

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Avaliação da combinação entre timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae).

Tatiane Pinheiro Lopes Novato

Juiz de Fora

2014

Tatiane Pinheiro Lopes Novato

Avaliação da combinação entre timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae).

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

Orientador: Prof. Dr. Erik Daemon

Co-orientador: Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Msc. Ralph Maturano

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Novato, Tatiane Pinheiro Lopes.

Avaliação da combinação entre timol, carvacrol e (E)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). / Tatiane Pinheiro Lopes Novato. -- 2014.

40 p. : il.

Orientador: Erik Daemon de Souza Pinto

Coorientador: Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2014.

1. antagonismo. 2. carrapato da orelha do cavalo. 3. sinergismo. 4. terpenos. I. Pinto, Erik Daemon de Souza, orient. II. Monteiro, Caio Márcio de Oliveira, coorient. III. Título.

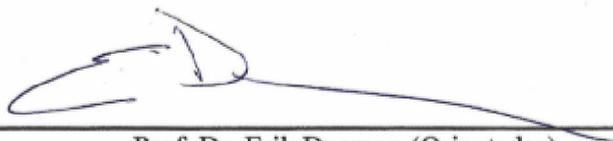
Tatiane Pinheiro Lopes Novato

Avaliação da combinação entre timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae).

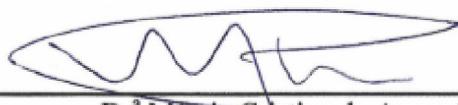
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 1 de outubro de 2014.

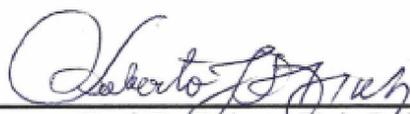
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Erik Daemon (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr.ª Márcia Cristina de Azevedo Prata
Pesquisadora Embrapa Pecuária Sudeste - Parasitologia



Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias
Universidade Federal de Juiz de Fora

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Erik Daemon, pela oportunidade, pelos conhecimentos compartilhados e pela sua amizade.

Aos meus co-orientadores Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro e Msc. Ralph Maturano, que me apoiaram em todo o decorrer do mestrado.

A todos do LAP, pelos bons momentos vividos e a ajuda nos trabalhos realizados.

A minha parceira e amiga de mestrado Laryssa, por todos os momentos vividos.

A minha amiga Tatiane Senra, que sempre me incentivou e me orientou.

Aos funcionários da Pós-Graduação, pela disposição.

Ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa, Gado de Leite, pelo fornecimento de equipamento para a realização dos experimentos.

Ao meu marido, Antônio Carlos e meu filho Rafael, pelo apoio, amor e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Aos meus sogros, pelo incentivo e carinho.

Ao Sr. Claudyr Araújo, que se empenhou na busca pelos carrapatos que foram utilizados nos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Sumário

Lista de tabelas	v
Lista de ilustrações	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1 Introdução	9
2 Revisão bibliográfica	11
2.1 Carrapatos	11
2.2 Controle de carrapatos com substâncias de origem vegetal	15
2.3 Associações das substâncias de origem vegetal	18
3 Material e métodos	20
3.1 Local do experimento e procedência dos carrapatos	20
3.2 Obtenção e diluição das substâncias	20
3.3 Teste de pacote de larvas	21
3.4 Análise de dados	22
4 Resultado	24
5 Discussão	28
6 Conclusão	32
7 Considerações Finais	33
8 Referências Bibliográficas	34
9 Anexo	39

Lista de Tabelas

Tabela 1. Doses letais de 50% (DL50) do timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas não ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*.....25

Tabela 2. Avaliação da combinação entre carvacrol, timol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum*.....26

Tabela 3. Avaliação da combinação entre carvacrol, timol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Dermacentor nitens*.....27

Lista de Ilustrações

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies do complexo <i>Amblyomma cajennense</i>	13
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Dermacentor nitens</i>	14
Figura 3. Fotos da montagem do teste de pacote de larvas realizado com larvas não ingurgitadas.....	22
Quadro 1 – Adaptação das categorias qualitativas definidas por Chou (2006) para descrição do efeito combinado de diferentes substâncias e seus respectivos valores de índice de combinação (IC).....	23

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da combinação entre timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*, bem como realizar o primeiro cálculo da concentração letal de 50% (CL₅₀) para as espécies alvo e propor adaptações para as categorias qualitativas definidas por Chou (2006) para avaliação de combinações dos compostos ativos. O teste foi realizado por meio da técnica de pacote de larvas modificado e a mortalidade foi avaliada após 24h. Para a determinação da Concentração Letal 50 (CL₅₀) as substâncias foram testadas nas concentrações de 0,62; 1,25; 2,5; 3,75; 5,0 e 7,5 mg/ml, com exceção do teste com o timol sobre larvas de *A. sculptum* (0,62; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/ml) e nas concentrações de 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/ml sobre larvas de *D. nitens*. Após a determinação da CL₅₀, cada substância foi avaliada separadamente e combinada com outra substância na proporção de 1:1 nas concentrações da CL₅₀, 1/2 e 1/4 da CL₅₀. Os grupos foram mantidos em câmara climatizada (27±1°C e UR >80±10%). Para *A. sculptum*, o menor valor de CL₅₀ foi obtido para o (*E*)-cinamaldeído 1,40, seguido do timol 2,04 e carvacrol 3,49 mg/ml, sendo observado o mesmo para *D. nitens*, com valores de 1,68, 2,17 e 3,33 mg/ml, respectivamente. Na avaliação das associações entre as substâncias, para larvas de *A. sculptum*, apenas a combinação entre carvacrol e timol (CL₅₀) e carvacrol e (*E*)-cinamaldeído (1/4) apresentaram efeito sinérgico moderado, as demais misturas demonstraram efeito aditivo ou antagônico. Já para larvas de *D. nitens* as combinações entre timol e carvacrol (1/2 e CL₅₀) apresentaram efeito sinérgico e as demais combinações apresentaram efeito aditivo e antagônico. Conclui-se que as combinações de timol e carvacrol (CL₅₀) têm sinergismo moderado para larvas *A. sculptum* e timol e carvacrol (1/2 e CL₅₀) tem efeito sinérgico para *D. nitens*.

Palavras-chave: antagonismo, carrapato da orelha do cavalo, sinergismo, terpenos.

