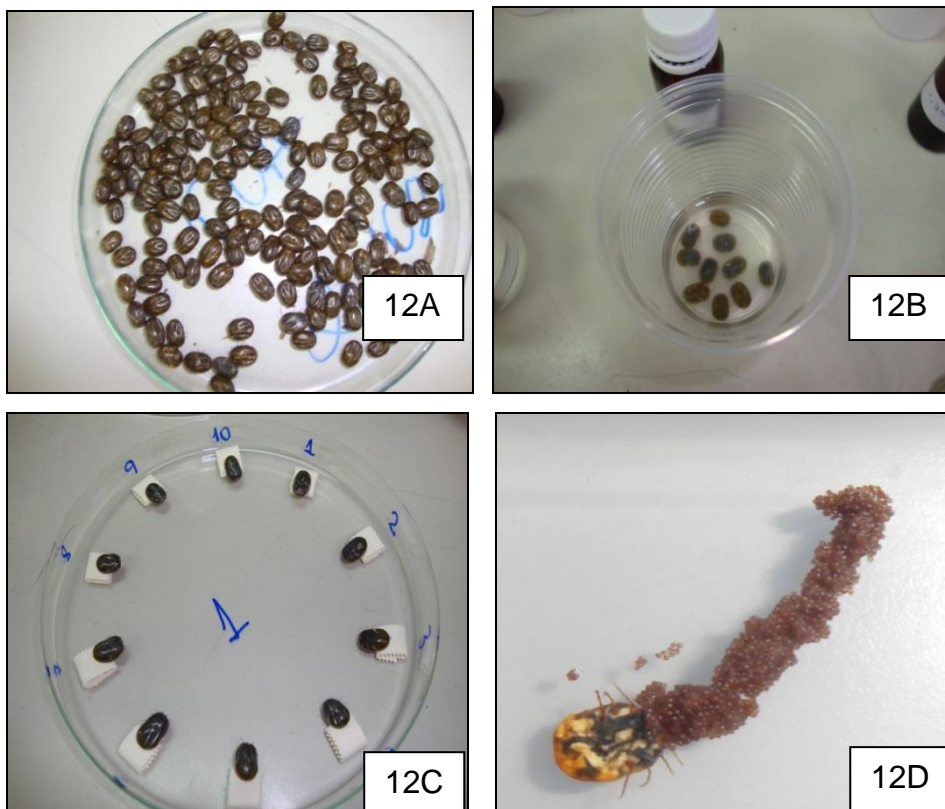
As fêmeas foram mergulhadas nas formulações e deixadas por 5 minutos em imersão (Figura 12B). Concluído o tempo de contato, foram coletadas e fixadas

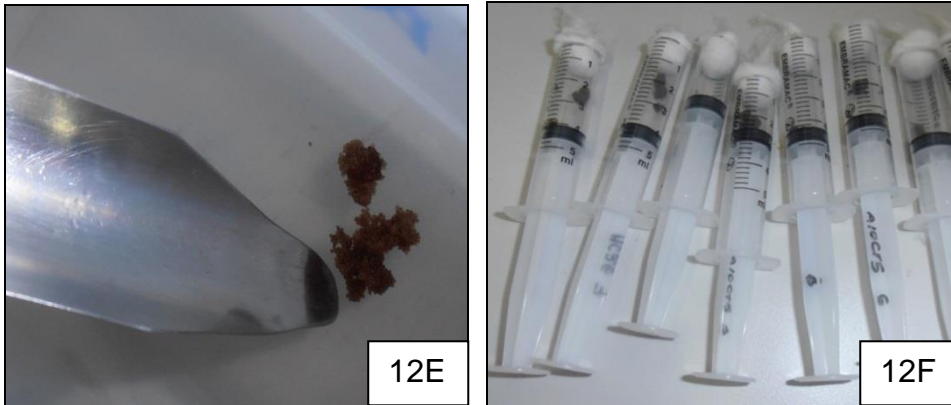
com fita crepe no interior das placas de Petri (Figura 12C). Estas foram mantidas por 15 dias sob temperatura controlada de  $27(\pm 1,0^{\circ}\text{C})$  e umidade relativa acima de 80%. Após o período de incubação, foram realizadas as pesagens da ovoposição de cada fêmea (Figura 12D e 12E).

Os ovos de cada fêmea foram transferidos para seringas plásticas, com a extremidade distal cortada e vedadas com algodão hidrófilo, sendo mantidas nas mesmas condições das fêmeas, por 20 dias, para a observação da eclosão larval (Figura 12F).

Para o controle negativo foi utilizada a formulação base sem os óleos essenciais. O controle positivo foi a associação de clorpirifós 50,0g+ cipermetrina 6,0g + veículo qsp 100mL.

Figura 12 A, 12B, 12C, 12D, 12E, 12F





12 A – Carrapatos de uma mesma população; 12 B – Fêmeas mergulhadas na formulação, 12 C – Fêmeas fixadas na placa de Petri; 12D – Ovoposição, 12E – Coleta da ovoposição; 12F – Ovos na seringa lacrada.  
Fonte: o autor (2014)

#### 4.7.3 Avaliação do efeito do tratamento

A avaliação da eficácia foi efetuada mediante a aplicação dos cálculos apresentados nas formulas 1, 2 e 3 conforme Drummond *et al.* 1973.

Fórmula 1: Reprodução Estimada (RE) =  $\frac{\text{peso ovos (mg)} \times \% \text{ de eclosão}}{\text{peso das fêmeas (mg)}}$

Fórmula 2 : Eficiência do Controle(%C) =  $\frac{\text{RE do controle} - \text{RE do tratamento}}{\text{RE do controle}} \times 100$

A eficácia do tratamento (Formula 2) é dependente do resultado da reprodução estimada média do grupo controle (Formula 1). O peso médio dos ovos multiplicado pela porcentagem da eclosão, dividido pelo peso das fêmeas resulta na reprodução estimada desta população de carrapatos, sem nenhum tratamento (grupo controle). Esta reprodução estimada é confrontada com a dos tratamentos e o esperado é que a reprodução seja menor que a do grupo controle. Pode haver situações em que os tratamentos fiquem com a reprodução maior que a do grupo controle e assim, a eficácia do tratamento terá resultado negativo.

Fórmula 3: Índice de Produção de ovos (IPO) =  $\frac{\text{peso massa ovos (mg)}}{\text{peso fêmeas ingurgitadas (mg)}} \times 100$

A pesagem de cada ovoposição resultará no Índice de Produção de Ovos (IPO) do grupo controle negativo e dos tratamentos. O esperado é que o tratamento tenha um IPO menor em relação ao controle negativo e que seja decrescente conforme o aumento da concentração dos ativos na formulação.

