

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

MARCIO SCORALICK GOLDNER

EFICÁCIA CARRAPATICIDA DO TIMOL EM SOLUBILIZAÇÃO ETANÓLICA SOBRE
LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)

Juiz de Fora

2011

MARCIO SCORALICK GOLDNER

EFICÁCIA CARRAPATICIDA DO TIMOL EM SOLUBILIZAÇÃO ETANÓLICA SOBRE
LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Área de
Concentração em 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 de Souza Pinto

Juiz de Fora

2011

MARCIO SCORALICK GOLDNER

EFICÁCIA CARRAPATICIDA DO TMOI, EM SOLUBILIZAÇÃO ETANÓLICA
SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)

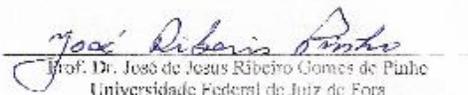
Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas: Área de
Concentração em Comportamento e
Biologia Animal da Universidade Federal
de Juiz de Fora, como requisito parcial para
obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em 24 de janeiro de 2011.

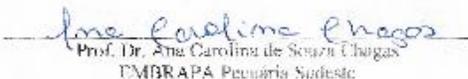
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Ana Carolina de Souza Chagas
EMBRAPA Pecuária Sudeste

DEDICATÓRIA

... Aos meus pais,
que foram o alicerce para a
construção dos meus sonhos, me presenteando com amor incondicional e força e
responsabilidade.

... Á minha esposa e alma gêmea,
pelo carinho, amor, apoio e, acima de tudo, por me ensinar
a ter segurança, confiança e perseverança.

... Ao meu irmão,
pelo amor e a força que nos une.

... Aos meus sogros,
que me deram força, incentivo e amor durante minha jornada.

...Aos amigos,
Por toda ajuda dispensada para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Erik Daemon, pela orientação, pela confiança, pelo apoio e por acreditar em mim, e, por ser além de tudo, um amigo eterno.

Ao amigo Caio por ter sido fundamental neste trabalho, sempre me ajudando e me orientando no decorrer do trabalho.

Aos amigos do mestrado, por suas amizades.

Aos pesquisadores, que serviram de alicerce para o avanço e realização do trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora- MG e seus professores e funcionários por toda ajuda e estrutura fornecidas.

Aos amigos Ralph, Andressa, Carol, Gabriela pela ajuda dispensada.

Aos meus pais, Marcio e Rosângela pelo incentivo, amor, formação que me possibilitaram a realização de mais uma etapa de minha vida.

Ao meu irmão, por acreditar em mim sempre.

Aos meus sogros Antônio e Sibebe pela amizade, pela força e pelo incentivo no decorrer deste mestrado.

Ao meu grande amor e alma gêmea, Carol, pela ajuda, força, incentivo e paciência para a realização deste trabalho.

A Faculdade de Farmácia e Bioquímica e à Universidade Federal de Juiz de Fora pela minha formação.

A Embrapa Gado de Leite e os pesquisadores John Furlong e Márcia Prata pelo apoio e oportunidade de utilização de suas dependências do laboratório de Parasitologia.

A Deus por me iluminar nos momentos difíceis e me presentear com pessoas tão especiais que sem elas nada seria válido.

"A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho
original."

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2. RESISTÊNCIA E ALTERNATIVAS AO COMBATE.....	6
2.3. PLANTAS E A PRESENÇA DE TIMOL.....	8
2.4. TIMOL.....	9
2.5. DMSO.....	11
2.6. SOLUÇÃO.....	12
SEÇÃO I - EFICÁCIA CARRAPATICIDA DO TIMOL EM SOLUBILIZAÇÃO ETANÓLICA SOBRE LARVAS DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (ACARI: IXODIDAE).....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Mortalidade média de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) tratadas com três diferentes formulações de timol a 2% e mantidas sob condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$)..... 17
- Tabela 2 -** Mortalidade media de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) tratadas com diferentes concentrações de timol e mantidas sob condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$)..... 18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fêmea ingurgitada de <i>R.(B.) microplus</i>	4
Figura 2 - Fêmea ingurgitada de <i>R.(B.)microplus</i> em período de oviposição...	6
Figura 3 - Fotografia do arbusto de <i>Thymus vulgaris</i> – tomilho Extraído de: www.herbario.com.br/dataherb13/tomillo.jpg	9
Figura 4 - Estrutura Química do Timol. A: Estrutura 3D. B: Estrutura plana molecular.....	10
Figura 5 - Estrutura química do dimetilsulfóxido(DMSO). A: Estrutura em terceira dimensão. B: Estrutura plana molecular.....	11
Figura 6 - A - Pacotes de larvas armazenados em B.O.D. no laboratório sobre condições de temperatura 27 ± 1 ° C e umidade relativa > $80 \pm 10\%$. B – Abertura do pacote de larvas embebido com formulação de timol após 24 horas. C- Contagem de todas as amostragens avaliando larvas vivas x mortas.....	16