Abstract

The objective of this study was to assess the paired combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* and *Dermacentor nitens* larvae, as well as to carry out the first calculation of the 50% lethal concentration (LC₅₀) for the target species and propose adaptations to the qualitative categories defined by Chou (2006) for assessment of active compounds combinations. The effects of the treatments were evaluated by the modified larval packet test, to measure the mortality after 24 h. To determine the LC₅₀, the substances were tested individually at concentrations of 0.62, 1.25, 2.5, 3.75, 5.0 and 7.5 mg/ml on *A. sculptum* larvae, except for the test with thymol (0.62, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg/ml). For *D. nitens*, the concentrations tested were 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0 and 7.5 mg/ml for all substances. After determining the LC₅₀, each substance was evaluated separately and in combination with another substance in a 1:1 proportion at the LC₅₀ concentration and 1/2 and 1/4 of the LC₅₀. The groups were kept in a climate-controlled chamber (27±1 °C and RH >80±10%). For *A. sculptum*, the lowest LC₅₀ value was obtained for (*E*)-cinnamaldehyde (1.40), followed by thymol (2.04) and carvacrol (3.49 mg/ml). The same order of effectiveness was observed for *D. nitens*, with values of 1.68, 2.17 and 3.33 mg/ml, respectively. In the evaluation of the associations of substances against *A. sculptum* larvae, only the combinations between carvacrol and thymol (LC₅₀) and carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde (1/4 LC₅₀) presented synergetic effect. The other mixtures demonstrated additive or antagonistic effect. In turn, for *D. nitens* larvae the combinations between thymol and carvacrol (LC₅₀ and 1/2 LC₅₀) presented synergetic effect, while the others presented additive or antagonistic effect. Therefore, it can be

concluded that combinations of thymol and carvacrol (LC_{50}) have a moderate synergetic effect against *A. sculptum* larvae and thymol combined with carvacrol (LC_{50} and $1/2 LC_{50}$) has a synergetic effect against *D. nitens* larvae.

Keywords: antagonism, tropical horse tick, synergy, terpenes.

1 Introdução

O Brasil possui cerca de 65 espécies de carrapatos (MARTINS *et al.*, 2014) e, destas, *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) se destacam como espécies de grande importância para a saúde pública e animal (GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

Amblyomma sculptum encontra-se distribuído na região nordeste (Pernambuco, Piauí), região centro oeste, sudeste, um único estado da região sul (Paraná), norte da Argentina e também em algumas áreas da Bolívia e Paraguai (NAVA *et al.*, 2014). Esse ixodídeo tem os equídeos e capivaras como seus hospedeiros preferenciais; entretanto, sua baixa especificidade parasitária, principalmente dos estágios imaturos, permite que esse carrapato seja encontrado parasitando outros animais como cervos, bovinos, aves, roedores e canídeos, podendo parasitar ainda humanos (OLIVEIRA, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004). A picada dolorosa pode ocasionar reações inflamatórias, febre e estresse, tanto no homem quanto nos animais (OLIVEIRA, 2004). Além disso, é vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa (GUEDES *et al.*, 2005; LABRUNA & MACHADO, 2006).

Dermacentor nitens pode ser encontrado desde o sul da Flórida e do Texas até o norte da Argentina (BORGES & LEITE, 1993). No Brasil é conhecido como "carrapato da orelha do cavalo", por parasitar principalmente o pavilhão auricular de equinos; entretanto, em grandes infestações, pode ser encontrado em outros locais do corpo do animal (GUIMARÃES *et al.*, 2001; GUGLIELMONE *et al.*, 2006). Pode provocar grandes perdas econômicas para criadores devido à espoliação sanguínea, irritação, estresse, queda no desempenho dos animais, predisposição a miíases e infecções bacterianas (GUGLIELMONE *et al.*, 2006; LABRUNA & MACHADO, 2006), além de ser responsável pela transmissão da *Babesia caballi*, agente etiológico da babesiose equina (ROBY & ANTHONY, 1963).

A utilização de carrapaticidas sintéticos é o método mais empregado para o controle desses carrapatos, mas o uso sem critérios técnicos pode causar intoxicação em humanos e animais, além da contaminação do solo e recursos hídricos (BORGES *et al.*, 2011). Por esse motivo, torna-se importante o desenvolvimento de novas alternativas para o controle desses carrapatos, que sejam mais seguras aos animais, homem e ao meio ambiente (CHAGAS, 2004; BORGES *et al.*, 2011).

O uso de substâncias de origem vegetal tem sido apontado como uma alternativa promissora no controle desses ectoparasitos, por apresentarem propriedades biocidas (REGNAULT-ROGER & PHILOGENE, 2008). Timol e carvacrol são monoterpenos encontrados principalmente em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae e Verbenacea, que possuem atividade carrapaticida comprovada contra diferentes espécies de carrapatos (CETIN *et al.*, 2009; CETIN *et al.*, 2010; COSKUN *et al.*, 2008; DOLAN *et al.*; 2009; DAEMON *et al.*, 2009; DAEMON *et al.*, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011; NOVELINO *et al.*, 2007; SENRA *et al.*, 2013 a, b). O (*E*)-cinamaldeído é um fenilpropanóide presente no óleo essencial de plantas do gênero *Cinnamomum* que já teve sua atividade carrapaticida evidenciada para *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), *D. nitens* (SENRA *et al.*, 2013a), *A. cajennense sensu latu* e *Rhipicephalus sanguineus sensu latu* (Latreille, 1806) (SENRA *et al.*, 2013b).

Estudos tem evidenciado que a associação entre substância de origem vegetal como terpenos pode apresentar efeito sinérgico, antagônico ou aditivo sobre diferentes organismos alvo, como bactérias, nematoides e insetos, (DIDRY *et al.*, 1994; NTALLI *et al.*, 2011; GALLARDO *et al.*, 2012); porém, ainda não foram realizados testes com esse enfoque sobre carrapatos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação combinada entre timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas não ingurgitadas de *A. sculptum* e *D. nitens*.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Carrapatos

Amblyomma sculptum e *Dermacentor nitens* são ectoparasitos de grande importância para saúde pública e animal por serem responsáveis por diversos danos provocados em seus hospedeiros, como estresse, espoliação sanguínea, predisposição a miíases, infecções bacterianas, além de ser responsável pela transmissão de agentes infecciosos (GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

Há muito tempo, acreditava-se que *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, que se encontrava amplamente distribuído desde o sul do Texas até o norte da Argentina, era uma única espécie. Estudos recentes que realizaram análises biológicas, morfológicas e moleculares comprovaram que *Amblyomma cajennense* sensu lato é um complexo de seis espécies, sendo que três espécies foram descritas (*Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp., *Amblyomma patinoi* n. sp.) e duas espécies foram redescritas (*Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Amblyomma mixtum* Koch, 1844) (NAVA *et al.*, 2014).