Para a avaliação da eclosão larval (EL) empregou-se a leitura direta (%) de larvas eclodidas no interior da seringa.

A eclosão larval nos indica a porcentagem, de 0-100%, de ovos que eclodirão dos controles e dos tratamentos. O esperado é que conforme se aumente a concentração dos ativos na formulação, a eclosão larval tenha índice decrescente.

Os resultados de eficiência de tratamento com as formulações contendo os óleos essenciais foram comparados com a lista dos resultados de eficiências de diferentes produtos comerciais disponibilizada pela Embrapa Gado de Leite-MG (Tabela 5). Além disso, foram confrontados com a legislação do MAPA (BRASIL, 1997), que estabelece um valor mínimo de eficácia de 95%.

Tabela 5 - Produtos químicos utilizados pela Embrapa para o Teste de Sensibilidade de Carrapatos a Carrapaticidas com código de identificação, composição e eficácia do tratamento (%C) para as populações de Votuporanga - SP; Perdizes - MG e do campo experimental José Henrique Bruschi (CEJHB/Embrapa) – MG

Código de identificação	Composição	(%C) Embrapa Gado de Leite - MG	(%C) Votuporanga - SP	(%C) Perdizes - MG
I	cipermetrina 20,0g + clorpirifós 50,0g + veículo qsp 100mL	100,0	100,0	100,0
II	cipermetrina 15,0g + clorpirifós 25,0g + butóxido de piperonila 1,0mL + veículo qsp 100mL	100,0	100,0	100,0
III	cipermetrina 15,0g + clorpirifós 25,0g+Butóxido de Piperonila 15,0g + citronelal 1,0g + veículo qsp 100mL	100,0	100,0	98,7
IV	clorpirifós 50,0g + cipermetrina 6,0g + veículo qsp 100mL	100,0	100,0	100,0
V	cipermetrina 15,0g + clorpirifós 25,0g + citronelal 1,0g + veículo qsp 100mL	100,0	95,4	90,2
VI	cipermetrina 15,0g + clorpirifós 25,0g +citronelal 1,0 g + veículo qsp 100mL	85,5	80,4	80,6
VII	diclorvos 60,0 g + clorpirifós	86,8	69,1	-

VIII	20,0 g + veículo qsp 100mL amitraz 12,5g + veículo qsp 100mL	73,9	45,0	85,5
IX	supona 10,0g+ veículo qsp 100mL;	76,7	41,3	69,1
X	triclorfone 77,6g + coumafós 1,0g + ciflutrina 1,0g + veículo qsp 100mL;	58,4	31,8	80,8
XI	cipermetrina 15,0g - +butóxido de piperonila.15,0 g +diclorvós 1,0g + veículo qsp 100mL;	-	9,9	-
XII	deltametrina 2,5g + veículo qsp 100mL	17,3	8,9	0,0
XIII	clorfenvinfós 60g + diclorvós 20g + veículo qsp 100mL	100,0	-	-

Fonte: Embrapa Gado de Leite – MG (2014)

#### 4.7.4 Análise estatística

As médias obtidas por grupo experimental foram submetidas às análises de desvio padrão, ANOVA e Teste de Tuckey ( $p < 0,05$ ), empregando-se o programa ASSISTAT 7.7.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS:

Tabela 6 - Peso médio (g) de planta utilizada por extração, média de óleo obtido por extração e rendimento médio (%) das extrações dos óleos essenciais de citronela, cravo-da-índia e alecrim.

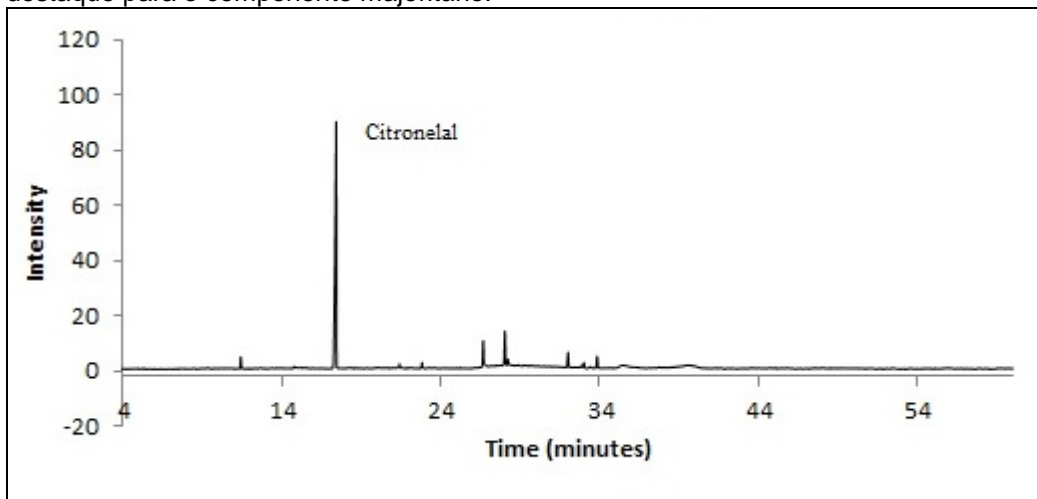
Óleos essenciais	Peso médio por extração (g)	Média por extração (mL)	Rendimento médio (%)
Citronela	136,45	1,30	0,95
Cravo-da-índia	129,90	6,3	15,0
Alecrim	132,77	1,35	1,01

Fonte: o autor (2014)

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise qualitativa de CG/EM do óleo essencial de citronela identificou sete componentes: citronelal, acetato de citronelal, acetato de geranila, D-germacrene,  $\alpha$ -cadineno,  $\alpha$ -limoneme e  $\beta$ -citral (Figura 13).

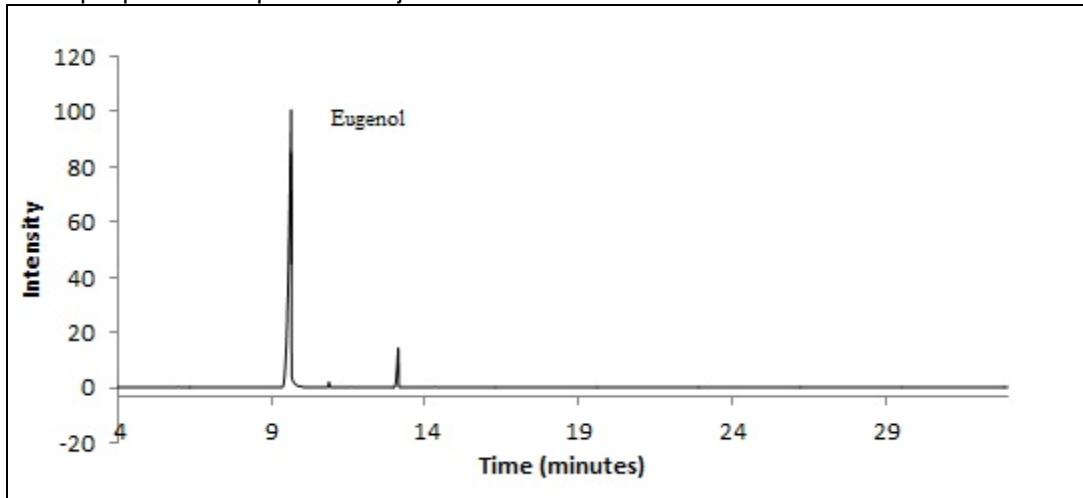
Figura 13 – Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de citronela, com destaque para o componente majoritário.