Amblyomma sculptum encontra-se distribuído desde as regiões peri-amazônicas do Brasil, abrangendo os estados do Pernambuco, Piauí, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, até o norte da Argentina, sendo encontrado também em áreas na Bolívia e Paraguai (Nava *et al.*, 2014). É popularmente conhecido como “carrapato-estrela” e pode ser encontrado frequentemente infestando equídeos, que são seus hospedeiros preferenciais, porém devido a sua baixa especificidade, pode parasitar cervos, bovinos, canídeos, aves, roedores e seres humanos. Dessa forma, *A. sculptum* é capaz de sobreviver e completar o seu ciclo de vida em regiões

onde não existam equídeos, parasitando outras espécies (OLIVEIRA, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004).

A picada dolorosa deste carrapato pode ser responsável por gerar reações inflamatórias, febre e estresse, tanto no homem quanto nos animais. Nos animais, ainda existem outros prejuízos que decorrem desse parasitismo, pois pode ocorrer significativa queda na produtividade e danos ao couro (OLIVEIRA, 2004). As infestações por este carrapato ocasionam perdas econômicas importantes, em decorrência da queda de produtividade dos animais e dos gastos com o uso de produtos carrapaticidas (PRATA *et al.*, 1996).

Esse carrapato também possui grande importância na saúde pública, pois na América do Sul é o vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre maculosa Brasileira (FONSECA & MARTINS, 2007). Esta doença é a mais grave do grupo das rickettsioses no mundo (LABRUNA *et al.*, 2008), sendo considerada um dos agentes mais letais para os humanos, perdendo somente para o vírus da raiva. Quando não tratada com antibióticos específicos no início da infecção, o percentual de óbitos pode ser superior 80%. A doença apresenta sintomas semelhantes a outras doenças e isso pode dificultar o diagnóstico (LABRUNA & MACHADO, 2006).

O ciclo parasitário deste ixodídeo é de três hospedeiros, necessários para o desenvolvimento de suas diferentes fases (larva, ninfa e adulto); as mudas de larva para ninfa e ninfa para adulto ocorrem no ambiente, assim como o processo de postura das fêmeas ingurgitadas e o período de incubação. A dinâmica populacional desse carrapato na região Sudeste caracteriza-se pela predominância de larvas e ninfas, tanto na pastagem quanto parasitando animais e humanos, nos meses em que as temperaturas médias são mais baixas. As larvas são predominantes nos meses de abril a julho e a infestação por ninfas é maior nos meses entre julho a outubro. Já os adultos predominam nos meses de outubro a março. Dessa

forma, esse carrapato consegue completar apenas uma geração por ano na região Sudeste (LABRUNA *et al.*, 2002).



Figura 1 – Distribuição geográfica das espécies do complexo *Amblyomma cajennense*. † *Amblyomma tonelliae* n. sp.; ¥ *Amblyomma interandinum* n. sp.; # *Amblyomma patinoi* n. sp.; ■ *Amblyomma mixtum*; 0 *Amblyomma sculptum*. X, registro de *Amblyomma sculptum* no Departamento de Beni, Bolívia, localidade desconhecida.

Dermacentor nitens encontra-se distribuído desde o sul da América do Norte (Texas e da Flórida), México, América Central e América do Sul (exceto Uruguai e Chile) (BORGES & LEITE, 1993). É carrapato de um hospedeiro, já que larvas, ninfas e adultos sofrem muda em cima do mesmo hospedeiro (GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

Têm os equinos como hospedeiros preferenciais, parasitando preferencialmente a região do pavilhão auricular e do divertículo nasal, porém em grandes infestações pode ser

encontrado em todo o corpo do animal, principalmente na base da crina e região perineal (GUIMARÃES *et al.*, 2001; GUGLIELMONE *et al.*, 2006). O seu parasitismo causa inúmeros prejuízos para o animal, como espoliação sanguínea, irritação, queda na sua produtividade e predisposição para instalação de miíses e infecções bacterianas secundárias, causando grandes perdas econômicas aos criadores (OLIVEIRA, 2004).

Esse ixodídeo é o vetor da *Babesia caballi*, agente causador da babesiose equina, uma enfermidade febril, que em sua forma aguda caracteriza-se pelo surgimento de febre, anemia e icterícia (BOTTEON *et al.*, 2005). O controle de carrapatos geralmente é feito com substâncias químicas que são tóxicas aos animais, ao homem e ao ecossistema (CHAGAS, 2004). Com o objetivo de minimizar a utilização dessas substâncias, o interesse no uso de produtos de origem vegetal vem aumentando a cada dia, já que não são tóxicos para os hospedeiros e vem demonstrando uma atividade inseticida bastante eficaz.



Figura 2 – Distribuição geográfica de *Dermacentor nitens*

2.2 Controle de carrapatos com substâncias de origem vegetal

O uso de extratos vegetais tem sido uma excelente alternativa no controle de pragas, tendo em vista principalmente a grande diversidade vegetal brasileira, cuja flora é uma das mais ricas do mundo (JACOBY *et al.*, 2002). A busca por novas alternativas de controle de carrapatos têm aumentado cada vez mais, devido ao uso sem critérios técnicos de carrapaticidas sintéticos, que tem contribuído para a intoxicação de animais e de humanos, contaminação do solo e de recursos hídricos (BORGES *et al.*, 2011). O interesse por essas substâncias esta relacionado à sua baixa toxicidade aos mamíferos, a curta persistência no ambiente, sendo que muitas delas constituem-se em complexos químicos que podem limitar a seleção de indivíduos resistentes (MIRESMAILLI *et al.*, 2006).

As substâncias farmacologicamente ativas obtidas das plantas estão geralmente relacionadas aos metabólitos secundários que elas produzem (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Os metabólitos secundários geralmente têm papel ecológico como atrativo para polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou servem como defensores químicos contra microrganismos e insetos (CHAGAS, 2004). Podem ser obtidos através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (BALANDRIN *et al.*, 1985).

Há diversos trabalhos que demonstram a ação de extratos vegetais e óleos essenciais sobre diferentes espécies de carrapatos que tem sua atividade carrapaticida comprovada (CETIN *et al.*, 2009; CETIN *et al.*, 2010; COSKUN *et al.*, 2008; DOLAN *et al.*; 2009; DAEMON *et al.*, 2009; DAEMON *et al.*, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011; NOVELINO *et al.*, 2007; SENRA *et al.*, 2013 a, b).

O timol é um monoterpeno volátil, refringente, de odor característico, comum num grande número de plantas aromáticas presente em plantas da família Lamiaceae e

Verbenaceae (GIRI & MUKERJI, 2002). A atividade desta substância foi comprovada por NOVELINO *et al.* (2007) ao avaliarem o timol, mentol, ácido salicílico e salicilato de metila, sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888); neste estudo, das quatro substancias testadas, apenas o timol causou mortalidade de 100% na concentração de 1%. DAEMON *et al.* (2009) avaliarem a atividade carrapaticida do timol sobre larvas não ingurgitadas e ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu latu (Latreille, 1808), encontrando mortalidade de 37,7% para larvas não ingurgitadas e 100% para larvas ingurgitadas na concentração de 2%. Em estudos realizados por MONTEIRO *et al.* (2009) com ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l., a mortalidade de 100% pode ser observada na concentração de 0,5%, mas para os testes com fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. a melhor eficácia para controle não ultrapassou 41%.

A eficácia do timol também foi comprovada por MONTEIRO *et al.* (2010) ao analisarem sua atividade sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Foi possível verificar a eficácia acima de 95% na concentração de 1%, enquanto estudos realizados com larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* sensu latu confirmam a eficiência do timol, pois desde a concentração de 2,5 mg/ml a mortalidade foi verificada para os dois estágios (MENDES *et al.*, 2011). SENRA *et al.* (2013b) também constataram a eficiência do timol para larvas e ninfas de *A. cajennense* s. l. e ninfas de *R. sanguineus* s. l., com mortalidades de 100% na concentração de 10µl/ml, para ambos os estágios. SCORALICK *et al.* (2012) também comprovaram a ação deletéria do timol sobre larvas de *R. microplus*, na solução etanólica (água destilada + etanol) na menor concentração (2,5 mg/ml), com mortalidade de 94%.

LAGE *et al.* (2013) avaliaram a atividade carrapaticida do óleo essencial de *Lippia triplinervis* sobre larvas de *R. microplus* e verificaram a eficácia deste óleo desde a menor concentração. Eles atribuíram esse fato aos componentes majoritários presentes no óleo, que eram timol e carvacrol. O mesmo ocorreu nos estudos realizados por GOMES *et al.* (2012)

com larvas de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) e larvas e fêmeas de *R. microplus* ao avaliar a atividade do óleo essencial de *Lippia sidoides*, sendo observado, também, o timol como o principal constituinte desse óleo essencial. A mortalidade observada nesse estudo, na concentração de 10 µl/ml, foi de 100%.

O carvacrol é um monoterpeneo presente em plantas da família Lamiaceae e Verbenaceae, que também tem sua atividade carrapaticida comprovada. COSKUN *et al.* (2008) comprovaram a atividade carrapaticida do carvacrol quando testaram o óleo essencial de *Origanum onites* L. (Lamiaceae), que tem o carvacrol como componente majoritário, em adultos de *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, 1940, sendo observada mortalidade acima de 90% na concentração de 12,5% após 24 horas. CETIN *et al.* (2009) também utilizaram adultos de *R. turanicus* para testar o óleo essencial de *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) e em seus resultados encontraram que, após duas horas, a menor concentração (1µl/L) atingiu mortalidade acima de 50%. Esta mortalidade foi atribuída pelos autores pelo fato do carvacrol estar presente nos óleos essenciais em maior quantidade. Em estudos realizados em campo, DOLAN *et al.* (2009) verificaram a atividade carrapaticida do carvacrol em *Amblyomma americanum* Linnaeus, 1758 e *Ixodes scapularis* Say, 182, após borrifar a substância testada na concentração de 5% sobre a vegetação.

CETIN *et al.* (2010) avaliaram a atividade acaricida do óleo essencial de *Satureja thymbra* L. e seus componentes principais carvacrol e γ -terpinene em adultos de *Hyalomma marginatum* Koch, 1844, sendo observado de 100% mortalidade após 24 horas. O mesmo foi constatado por MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.* (2011) com larvas de *R. microplus* ao testarem o óleo de *Lippia graveolens* (Verbenaceae), que também possui o carvacrol como um de seus principais componentes. Em estudos realizados por SENRA *et al.* (2013 a,b), a atividade carrapaticida do carvacrol foi igualmente comprovada para larvas de *R. microplus* e *D. nitens*, larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* s.l. e *R. sanguineus* s.l, com

mortalidades de 100%, 100%, 45%, 64,6%, 100% e 100%, respectivamente, na concentração de 2,5µl/ml.

O (*E*)-cinamaldeído é um fenilpropanóide presente em plantas do gênero *Cinnamomum*, que teve sua atividade carrapaticida evidenciada apenas por SENRA *et al.* (2013a,b), quando avaliaram a eficácia dessa substância sobre larvas de *R. microplus*, *D. nitens*, *A. cajennense* s. l. e *R. sanguineus* s. l., sendo observada mortalidade de 99,2%, 98.5%, 81,6% e 100%, respectivamente, sendo esse o único trabalho encontrado que avaliou a ação do (*E*)-cinamaldeído sobre carrapatos.

2.3 Associações das substâncias de origem vegetal

Estudos com a combinação de substâncias de origem vegetal têm sido realizados com artrópodes, bactérias e nematoides, apresentando efeito sinérgico, antagônico ou aditivo (DIDRY *et al.*, 1994; NTALLI *et al.*, 2011; GALLARDO *et al.*, 2012). Quando o efeito da associação entre as substâncias for sinérgico, isso indicará que a ação combinada das substâncias é maior que a soma dos agentes individuais. Já o antagonismo caracteriza-se pela diminuição na atividade biológica dos componentes da mistura quando comparada à atividade da substância isolada. Quando duas substâncias apresentam um efeito aditivo, isso significa que a ação combinada das substâncias é a soma dos agentes individuais (NTALLI *et al.*, 2011).