Fonte: o autor (2014)

Para o óleo essencial de cravo-da-índia foram identificados 4 componentes: eugenol, acetato de eugenila,  $\beta$ -carofileno e oxido carofileno (Figura 14).

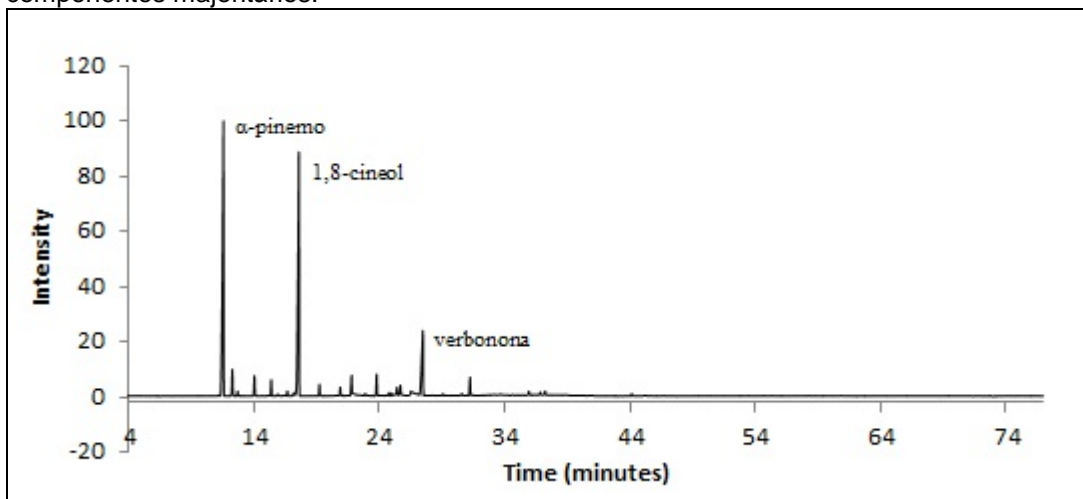
Figura 14 - Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de cravo-da-índia, com destaque para o componente majoritário.



Fonte: o autor (2014)

Para o óleo essencial de alecrim foram identificados 24 componentes:  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpinoleno, m-cimene, eucaliptol, gama terpinemo,  $\beta$ -linalol, eucarione, canfora, carvomentenol, L- $\alpha$ -terpinol, verbonona,  $\beta$ -citral, borneol acetato, acetato de geranila, metil eugenol,  $\beta$ -bisaboleno, oxido de cariofileno (Figura 15).

Figura 15 - Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de alecrim, com destaque para os componentes majoritários.



Fonte: o autor (2014)

### 5.3 FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA

A formula base desenvolvida que serviu de veículo para os óleos essenciais e as características organolépticas e pH estão apresentadas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Formulação base (veículo) para incorporação dos óleos essenciais

Componente	Concentração
Tensoativo	0,1%
Agente de penetração	10%
Umectante	5%
Co-tensoativo	1%
Solução gel base	qsp 100%

Fonte: o autor (2014)

Tabela 8 - Características organolépticas e pH das formulações incorporadas dos óleos essenciais nas concentrações de 0,5 – 15%

Produto	Aparência	Odor	pH	Observações
Óleo essencial de alecrim 0,5% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	5,16	Necessita agitação
Óleo essencial de alecrim 2,5% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	5,09	Necessita agitação
Óleo essencial de alecrim 5,0% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	4,60	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de alecrim 10,0% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	4,75	Necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 2,5% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Amarelado leitoso	Característico	4,45	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 5,0% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Amarelado leitoso	Característico	4,27	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 10,0% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Amarelado leitoso	Característico	4,17	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 15,0% + Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Amarelado leitoso	Característico	4,11	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de alecrim 0,5%, veículo qsp 30 mL	Transparente	Característico	7,05	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de alecrim 2,5%, veículo qsp 30 mL	Levemente opaco	Característico	6,42	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de alecrim 5,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	5,80	Necessita agitação
Óleo essencial de alecrim 10,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	5,22	Necessita agitação

Óleo essencial de alecrim 15,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	5,07	Necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 0,5%, veículo qsp 30 mL	Amarelo claro leitoso	Característico	6,95	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 2,5%, veículo qsp 30 mL	Amarelo claro leitoso	Característico	6,95	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 5,0%, veículo qsp 30 mL	Róseo leitoso com separação de fases	Característico	6,66	Necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 10,0%, veículo qsp 30 mL	Róseo leitoso com separação de fases	Característico	6,21	Necessita agitação
Óleo essencial de cravo-da-índia 15,0%, veículo qsp 30 mL	Róseo leitoso com separação de fases	Característico	5,94	Necessita agitação
Óleo essencial de citronela 0,5%, veículo qsp 30 mL	Levemente <i>opaco</i>	Característico	2,80	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de citronela 1,25%, veículo qsp 30 mL	Levemente <i>opaco</i>	Característico	2,78	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de citronela 2,5%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	2,64	<u>Não</u> necessita agitação
Óleo essencial de citronela 5,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	2,66	Necessita agitação
Óleo essencial de citronela 10,0%, veículo qsp 30 mL	Branco leitoso	Característico	2,83	Necessita agitação

Fonte: o autor (2014)

#### 5.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CARRAPATICIDA

Os resultados referentes ao Índice de Produção de Ovos (IPO), Eclosão Larval (EL) e Eficácia do Tratamento (%C), de acordo com as regiões geográficas das fêmeas, estão apresentados nas tabelas 9 – 13. Simultaneamente aos resultados obtidos, comparou-se a eficiência do tratamento das formulações em teste com os dados de eficiência acaricida obtidos na tabela 5.

Tabela 9 - Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% de óleo essencial de citronela sobre IPO, EL e %C testadas em populações de carrapatos provenientes da EMBRAPA Gado de Leite, MG e Votuporanga, SP

Embrapa gado de leite-MG				Votuporanga-SP			
Concentração (%)	IPO (mg)	EL (%)	%C	Concentração (%)	IPO (mg)	EL (%)	%C
Controle positivo	18,02±19,65 <sup>b</sup>	24,33±37,61 <sup>c</sup>	91,35	Controle positivo	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,0
Controle negativo	53,78±4,69 <sup>a</sup>	94,30±2,45 <sup>a</sup>	-	Controle negativo	28,18±16,73 <sup>a</sup>	54,10±46,77 <sup>a</sup>	-
0,50	52,57±4,65 <sup>a</sup>	94,30±4,99 <sup>a</sup>	2,09	-	-	-	-
1,25	54,32±2,74 <sup>a</sup>	94,00±4,83 <sup>a</sup>	-0,42	-	-	-	-
2,50	46,37±14,58 <sup>a</sup>	73,90±34,23 <sup>ab</sup>	32,87	-	-	-	-
5,00	36,43±25,39 <sup>ab</sup>	83,00±19,83 <sup>ab</sup>	40,21	5,00	21,81±18,16 <sup>a</sup>	39,75±39,93 <sup>a</sup>	48,00
10,00	34,17±24,61 <sup>ab</sup>	67,62±41,52 <sup>b</sup>	55,51	10,00	31,0±14,95 <sup>a</sup>	59,10±39,31 <sup>a</sup>	-23,05
15,00	-	-	-	15,00	27,76±19,65 <sup>a</sup>	64,71±42,89 <sup>a</sup>	-18,26

Fonte: o autor (2014)

Medias com letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tuckey. Os resultados representam a média de 10 fêmeas por grupo experimental  $\pm$  desvio padrão.

IPO - Índice de Produção de Ovos, EL - Ecloração Larval, % C - Eficácia do Tratamento

Controle negativo: formulação base

Controle positivo: clorpirifós 50,0g+ cipermetrina 6,0g + veículo qsp 100mL.

ab: significativamente igual ao controle e ao grupo tratado.

Em relação ao IPO (mg) demonstrado na tabela 9, observou-se que os tratamentos com as formulações com o óleo de citronela (0,5 – 10%) não foram estatisticamente significativos quando comparado ao grupo controle negativo. Considerando-se o parâmetro EL (%) verificou-se que somente o produto contendo 10% do óleo de citronela apresentou uma inibição significativa da ecloração larval quando comparado ao grupo controle negativo.

Tabela 10 - Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% de óleo essencial de cravo-da-índia sobre IPO, EL e %C testadas em populações de carrapatos provenientes de Votuporanga, SP e Perdizes, MG

Votuporanga-SP				Perdizes-MG			
Concentração (%)	IPO (mg)	EL (%)	%C	Concentração (%)	IPO (mg)	EL (%)	%C
Controle positivo	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00	Controle positivo	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00
Controle negativo	28,18±16,73 <sup>a</sup>	54,10±46,77 <sup>a</sup>	-	Controle negativo	23,81±23,98 <sup>a</sup>	73,70±0,44 <sup>a</sup>	-
-	-	-	-	0,50	25,27±19,77 <sup>a</sup>	84,28±0,37 <sup>a</sup>	(-22,77)
2,50	10,32±10,73 <sup>b</sup>	10,87±24,15 <sup>b</sup>	92,47	2,50	15,59±17,98 <sup>ab</sup>	80,00±50,77 <sup>ab</sup>	28,30
5,00	8,96±8,97 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00	5,00	0,43±1,36 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00
10,00	7,11±11,37 <sup>b</sup>	11,44±32,50 <sup>b</sup>	94,74	10,00	0,38±0,81 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00
15,00	10,20±14,90 <sup>b</sup>	17,16±39,65 <sup>b</sup>	88,97	15,00	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00

Fonte: o autor (2014)

Medias com letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tuckey. Os resultados representam a média de 10 fêmeas por grupo experimental  $\pm$  desvio padrão.

IPO - Índice de Produção de Ovos, EL - Ecloração Larval, % C - Eficácia do Tratamento

Controle negativo: formulação base

Controle positivo: clorpirifós 50,0g+ cipermetrina 6,0g + veículo qsp 100mL.

ab: significativamente igual ao controle e ao grupo tratado.

Todas as formulações adicionadas do óleo de cravo-da-índia (tabela 10) proporcionaram uma inibição significativa do IPO e da EL sobre a população de carrapatos da região geográfica de Votuporanga - SP. No entanto, os efeitos inibitórios significativos sobre a população de Perdizes – MG foram alcançados somente quando realizados os tratamentos nas concentrações a partir de 5,0% do óleo.

A partir do teste de avaliação de eficácia do tratamento foi possível constatar a eficiência de todas as formulações adicionadas do óleo de cravo-da-índia, apresentando índices de 88,97 a 100%. Observou-se uma maior sensibilidade ao produto da população de carrapatos de Perdizes-MG quando comparada com a de Votuporanga-SP.

Tabela 11 - Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% de óleo essencial de alecrim sobre IPO, EL e %C testadas em população de carrapatos provenientes de Perdizes, MG

Concentração (%)	IPO (mg)	EL (%)	%C
Controle positivo	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00
Controle negativo	16,48±19,17 <sup>a</sup>	64,83±50,36 <sup>a</sup>	-
0,5%	29,68±16,31 <sup>a</sup>	74,55±42,73 <sup>a</sup>	-107,82
2,5%	23,16±14,33 <sup>a</sup>	80,00±42,29 <sup>a</sup>	-76,30
5,0%	18,14±16,47 <sup>a</sup>	43,12±46,77 <sup>a</sup>	26,44
10,0%	25,37±19,27 <sup>a</sup>	69,25±43,28 <sup>a</sup>	-65,77
15,0%	10,55±14,33 <sup>a</sup>	59,20±54,04 <sup>a</sup>	40,78

Fonte: o autor (2014)

Medias com letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tuckey. Os resultados representam a média de 10 fêmeas por grupo experimental  $\pm$  desvio padrão.

IPO - Índice de Produção de Ovos, EL - Ecloração Larval, % C - Eficácia do Tratamento

Controle negativo: formulação base

Controle positivo: clorpirifós 50,0g+ cipermetrina 6,0g + veículo qsp 100mL.

ab: significativamente igual ao controle e ao grupo tratado.

O índice de produção de ovos (IPO mg) e a EL do óleo essencial de alecrim, demonstrados na tabela 11, não foram significativos em relação ao grupo controle. Entretanto, quando observado o resultado da formulação em relação a eficácia do tratamento (%C), notou-se que na concentração de 15,0% do princípio ativo esta foi de 40,78%.