DIDRY *et al.* (1994) avaliaram a ação do timol, carvacrol, eugenol e (*E*)-cinamaldeído, em combinação, sobre bactérias, verificando o efeito sinérgico em algumas combinações. NTALLI *et al.* (2011) observaram em seus trabalhos que a interação entre terpenos sobre o nematoide *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 (Tylenchida: Heteroderidae) apresentava efeito sinérgico em algumas das combinações. O mesmo foi

observado por PAVELA (2010) em testes com larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833), ao avaliar a combinação de timol e carvacrol e também constatado por LIMA *et al.* (2011) com *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758). A ação sinérgica também esteve presente nos estudos realizados por YE *et al.* (2013) com as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus haemolyticus*, na associação entre carvacrol e (*E*)-cinamaldeído, sendo o mesmo efeito foi verificado por PAVELA (2014) em *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833). Existem muitos estudos sobre a associação de substâncias contra bactérias e outros grupos de artrópodes, porém ainda não foram realizados trabalhos que avaliem o efeito da combinação pareada entre substância de origem vegetal sobre carrapatos.

3 Material e métodos

3.1 Local do experimento e procedência dos carrapatos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. As larvas de *A. sculptum* e *D. nitens* foram obtidas por meio da ovipostura de fêmeas ingurgitadas coletadas manualmente em equinos naturalmente infestados, sem contato recente com carrapaticidas, no município de Descoberto, Minas Gerais, Brasil. Os espécimes de *A. sculptum* foram identificados para confirmação da espécie, de acordo com a nova proposta taxonômica preconizada por Nava *et al.* (2014). As larvas das duas espécies submetidas aos testes tinham entre 15 a 25 dias de idade.

3.2 Obtenção e diluição das substâncias

O carvacrol e (*E*)-cinamaldeído foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®. Os cristais de timol foram obtidos por intermédio da empresa Henrifarma Químicos e Farmacêuticos LTDA. As substâncias foram adquiridas comercialmente com certificado de grau de pureza de 99%. Para a solubilização das mesmas foi utilizado etanol 70°GL, solvente que apresenta baixa toxicidade para larvas não ingurgitadas dessas espécies (Resende *et al.*, 2012).

A escolha das substâncias utilizadas está relacionada com estudos anteriores que comprovam a atividade carrapaticida sobre diferentes espécies de carrapatos (Senra *et al.*, 2013a, Senra *et al.*, 2013b).

3.3 Teste de pacote de larvas

Para avaliação do efeito das substâncias sobre os carrapatos, foi utilizado o teste de pacote de larvas modificado por MONTEIRO *et al.* (2012), em que aproximadamente 100 larvas foram colocadas no centro de papel de filtro com dimensões de 6x6 cm e na sequência esses papéis foram dobrados ao meio e tiveram as bordas vedadas por cliques. Posteriormente, cada lado externo do papel de filtro foi umedecido homogeneamente com 90 µl das soluções a serem testadas. As unidades experimentais ficaram acondicionadas em câmara climatizada (27°C e UR>80%), e a avaliação da mortalidade foi feita após 24h, quando foi observado o percentual de larvas vivas e mortas. O percentual de mortalidade foi obtido pela seguinte fórmula:

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

Para a determinação da Concentração Letal 50 (CL₅₀) sobre larvas de *A. sculptum*, o timol foi testado nas concentrações de 0,62; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/ml, enquanto o carvacrol e (*E*)-cinamaldeído foram testados nas concentrações de 0,62; 1,25; 2,5; 3,75; 5,0 e 7,5 mg/ml, sendo feitas 10 repetições por grupo. Para larvas de *D. nitens*, foram testadas as concentrações de 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/ml para as três substâncias. As concentrações foram definidas com base nos resultados já publicados a respeito da atividade carrapaticida dessas substâncias (Daemon *et al.*, 2012 ; Senra *et al.*, 2013a, b). Também foi formado um grupo controle, tratado com etanol 70°GL.

Após a determinação da CL₅₀, cada substância foi avaliada separadamente e combinada com outra substância na proporção de 1:1 nas concentrações da CL₅₀, 1/2 e 1/4 da CL₅₀, com 10 repetições para cada tratamento. O grupo controle foi tratado apenas com o

solvente (etanol 70°GL). Todos os grupos foram mantidos em diferentes câmaras climatizadas com temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $80\pm 10\%$.

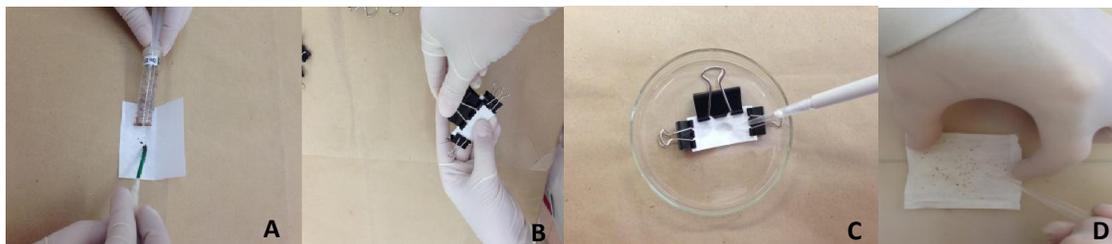


Figura 1. Teste de pacote de larvas (A) onde aproximadamente 100 larvas foram colocadas no interior de papéis de filtro (6x6cm), esses foram dobrados ao meio e as extremidades vedadas com clips (B). Após o fechamento, com a utilização de pipeta cada lado externo do envelope foi umedecido com $90\ \mu\text{l}$ das soluções a serem testadas (C). Após 24h, realizou a leitura das larvas vivas e mortas (D).

3.4 Análise de dados

Para o cálculo das doses letais foi feita a análise Probit, no programa POLOPC (FINNEY, 1971). A análise da ação combinada entre as substâncias foi realizada por meio do cálculo do Índice de Combinação (IC) obtido com a utilização do programa CompuSyn® versão 1.0 (CHOU & MARTIN, 2005). A análise qualitativa das interações entre as substâncias foi adaptada do modelo preconizado por CHOU (2006), que classifica as interações de acordo com os intervalos do IC (Quadro 1). Tal adaptação foi proposta porque os estudos de CHOU (2006) abordam o efeito de substâncias sobre bactérias, células tumorais e vírus, que permitem um detalhamento maior sobre os efeitos da combinação daquelas substâncias. Em relação a artrópodes, a análise ora proposta facilitaria a interpretação dos resultados obtidos.

Quadro 1 – Adaptação das categorias qualitativas definidas por Chou (2006) para descrição do efeito combinado de diferentes substâncias e seus respectivos valores de índice de combinação (IC).