Tabela 12 - Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% da associação de óleo essencial citronela e de cravo-da-índia sobre IPO, EL e %C testadas em população de carrapatos provenientes de Votuporanga, SP

Concentração (%)		IPO (mg)	EL (%)	%C	
Citronela	Cravo-da-índia				
Controle positivo		0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	100,00	
Controle negativo		-	22,10±21,18 <sup>ab</sup>	43,11±45,79 <sup>ab</sup>	-
2,5%	5,0%	7,29±8,42 <sup>b</sup>	10,88±24,15 <sup>b</sup>	90,73	
5,0%	5,0%	9,0±9,31 <sup>ab</sup>	14,50±30,59 <sup>ab</sup>	85,95	
10,0%	5,0%	8,55±10,14 <sup>ab</sup>	16,25±25,60 <sup>ab</sup>	84,68	
15,0%	5,0%	26,16±16,69 <sup>a</sup>	46,90±42,56 <sup>a</sup>	-37,58	

Fonte: o autor (2014)

Medias com letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tuckey. Os resultados representam a média de 10 fêmeas por grupo experimental  $\pm$  desvio padrão.

IPO - Índice de Produção de Ovos, EL - Ecloração Larval, % C - Eficácia do Tratamento

Controle negativo: formulação base

Controle positivo: clorpirifós 50,0g+ cipermetrina 6,0g + veículo qsp 100mL.

ab: significativamente igual ao controle e ao grupo tratado.

O índice de produção de ovos (IPO mg) e a EL (%) foram significativos em relação ao grupo controle somente quando foi utilizado 2,5% do óleo essencial de citronela e 5,0% do óleo essencial do cravo-índia (tabela 12).

Tabela 13 - Ação das formulações contendo as concentrações de 0,5 - 15% da associação dos óleos essenciais de alecrim e citronela sobre IPO, EL e %C testadas em população de carrapatos provenientes de Perdizes, MG

Concentração (%)		IPO (mg)	EL (%)	%C
Alecrim	Citronela			
Controle positivo		0,0±0,0 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	100,00
Controle negativo		24,75±21,69 <sup>a</sup>	80,85±37,28 <sup>a</sup>	-
0,5%	5,0%	10,82±17,03 <sup>ab</sup>	73,75±49,22 <sup>a</sup>	60,27
2,5%	5,0%	12,79±15,12 <sup>ab</sup>	80,00±48,34 <sup>a</sup>	30,54,
5,0%	5,0%	25,60±22,53 <sup>a</sup>	98,83±0,98 <sup>a</sup>	-21,52
10,0%	5,0%	13,42±16,88 <sup>ab</sup>	55,00±45,83 <sup>a</sup>	64,25

Fonte: o autor (2014)

Medias com letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tuckey. Os resultados representam a média de 10 fêmeas por grupo experimental  $\pm$  desvio padrão.

IPO - Índice de Produção de Ovos, EL - Ecloração Larval, % C - Eficácia do Tratamento

Controle negativo: formulação base

Controle positivo: clorpirifós 50,0g+ cipermetrina 6,0g + veículo qsp 100mL.

ab: igual significativamente ao controle e ao grupo tratado.

Para a associação dos óleos essenciais de alecrim e citronela, o índice de produção de ovos (IPO mg) e a EL (%) não foram significativos em relação ao grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os valores de %C variaram de 30,54 a 64,24% (tabela 13).



## 6 DISCUSSÃO

A literatura possui estudos demonstrando a atividade carrapaticida de *Cympobogon winterianus*, *Syzygium aromaticum* e *Rosmarinus officinalis* (AFFONSO et al., 2012; AGNOLIN et al. 2010; MARTINS 2006, OLIVO et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2012.), entretanto, não foram encontradas informações desta atividade dos óleos quando incorporados em formulações de contato. Em trabalhos já publicados observou-se que o óleo essencial foi incorporado em solventes orgânicos ou água destilada, sem a adição de adjuvantes farmacotécnicos, cujas ações são proporcionar estabilidade ao produto e possibilitar uma aderência ao tegumento do carrapato. Diante disso, o presente estudo teve como inovação avaliar a atividade carrapaticida desses óleos essenciais incorporados em formulações de contato que propiciassem a estabilidade, com baixo índice de toxicidade ambiental, custo reduzido e fácil manuseio.

O produto obtido foi uma emulsão O/A formada pela adição dos óleos essenciais na base aquosa contendo um polímero. A adição desse polímero na composição da formulação teve como principal mérito o aumento da viscosidade e a formação de uma película sobre o tegumento do carrapato, visando assim um aumento dos tempos de retenção e de ação dos óleos essenciais. A adição de óleo em água requer a presença de tensoativos e co-tensoativos a fim de favorecer a miscibilidade dos componentes incompatíveis fisicamente, aumentar a estabilidade e com isso evitar a separação das fases oleosa e aquosa (RODRIGUES-ROJO et al., 2012).

De acordo com Chagas et al. (2003), existem vários tipos de solventes que fazem parte das formulações carrapaticidas ou que são utilizados em experimentos com extratos vegetais. Possuem a principal finalidade de solubilizar o princípio ativo, proporcionando a distribuição homogênea do mesmo por toda a cutícula do artrópode, ampliando sua área de ação. Segundo a mesma autora, os óleos essenciais têm seus efeitos potencializados quando emulsionados, principalmente para larvas pois os artrópodes absorvem substâncias lipofílicas e hidrofílicas. Segundo os autores, quando o óleo essencial não está emulsionado, ocorre o fenômeno físico chamado apassivação, onde o produto é inicialmente absorvido formando após um filme apassivador, barrando a passagem do óleo. A formulação

proposta, neste estudo, objetivou emulsionar os óleos essenciais e com isto proporcionar a solubilização em uma formulação base e ainda, com a adição de conservantes, aumentar a estabilidade microbiológica do produto, preservando-o contra a contaminação. Esta formulação foi composta ainda de umectante que auxilia na preservação da perda de água evitando a alteração do produto. A adição de um agente de penetração auxilia na potencialização do efeito do produto, pois ele auxilia a entrada dos ativos no tegumento do carrapato. A adição do polímero aumentando a viscosidade do meio também auxilia no aumento da estabilidade da formulação e proporciona ainda uma melhor fixação do produto tanto no animal como no carrapato.

Em nenhuma das formulações apresentadas ocorreu o fenômeno da coalescência, que é a separação irreversível das fases aquosa e oleosa. Algumas formulações necessitaram de agitação e rapidamente restabeleceram a aparência leitosa e homogênea. Nas formulações que apresentaram alteração da cor, propõe-se a adição de antioxidantes, de forma a preservar dos efeitos da luz.

Os resultados do presente estudo mostraram a eficácia das formulações adicionadas dos óleos essenciais. As formulações adicionadas do óleo de citronela apesar de não terem apresentado eficácia de tratamento que permitisse ser considerada como produto acaricida, demonstrou *in vitro* eficácias superiores a acaricidas comerciais que provavelmente provocaram resistência nos carrapatos de determinadas regiões, tais como os produtos VIII, IX, X, XI, XII (Tabela 5).

De acordo com Chagas *et al.*(2002) a ação inseticida e carrapaticida do óleo essencial de citronela está relacionada à presença do citronelal. O resultado da análise de cromatografia a gás do óleo de citronela usado neste estudo evidenciou a presença do citronelal como componente majoritário. Diversos produtos comerciais carrapaticidas (Tabela 5) contem o citronelal, obtido sinteticamente, em suas composições.

Santos *et al.* (2012) utilizando o óleo essencial de citronela a 25% diluído em água destilada obtiveram 100% de eficiência (%C), entretanto, é necessário observar que para a obtenção desta eficácia carrapaticida, foi necessária a utilização de altas concentrações do óleo essencial e a diluição do óleo essencial em água não proporcionaria estabilidade ao produto, uma vez que o óleo se separaria rapidamente da água, devido a fenômenos físicos. Olivo *et al.* (2008) efetuando 3 imersões das fêmeas ingurgitadas com intervalos de 24h/imersão, em

concentrações de 0,1 – 100%, obtiveram 92,10% de eficácia do tratamento na concentração de 1% e nas concentrações de 10 -100%, atingiram, em média, 87,00%. Importante ressaltar que no presente estudo o tempo de ação da formulação sobre os carrapatos foi de apenas uma imersão de 5 minutos e não foram utilizados os óleos puros, mas incorporados à formulação base de contato. No estudo proposto por Olivo *et al* (2008), os elevados resultados de eficiência podem ter sido determinados pelo número de frequência de imersões. Para fins de desenvolvimento de produto e utilização futura pelos produtores, este número de aplicações seria inviável.

De acordo com a legislação brasileira, para que um produto possa ser considerado acaricida o mesmo deve apresentar eficácia de tratamento *in vivo* superior a 95,0% (BRASIL, 1997).

A comparação das eficácias de tratamento com as formulações adicionadas de óleo de cravo-da-índia, citronela, alecrim e as associações de citronela com cravo-da-índia e citronela com alecrim, mostrou a superioridade do óleo de cravo-da-índia sobre as populações de carrapato estudadas. Os produtos adicionados deste óleo foram capazes de apresentar eficácias de tratamento superiores a 95,0%, até mesmo em concentrações inferiores a 15,0% do óleo adicionado. Importante ressaltar o elevado efeito inibitório da formulação adicionada do óleo de cravo quando considerados também os índices de postura de ovos e eclosão larval, mostrando a grande eficácia acaricida do produto em diferentes estágios do ciclo do carrapato.

Estudos anteriores já reportaram as atividades fungicida, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antisséptica, inseticida e repelente do óleo de cravo-da-índia (NERIO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2009,). Com relação a atividade carrapaticida, já foi demonstrada eficácia *in vitro* de 100% do extrato apolar de cravo-da-índia sobre as fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. No entanto, este extrato apolar foi utilizado de forma concentrada, não veiculada em formulações de contato (ALVAREZ *et al.*, 2008). Estudos conduzidos por Santos *et al.* (2012) também mostraram a atividade acaricida do óleo do fruto de cravo-da-índia. Este autor obteve como resultados eficácias do óleo veiculado em solução de acetona 40%, nas concentrações de 2,5 e 5,0%, de aproximadamente 97,15 e 99,42%, respectivamente.

O óleo essencial do cravo-da-índia tem como componente majoritário o eugenol, um composto volátil de comprovada ação inseticida (MAZZAFERA *et al.*, 2003, MONTEIRO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012). Sob o ponto de vista químico, sugere-se que a ação carrapaticida do óleo essencial de cravo-da-índia se deve a presença do eugenol. Mediante a avaliação qualitativa desse composto realizada por cromatografia a gás evidenciou-se o mesmo como majoritário (AGNOLIN, 2010; MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.* 2011; OLIVEIRA *et al.* 2009).

O óleo essencial de cravo-da-índia incorporado na formulação proposta, quando testado na população de carrapatos provenientes de Perdizes - MG, apresentou uma eficiência comparável com as encontradas nos produtos químicos testados: I, II, IV (Tabela 5) cuja %C da formulação foi de 100%

Para a população de carrapatos proveniente de Votuporanga - MG, obteve-se também resultados de eficiência na formulação proposta contendo o óleo essencial do cravo-da-índia, nas concentrações de 2,5 a 15%, semelhantes aos produtos: I, II, III, IV (Tabela 5), com 100% de ação acaricida.

Os índices de eficácia do tratamento tiveram resultados aproximados nas concentrações de 0,5 e 10,0% indicando-se que é mais racional utilizar uma concentração menor de matéria-prima, no caso o óleo essencial, para manipulação do produto, uma vez que obteve-se o mesmo resultado de eficácia carrapaticida.

Quanto as formulações contendo o óleo essencial de alecrim, Martinez-Velazquez *et al.* (2011), estudando o efeito deste óleo sobre as larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, obteve, como resultado, nas concentrações de 5%, 10% e 20%, mortalidades de 40%, 88,98 e 100% respectivamente. Ressalta-se, no entanto, que o experimento foi realizado sobre as larvas. Em nossos testes, a formulação obteve índice de eficiência de 26,44 e 40,78% sobre as fêmeas ingurgitadas provenientes de Perdizes, MG, valores estes menores que as eficácias obtidas com os produtos químicos listados na Tabela 5 (para a mesma população). O mesmo foi observado quando o óleo essencial de alecrim foi associado à citronela. Ambas as formulações contendo o óleo essencial de alecrim e a associação do alecrim com a citronela, somente foram mais eficientes que o produto à base de deltametrina.

Dados da literatura mostram que podem ocorrer diferentes níveis de eficácia do acaricida de acordo com a região geográfica (RAYNAL *et al.*, 2013). Nossos resultados corroboram esses dados, uma vez que foram observados diferentes

perfis de sensibilidade das populações de carrapatos de Votuporanga-SP e Perdizes-MG quando utilizada a formulação incorporada com o óleo de cravo-da-índia na concentração de 2,5% e citronela a 10,0%. Para as demais concentrações contendo o óleo essencial de cravo-da-índia, ressaltamos, no entanto, a eficácia da formulação frente as duas populações de carrapatos provenientes de diferentes regiões geográficas.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram a atividade carrapaticida das formulações testadas, com destaque para as contendo óleo essencial de cravo-da-índia, quando comparadas com os produtos químicos utilizados pelos produtores, variando de acordo a origem geográfica dos carrapatos.

As formulações à base de plantas medicinais propostas apresentaram um importante potencial para a utilização no controle do carrapato dos bovinos por meio da atividade carrapaticida verificada, sendo de baixa toxicidade para o manipulador, para o animal e para o ambiente, gerando conseqüentemente, uma produção de carne e de leite com baixo índice de resíduos químicos.