Descrição original (Chou, 2006)	Intervalos do índice de combinação	Descrição adaptada
Sinergismo muito forte	<0.1	Sinergismo
Forte sinergismo	0.1–0.3	
Sinergismo	0.3–0.7	
Sinergismo moderado	0.7–0.85	Sinergismo moderado
Ligeiramente sinérgico	0.85–0.90	
Aditivo	0.90–1.10	Aditivo
Ligeiramente antagônico	1.10–1.20	Antagonismo moderado
Antagonismo moderado	1.20–1.45	
Antagonismo	1.45–3.3	Antagonismo
Forte antagonismo	3.3–10	
Antagonismo muito forte	>10	

4 Resultados

Os valores de CL_{50} das substâncias testadas são apresentados na tabela 1. Nos testes realizados com larvas de *A. sculptum* e *D. nitens*, a substância que apresentou o menor valor da CL_{50} foi (*E*)-cinamaldeído, sendo verificados valores de 1,40 e 1,68 mg/ml, respectivamente, seguida do timol (2,04 e 2,17 mg/ml) e carvacrol (3,49 e 3,43 mg/ml).

Das nove combinações realizadas com larvas de *A. sculptum*, apenas as associações entre carvacrol e timol (CL_{50}) e carvacrol e (*E*)-cinamaldeído (1/4 da CL_{50}) apresentaram sinergismo moderado. As concentrações abaixo exibiram efeito aditivo. Em contra partida, as combinações pareadas que tinham o (*E*)-cinamaldeído exibiram efeito antagônico, com exceção da combinação de carvacrol e (*E*)-cinamaldeído (1/4 da CL_{50}) (Tabela 2).

Para as combinações realizadas sobre larvas de *D. nitens*, timol e carvacrol, nas concentrações de 1/2 da CL_{50} e CL_{50} , apresentaram efeito sinérgico e efeito aditivo na concentração de 1/4 da CL_{50} . O efeito antagônico pode ser observado em todas as combinações e concentrações de carvacrol e (*E*)-cinamaldeído, além do timol e (*E*)-cinamaldeído (Tabela 3). De todas as combinações realizadas, a associação de carvacrol e timol foi a que apresentou o melhor efeito sinérgico para as duas espécies (Anexo 1). Não foi observado mortalidade nos grupos controle.

Tabela 1 – Concentrações letais de 50% (CL₅₀) do timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de não ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*.

Espécie	Compostos	CL₅₀ (mg/ml)	Intervalo de confiança (95%)	Slope ± DP
<i>Amblyomma sculptum</i>	Carvacrol	3,49	3,18-3,82	5,03±0,39
	Timol	2,04	1,76-2,37	2,99±0,19
	(<i>E</i>)-cinamaldeído	1,40	1,24-1,57	4,64±0,33
<i>Dermacentor nitens</i>	Carvacrol	3,33	2,87-3,86	3,05±0,22
	Timol	2,17	1,92-2,45	4,39±0,32
	(<i>E</i>)-cinamaldeído	1,68	1,47-1,92	3,77±0,26

Tabela 2 – Avaliação da combinação entre carvacrol, timol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum*

Substância A	Substância B	Fração da CL ₅₀	Concentração A + B (mg/ml)	Mortalidade Larval (%)				
				Substâncias não associada		Combinação		
				A	B	A+B	IC	Efeito CompuSyn Modificado
Carvacrol	Timol	1/4	0,87+0,51	1,1±1,45	0±0	10,47±6,70	1.01	Aditivo
Carvacrol	Timol	1/2	1,74+1,02	14,10±6,57	2,81±2,87	58,31±33,51	1.09	Aditivo
Carvacrol	Timol	CL ₅₀	3,5 + 2,04	89,15±7,14	48,63±18,15	99,51±1,26	0.79	Sinergismo moderado
Carvacrol	(<i>E</i>)-cinamaldeído	1/4	0,87+0,35	1,1±1,45	1,54±1,04	14,08±13,32	0.85	Sinergismo moderado
Carvacrol	(<i>E</i>)-cinamaldeído	1/2	1,74+0,7	14,10±6,57	0,88±0,90	19,78±17,43	1.50	Antagonismo
Carvacrol	(<i>E</i>)-cinamaldeído	CL ₅₀	3,5+1,4	89,15±7,14	37,35±18,96	65,38±36,62	1.76	Antagonismo
Timol	(<i>E</i>)-cinamaldeído	1/4	0,51+0,35	0±0	1,54±1,04	0±0	4.30	Antagonismo
Timol	(<i>E</i>)-cinamaldeído	1/2	1,02+0,7	2,81±2,87	0,88±0,90	2,14±1,61	2.88	Antagonismo
Timol	(<i>E</i>)-cinamaldeído	CL ₅₀	2,04+1,4	48,63±18,15	37,35±18,96	16,68±8,52	2.54	Antagonismo

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

Tabela 3 – Avaliação da combinação entre carvacrol, timol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Dermacentor nitens*.

Substância A	Substância B	Fração da CL ₅₀	Concentração A+B (mg/ml)	Mortalidade Larval (%)				Efeito CompuSyn Modificado
				Substâncias não associadas		Combinação		
				A	B	A+B	IC	
Carvacrol	Timol	1/4	0,83+0,54	5,91±3,60	0,93±1,51	9,41±9,07	1.00	Aditivo
Carvacrol	Timol	1/2	1,66+1,08	9,87±3,55	3,68±4,76	43,94±13,71	0.54	Sinergismo
Carvacrol	Timol	CL ₅₀	3,33+2,17	28,45±10,57	34,98±15,84	100±0	0.07	Sinergismo
Carvacrol	(<i>E</i>)- cinamaldeído	1/4	0,83+0,42	5,91±3,60	1,84±3,01	3,59±4,61	2.00	Antagonismo
Carvacrol	(<i>E</i>)- cinamaldeído	1/2	1,66+0,84	9,87±3,55	8,27±5,21	11,70±7,57	2.01	Antagonismo
Carvacrol	(<i>E</i>)- cinamaldeído	CL ₅₀	3,33+1,68	28,45±10,57	55,82±19,61	52,68±19,85	1.37	Antagonismo
Timol	(<i>E</i>)- cinamaldeído	1/4	0,54+0,42	0,93±1,51	1,84±3,01	2,17±2,37	1.65	Antagonismo
Timol	(<i>E</i>)- cinamaldeído	1/2	1,08+0,84	3,68±4,76	8,27±5,21	3,33±4,06	2.82	Antagonismo
Timol	(<i>E</i>)- cinamaldeído	CL ₅₀	2,17+1,68	34,98±15,84	55,82±19,61	47,29±12,34	1.57	Antagonismo

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

5 Discussão

Investigações sobre o potencial de substâncias derivadas de plantas para o controle de carrapatos tem aumentado nos últimos anos (BORGES *et al.*, 2011), devido às vantagens que proporciona com relação aos produtos químicos como: baixa toxicidade aos mamíferos e curta persistência no ambiente (MIRESMAILLI *et al.*, 2006). E uma série de substâncias de origem vegetal tem apresentado atividade sobre diferentes espécies de carrapatos, demonstrando potencial para o desenvolvimento de carrapaticidas. No entanto, esse é o primeiro estudo que avaliou o efeito da associação entre monoterpenos (timol, carvacrol) e fenilpropanóide (*E*-cinamaldeído) sobre esses ixodídeos.