É necessário, porem, a continuidade dos estudos *in vivo* das formulações propostas para a validação da eficiência em condições de campo.

## REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. S., RENNÓ, M. N., SLANA, G. B. C. A., FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**. v.4, n.2, p:146-161, 2012.
- AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J.; LEAL, M.L.R.; BECK, R.C.R.; MEINERZ, G.R.; PARRA, C.L.C.; MACHADO, P.R.; FOLETTO, V.; BEM, C.M.; NICOLODI, P.R.S.J. Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**.v.12, n.4, p:482-487, 2010.
- AGNOLIN, C. A. **Avaliação dos óleos essenciais de capim limão, citronela e eucalipto no controle do carrapato**. 2012. Tese. Pós-graduação em Zootecnia, área de Produção Animal/Bovinocultura de leite. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- AGNOLIN, C. A. **Óleo de citronela no controle de ectoparasitas de bovinos**. 2009. Dissertação. Pós-graduação em Zootecnia, área de Produção Animal/Bovinocultura de leite. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- ÁLVAREZ, V.; LOIAZA, J.; BONILLA, R. ; BARRIOS, M. Control in vitro de garrapatas (*Boophilus microplus* ; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. **Revista de Biología Tropical**. v.56, n.1,p: 291-302, 2008.
- ALVES, W.V.; LORENZETTI, E.R.; GONÇALVES, F.C. Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *rhhipicephalus (boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. v.2, p:14-25, 2012
- AMARAL, M. A. Z. D. **Aplicação e uso por produtores do controle estratégico do carrapato bovino adotado pela Embrapa Gado de Leite**. Tese. Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias.Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2008.
- AMERICA, E. S. O. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**. v. 8, n. 5. USA, 1972
- ANDRADE, M.A. **Óleos essenciais de *Cinanamomun zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: Caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana**. Dissertação. Pós-graduação em Agroquímica.Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2010.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; TANAKA, A.S. **Controle do Carrapato por meio de Vacina – Situação atual e perspectivas**. Campo Grande, MS.Embrapa gado de corte. 58 p. ISBN 1517-3747, 2002.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.G.;JR, L.V.A. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. **Farmacotécnica**. Editora Premier. São Paulo, 2000

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

BALUNASA, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v.78, p:431– 441, 2005

BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Fitoterápicos**. 3ed. Artmed. São Paulo, 2012

BARRETO, C. Dicas para começar e melhorar a sua produção. Disponível em: [http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg\\_article\\_print/1,3916,1669299-1489-1,00.html](http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/1,3916,1669299-1489-1,00.html). Acesso em: 12 jul 2014.2008

BENETI, S. C.; ROSSET, E.; CORAZZA, M. L.; FRIZZO, C. D.; LUCCIO, M. D. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. **Journal of Food Engineering**. v.102, p:348–354, 2011.

BRASIL. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1. ed., 52 p., ANVISA. Brasília, 2004

BRASIL. **Produção da pecuária municipal**. vol 39, 63p. IBGE. Rio de Janeiro, 2011

BRASIL. **Portaria 48, de 12 de maio de 1997**. MAPA. Brasília, 1997.

Brasil. **Plano mais pecuária**. 32p. MAPA. Brasília, 2014.

BRITO, L. G. ; ROCHA, R. B.; NETTO, F. G. S.; BARBIERI, F. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GONÇALES, M. A. R.; CARVALHO, G. L. O. Eficácia de carrapaticidas em rebanhos. [S.l.]: v. 133. **Embrapa**, 2010.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; NEVES-VALENTE, E. C.; SOUZA, L. A.; SILVA-DIAS, N.; GIRÓN-PÉREZ, K.; PRÉDES-TRINDADE, R. C. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) con extractos vegetales. **Revista Colombiana de Entomología**. v.35, n.2, p:145-149, 2009

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation. **Journal of Mexican Chemical Society**. v.50, n.3, p:126-129, 2006

CASTRO, K.N.C.; ISHIKAWA, M.M.; CAMPOLIN, A.I.; CATTO, J.B.; PEREIRA, Z.V.; CASTRO, M.M.; SILVA, V.C. Prospecção de plantas medicinais para controle do carrapato dos bovinos. **Embrapa Meio-Norte**. 32 p., 2010.

CHAGAS, A.C.S.; BARROS, L.D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTTI, R.; OLIVEIRA, M.C.S.; BIZZO, H.R. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. p:295-303, 2011



CHAGAS, A. C. S.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; PRATES, H. T.; PASSOS, W. M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**. v.33, n.1, p:109-114, 2003

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal Of Veterinarian Research and Animal Science**. p: 247-253, 2002.

CHUNGSAMARNYART, N.; JIWAJINDA, S.; RATTANAKREETAKUL, C.; JANSAWAN, W. Pratical extraction of sugar apple seeds against tropical cattle ticks. **Kasetsart Journal Natural Science Supplement**. v.25, p:101-105, 1991

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.1, p:43-49, 2012

COSTA, F.M.; NETTO, A.D.P. Nota técnica: desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário **Química Nova**. v.35, n.3, p:616-622, 2012

DEKAA, H.; DEKAA, S.; BARUAHC, C. K.; DAS, J.; HOQUE, S.; SARMA, N.S. Vermicomposting of distillation waste of citronella plant (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) employing *Eudrilus eugeniae*. **Bioresource Technology**. v.102, p:6944–6950, 2011

DEWICK. P.M. **Medicinal natural products**. Wiley. 2.ed. 514 p., 2002

DRUMMOND R.O., ERNST S.E., TREVINO J.L., GLADNEY W.J., GRAHAM O.H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests os insecticides. Entomology research division. v.66, n.1, p:130-133, 1973

FERREIRA, A. O. **Guia Pratico da Farmacia Magistral**. Pharmabooks. 1438 p., 2011

FURLONG, J; MARTINS, J.R. S.; PRATA, M.C.A. **Carrapato: Problemas e soluções**. Embrapa gado de leite. 2005

FURLONG, J.; SALES, R. D. O. Controle Estratégico de Carrapatos no Bovino de Leite: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene Sanitaria e Animal**. v.01, n.02, p:44 –72, 2007.

GALVÃO, E. L. GALVÃO, LOPES, E. Extração do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* J. com CO2 pressurizado. Natal: [s.n.], 2004.

GRAF, J.F., GOGOLEWSKI, R., LEACH-BING, N. SABATINI, G.A., MOLENTO, M.B., BORDIN, E.L., ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology** . v.129, p:427–442, 2004

GRISI L. , LEITE R.C., MARTINS J.R.S., BARROS A.T.M., 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.21, n125, p:8–10, 2014

HENTZ, S.M.; SANTIN, N.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella* sp. **Evidencia**. v.7, n. 2, p: 93-100, 2007

JALALI-HERAV, M.; MOAZENIA, R. S.; SERESHTIB, H. 2011. Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. **Journal of Chromatography A**. p: 2569–2576,2011.

JIANGA, Y.; WUA, N.; FUA, Y-J; WANGA, W.; LUO, M.; ZHAO, C-J; ZU, Y-G; ZU, Y-G; LIU, X-L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**. v.32, p:63–68, 2011

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**. v.5, n.2, p:120-132, 2010

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. 1ª ed. ed. [S.I.]: Manole Ltda, 1999.

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, R. M. Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.8, n.2, p:71-78, 2006

MARTINS, R. M.; GONZÁLEZ, F. H. D. Uso del aceite de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Panicoidideae) como acaricida frente a la garrapata *Boophilus microplus* Canestrini (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.9, n4, p:1-8, 2007

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**. v.26, n.2, p: 231-238, 2003

MERLINI, L.S.; YAMAMURA, M.H. Estudio in vitro da resistência de *BoophilusMicroplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do norte do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**. v.19, n.1, p:38-44, 1998

MICHELETTI, S. M. FB.; DIAS, N. S.; VALENTE, E. C. N.; SOUZA, L. A.; LOPES, D. O. P.; SANTOS, J. M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus(Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em

laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**. v.19, n.1, p:44-48, 2010

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

NERIO, L.S.; OLIVEIRO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**. v.101, p:372–378, 2010

NOGUEIRA, J.; VINTURELLE, R.; MATTOS, C.; TIETBOHL, L.A.C.; GUERRA, M; DA SILVA VAZ JUNIOR, I.; MOURÃO, S.C.; ROCHA, L. AND FOLLY, E. Acaricidal Properties of the Essential Oil From *Zanthoxylum tingoassuiba* (Rutaceae) Against *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae). **Journal Medical Entomol**. v.51, In press, 2014.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F.O. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.3, p:771-775, 2009

OLIVEIRA, W. A.; PEREIRA, F. O.; LUNA, G. C. D. G.; LIMA, I. O.; WANDERLEY, P. A.; LIMA, R. B.; LIMA, E. O. Antifungal Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor against *Candida Albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**. p: 433-441, 2011

OLIVO, C. J.; CARVALHO, N. M.; SILVA, J. H. S.; VOGEL, F. F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; AGNOLIN, C.A.; MOREL, A. F.; VIAU, L. V. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**. v.38, n.2, p:406-410, 2008

PEREIRA, J.R. Eficácia de carrapaticidas injetáveis no controle do carrapato dos bovinos na região do vale do paraíba, estado de são paulo. **Pesquisa & Tecnologia**. v.9, n.1, 2012

PIVOTO, F. L.; BUZZATTI, A.; KRAWCZAK, F. S.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; VOGEL, F. S. F. Ação acaricida in vitro de *Tropaelum majus* sob teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, p: 2141-2145, 2010

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.

POLITI, F. A. S.; FIGUEIRA, G. M.; ARAÚJO, A. M.; SAMPIERI, B. R.; MATHIAS, M. I. C.; SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; PIETRO, R. C. L. R. Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Parasites & Vectors**. v. 5, p:295-306, 2012.

POTARROYO S., J. H.; SOSSAI, S. **Alternativas para o controle de carrapato:**

**vacinas e medicamentos.** Dissertação. Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, [ano].

PRISTA, L. NOGUEIRA. **Tecnologia Farmacêutica.** 8.ed. Calouste. 784p., 1995

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; Souza, T.T.; Leite, B.S.; Lessa, N.M.N.; Bonjardim, L.R.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Antonioli, A.R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine.** v.15, p:619–624, 2008

RAYNAL, J.T.; SILVA, A.A.B.; SOUZA, T.J.; BAHIENSE, T.C.; MEYER, R.; PORTELA, R.W. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* from Bahia state North-Central region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria.** v.22, p: 71-77, 2013

RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Ciências Agrárias.** v.33, n.2, p:687-696, 2012

ROCHA, D.C.C. Conhecer o ciclo biológico do carrapato-do-boi ajuda o produtor a evitar perdas. 2011. Disponível em: <http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=3828>. Acesso em: 23 jun 2013

RODRÍGUEZ- ROJO, S.; VARONA, S.; NÚÑEZ, M.; COCERO, M.J. Characterization of Rosemary essential oil for biodegradable emulsions. **Industrial crops and products.** v.37, p: 137-140, 2012

SAAD, N.Y.; MULLER, C.D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal.* (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ffj.3165. 2013

SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, R. A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. Efeito *in vitro* do extrato de nim (*Azadirachta indica*) e óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Rhipicephalus* (*boophilus*) *microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria.** v.34, n.2, p: 111-115, 2012

SANTOS, F.C.C.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G. Effect of different concentrations of citronella oil and tincture on reproductive parameters of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *Microplus* *teleogins*. **Semina: Ciências Agrárias.** v.33, n.3, p:1141-1148, 2012

SANTOS, T. R. B.; FARIAS, N. A. R.; FILHO, N. A. C.; PAPPEN, F. G.; JUNIOR, I. S. V. Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v.29, n.1, 2009

SILVA, T. P. P. D.; MOREIRA, J. C.; PERES, F. Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira. **Ciências saúde coletiva.** v.17, n.2, 2012.

SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press, v. 1., 1991

SOUZA, A. P.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; KOLLING, A. Comparação da eficácia de carrapaticidas em teste a campo com o tempo de imersão in vitro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v.3, n.2, p: 131-134, 2004

SOUZA, A.P.; VEIGA, L.P.H.N.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; CARDOSO, C.P.; NUNES, A.P.O. Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de *rhhipicephalus(boophilus) microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.17, n.4, p: 242-245, 2008

STEFFENS, A.H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. Dissertação. Programa de pós-graduação de em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010

TAYLOR, M. A. Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**. v.161,p:253-268, 2001

THOMPSON, JUDITH E. **A practical guide to contemporary pharmacy practice**. 3.ed., 2009

TRINDADE, H. I., ALMEIDA, K. S., FREITAS, F. L.C. 2011. Tristeza parasitária bovina – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. v 9, n.16, 2011

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.12, 2013

WANY, A.; JHA, S.; NIGAM, V.K.; PANDEY, D.M. 2012. Chemical analysis and therapeutic uses of citronella oil from *cymbopogon winterianus*: a short review. . **International Journal of Advanced Research**. v.1, n.6, p: 504-521, 2013

ZERINGÓTA, V.; SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; FAZA, A. P.; CATUNDA-JUNIOR, 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**. DOI 10.1007/s00436-013-3434-z., 2013