Nos resultados de determinação da CL₅₀ das substâncias testadas sobre as larvas de *A. sculptum* e *D. nitens*, o (*E*)-cinamaldeído foi a substância que apresentou maior atividade, seguido do timol e carvacrol. A atividade dessas substâncias sobre larvas desses carrapatos já tinha sido reportada em outros estudos disponíveis na literatura (DAEMON *et al.*, 2012; SENRA *et al.*, 2013 a, b), entretanto, nesses estudos, essas substâncias causaram elevada mortalidade (> 80%) desde as menores concentrações testadas, não sendo possível calcular os valores de CL₅₀, sendo esse o primeiro estudo que reporta os valores de CL₅₀ dessas substâncias sobre larvas desses ixodídeos. Com relação a ordem de atividade e eficácia, SENRA *et al.* (2013b) também verificaram que o (*E*)-cinamaldeído foi a substância mais ativa para larvas de *A. cajennense* s.l., seguido pelo timol e carvacrol. Em estudos realizados por DIDRY *et al.* (1994) com bactérias do gênero *Streptococcus* e *Prevotella*, o (*E*)-cinamaldeído também foi a substância que apresentou maior atividade, seguido do timol e por último o carvacrol. Porém FRIEDMAN *et al.* (2002) ao avaliar o efeito bactericida de óleos essenciais sobre *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella entérica*, observaram que o carvacrol apresentou maior atividade, seguido do (*E*)-cinamaldeído e timol. Tais diferenças nos resultados

apresentados, para aqueles encontrados na literatura indicam que os organismos podem apresentar diversas respostas às diferentes substâncias de origem vegetal.

Comparando a atividade de cada substância para as duas espécies de carrapatos avaliadas, foi observado que *A. sculptum* e *D. nitens* apresentaram sensibilidade semelhante para o (*E*)-cinamaldeído, timol e carvacrol, sendo observados valores de CL₅₀ próximos, e sobreposição dos intervalos de confiança. DAEMON *et al.* (2012) avaliaram a atividade do timol em solução hidroetanólica sobre larvas de *R. sanguineus* e *D. nitens* e também verificaram que essas duas espécies de carrapatos apresentaram sensibilidade similar para esse monoterpene quando testadas as concentrações de 10, 15 e 20 µl/ml, sendo verificada mortalidade de 96.7, 95.9, 98.1% e 90.2, 90.3, 99.5%, respectivamente.

Com relação as combinações entre timol e carvacrol, foi observado sinergismo moderado sobre larvas de *A. sculptum* e sinergismo para larvas de *D. nitens* utilizando a concentração da CL₅₀. A ação sinérgica obtida a partir da combinação entre timol e carvacrol já foi relatada para diferentes organismos como bactérias, nematoide (DIDRY *et al.*, 1994; NTALLI *et al.*, 2011); e também para outros artrópodes, como coleópteros (LIMA *et al.*, 2011) e lepidópteros (PAVELA *et al.*, 2010). LIMA *et al.* (2011) observaram efeito sinérgico na interação entre timol e carvacrol contra *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) e o mesmo foi verificado por PAVELA (2010), em testes com larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833). Estudos tem demonstrado que parte da toxicidade do timol e o carvacrol a diferentes organismos está relacionada com o efeito que essas substâncias apresentam sobre células de organismos distintos, se incorporando e causando uma desorganização da membrana plasmática, fazendo que essa perca sua alta permeabilidade (MEDEIROS *et al.*, 2011). Tal fato tem sido demonstrado tanto para células eucariontes (MEDEIROS *et al.*, 2011), como para células procariontes (LAMBERT *et al.*, 2001). Com relação ao timol, esse efeito foi verificado inclusive sobre ovócitos de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (MATOS *et al.*, 2014). Dessa

forma, podemos inferir que o efeito sinérgico possa estar relacionado com a ação em conjunto dessas substâncias sobre a membrana celular dos carrapatos, potencializando a ação da mistura. No entanto, são necessários estudos histológicos para futura confirmação dessa hipótese.

As associações entre carvacrol e o (*E*)-cinamaldeído apresentaram efeito antagônico em todas as combinações testadas para *D. nitens*, enquanto para *A. sculptum*, apenas a combinação com a concentração de 1/4 da CL₅₀ não apresentou efeito antagônico, sendo verificado sinergismo moderado. PAVELA (2014), ao avaliar o efeito de alguns compostos aromático sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) constatou efeito antagônico na combinação de carvacrol e (*E*)-cinamaldeído. Porém no estudo realizado com bactérias, DIDRY *et al.* (1994) constataram efeito sinérgico quando combinaram carvacrol com (*E*)-cinamaldeído sobre *Streptococcus milleri* e *Provitella intermedia*. O mesmo resultado foi encontrado por YE *et al.* (2013) nos testes realizados com as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus haemolyticus*, em que a associação entre carvacrol e (*E*)-cinamaldeído apresentou efeito sinérgico. Tais diferenças indicam que as espécies podem responder de forma diferenciada a associação dessas substâncias, evidenciando que um determinado efeito obtido para um organismo, não pode ser extrapolado para outros. Tais diferenças também podem estar relacionadas com o tipo de metodologia, concentrações testadas e procedência das substâncias.

Na combinação do timol e (*E*)-cinamaldeído foi observado efeito antagônico, em todas as concentrações e combinações, para as duas espécies estudadas. O mesmo foi observado por DIDRY *et al.* (1994) que, ao realizarem testes utilizando a combinação de timol e (*E*)-cinamaldeído sobre as bactérias *Streptococcus mitis* e *Provitella oris*, verificaram efeito antagônico. PAVELA (2014) também constatou em seus estudos com *Spodoptera littoralis* efeito antagônico quando combinou timol e (*E*)-cinamaldeído. Desta forma, pode-se supor que o efeito antagônico pode estar relacionado com a possível reação do (*E*)-cinamaldeído (aldeído)

com o timol (álcool fenólico) formando éter, e esse éter normalmente não teria atividade biológica pela não disponibilidade do oxigênio.

6 Conclusão

Conclui-se que a combinação de carvacrol e timol, na concentração da CL_{50} , é a mais indicada para o controle dos carrapatos de equinos, pois nessas combinações foi verificado efeito sinérgico para as duas espécies, sendo assim viável o uso futuro de um eventual carrapaticida comercial em casos de infestações mistas. Já as combinações contendo (*E*)-cinamaldeído não são apropriadas para o controle desses ectoparasitos, uma vez que foi observado efeito antagônico na maioria das associações contendo estas substâncias.

7 Considerações Finais

A comprovação de efeito sinérgico permite que haja uma redução nas quantidades das substâncias a serem aplicadas e aumento na eficácia, o que pode servir de base para o desenvolvimento de produtos carrapaticidas, a partir de combinações de substâncias de origem vegetal, com melhor relação custo-benefício. Entretanto, são necessários estudos sobre outros estágios dessas espécies e testes em condições naturais, além de realizar uma avaliação da toxicidade dessas substâncias sobre as espécies hospedeiras.

8 Referências bibliográficas

BALADRIN, N. F.; KLOCKE, J. A.; WURTLE, E. S. & BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. **Science**, v.228, p. 1154–1660, 1985.

BORGES, L.M.F.; LEITE, R.C. Aspectos biológicos do *Dermacentor nitens* (Neuman, 1897) em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 6, p. 586-591, 1993.

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

BOTTEON, P.T.L.; MACHADO, R.C.C.; REIS, T.P.; MASSARD, C.L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.35, n.5, p. 1136-1140, set-out, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. M. O.; SCORALIK, M. G.; MASSONI, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus*

sanguineus (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v.186, p. 542-545, 2012 a.

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

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

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

FINNEY, D.S. Probit Analysis, third ed. Cambridge University Press. Cambridge, 1971.

FONSECA, L. M. G. ; MARTINS, A. V. Febre Maculosa: Revisão de literatura -Artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 2, n. 1, p. 01-20, 2007.

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

GALLARDO, A.; PICOLLO, M. I.; GONZÁLEZ-AUDINO, P.; MOUGABURE-CUETO, G. Insecticidal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49 n.2 p. 332-335, 2012.

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

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O; SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E.; GOIS, R.W. S.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.111, p. 423-430, 2012.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 841-845, 2005.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitos de importância veterinária. Plêiade/FAPESP, São Paulo. 2001.

GUGLIELMONE, A.A.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.S.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p. 115-124, 2006.

GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v.40, n.2, p. 83-100, 2006.

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

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 863–869, 2013.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari:Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M. B. Biológica-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.13, p. 123–124, 2004.

LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH (eds) Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p. 155–164, 2006.

LABRUNA, M. B. ; OGRZEWALSKA, M. ; MARTINS, T. F. ; PINTER, A. ; HORTA, M. C. . Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomolog**, v. 45, p. 1156-1159, 2008.

LAMBERT, R.J.W; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, p. 453-462, 2001.

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

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; ROSÁRIO-CRUZ, R.; CASTILLO-HERRERA, G.; FLORES-FERNANDEZ, J.M.; ALVAREZ, A. H.; LUGO-CERVANTES, E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.48(4), p. 822-827, 2011.

- MARTINS, T.F.; VENZAL, J.M.; TERASSINI, F.A.; COSTA, F.B.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 62, n.1, p. 121-128, 2014.
- MATOS, R.S.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FURQUIM, K.C.S.; SAMPIERI, B.R.; REMÉDIO, R.N.; ARAÚJO, L.X.; NOVATO, T.P.L., 2014. Histopathological study of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to diferente thymol concentrations. **Parasitology Research**, DOI 10.1007/s00436-014-4145-9.
- MEDEIROS, M.G.F.; SILVA, A.C.; CITÓ, A.M.G.L.; BORGES, A.R.; LIMA, S.G.; LOPES, J.A.D.; FIGUEREDO, R.C.B.Q. Invitro antileishmanial activity and citotoxicity of oil essential from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, p. 237-241, 2011.
- MENDES, A. S.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; BRITO, F. C.; MASSONI, T. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.183, p. 136-139, 2011.
- MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) on Greenhouse tomato. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 2015-2023, 2006.
- MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; CLEMENTE, M. A.; ROSA, L. S.; MATURANO, R. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.105, p. 1093-1097, 2009.
- MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; SILVA, A. M. R.; MATURANO, R.; AMARAL, C. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.106, p. 615-619, 2010.
- MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. O. S.; FAZA, A.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111, p. 1295-1300, 2012.
- NAVA, S; BEATI, L; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.;MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n.sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 252–276, 2014.
- NOVELINO, A. M. S.; DAEMON, E; SOARES, G. L. G. Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.101, p. 809-811, 2007 a.
- NASCIMENTO, E. M.; FORLONG, J.; PIMENTA, D. S.; PRATA, M. C. A. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematoides gastrintestinais de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, n.3, p. 817-824, 2009.

- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, v.67 p. 341–351, 2011.
- OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, p. 118-122, 2004.
- PAVELA, R. Acute and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biopesticides**, v. 3, p. 573-578, 2010.
- PAVELA, R. Acute, sinergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisid. (Lep. Noctoidae) larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 247-258, 2014.
- PRATA, M. C. A.; ALONSO, L. S.; SANAVRIA, A. Parâmetros biológicos do estágio ninfal de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em coelhos. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 3, p. 55-57, 1996.
- REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B. J. R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p. 41-52, 2008.
- RESENDE, J. D. S. A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. ; MATURANO, R. ; PRATA, M. C. A. ; RODRIGUES, A. F. S. F. . Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 139-142, 2012.
- ROBY, T.O.; ANTHONY, D.W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.142, n.2, p. 768-769, 1963.
- SCORALICK, M.G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, v. 110, p. 645–648, 2012.
- SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO R.; GOMES G.A.; FAZA A.; CARVALHO M.G.; DAEMON E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (*E*)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 112, n.4, p. 1461-1466, 2013a.
- SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; MATOS, R.S.; MELO, D.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v.112, p. 3471 – 3476, 2013b.
- YE, H.; SHEN, S.; XU, J.; LIN, S.; YUAN, Y.; JONES, G.S. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. **Food control**, v.34, p. 619-623, 2013.

ANEXO 1

Combinação que mostrou melhor efeito sinérgico das associações entre timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*.