RESUMO

O uso indiscriminado de carrapaticidas sintéticos e o quadro de resistência aos produtos utilizados no mercado impulsionaram novas pesquisas e alternativas ao combate aos parasitos hematófagos. Dentre as alternativas mais promissoras, pode-se evidenciar o uso de substâncias e seus derivados provenientes de plantas com objetivo de implementar de carrapaticidas de origem natural que podem ser menos prejudiciais ao meio ambiente. O presente trabalho teve por objetivo potencializar “*in vitro*” a eficácia carrapaticida do timol frente a larvas de *R. (B.) microplus*. No primeiro experimento, foram elaboradas três formulações, visando à escolha do preparado com melhor custo-benefício sem que os diferentes componentes das formulações interferissem na eficácia carrapaticida. A formulação de escolha demonstrou a mortalidade de 96,65% das larvas mantendo a eficácia carrapaticida do timol a 2% acima dos limites preconizados pelo Ministério da Agricultura de 95% para produtos comerciais. No segundo experimento, foram testadas, na formulação eleita, as concentrações de 0,25%, 0,5% e 1% de timol sobre larvas de *R. (B.) microplus*, sendo que a taxa de mortalidade obtida com 0.25% foi de 94%, demonstrando que mesmo com baixa concentração de timol a eficácia carrapaticida foi considerável. Os resultados alcançados mostram que, *in vitro*, a eficácia carrapaticida do timol pode ser não somente mantida, como potencializada se for levada em consideração a metodologia de preparo da formulação, bem como características físico-químicas dos seus componentes, visando minimizar perdas do princípio ativo. Entretanto, são necessárias pesquisas futuras para ratificar o potencial acaricida do timol em ambiente de campo, modificando e testando diferentes apresentações.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, timol, carrapaticida, formulação

ABSTRACT

The indiscriminate use of synthetic acaricides and the picture of resistance to products used in the market spurred new research and alternatives to combat these hematophagous parasites. Among the most promising alternatives, it can be highlight the use of substances and their derivatives from plants, aiming to implement the carrapaticide products of natural origin that may be less harmful to the environment. This study aimed to "enhance" the *in vitro* acaricide efficacy of thymol against the larvae of *R. (B.) microplus*. In the first experiment, three formulations were prepared, in order to choose the most cost-prepared without any of the different components interfere with the efficacy of insecticide formulations. The formulation of choice showed 96.65% mortality of larvae still remain effective insecticide of the thymol 2% above the limits established by the Ministry of Agriculture of 95% for commercial products. In the second experiment, were tested in the formulation choice, the concentrations of 0.25%, 0.5% and 1% of thymol on larvae of *R. (B.) microplus*, with a mortality rate of 94% with 0.25% of thymol, demonstrating that even in low concentrations of thymol acaricide efficacy was considerable. The results show that *in vitro*, acaricide efficacy of thymol can be not only maintained, as increased if it is taken into account the preparation method of the formulation and the physicochemical characteristics of its components in order to minimize losses of active. However, further research is needed to ratify the acaricidal potential of thymol in a field environment, modifying and testing different presentations and to assess its impact on the environment.

Keywords: Cattle ticks, thymol, acaricide, formulation

1 – INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1888) (ACARI: IXODIDAE) (= *Boophilus microplus*) é um dos ectoparasitos hematófagos com distribuição mundial, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais (WILLADSEN & JONGEJAN, 1999), e um dos que causam maiores prejuízos econômicos, sendo no Brasil, esse prejuízo estimado em 2 bilhões de dólares anuais, incluindo danos na produção de leite e carne (GRISI *et al.*, 2002).

O panorama atual de resistência do *R. (B.) microplus* aos produtos de base sintética utilizadas no mercado, somados ao apelo ambiental por desenvolvimento de produtos eficientes e com menor toxidez, vem impulsionando novas pesquisas buscando alternativas eficazes ao combate desses parasitos (FURLONG *et al.*, 2007).

Uma alternativa promissora no combate aos carrapatos é a utilização substâncias provenientes de plantas e seus derivados como pesticidas (FREITAS *et al.*, 2005), visando à diminuição dos resíduos e a toxicidade dos carrapaticidas comparados aos sintéticos utilizados em larga escala atualmente, pois substâncias praguicidas de origem natural têm o tempo de permanência no ambiente menor, bem como o desenvolvimento de resistência a esses compostos é mais lento quando comparado aos sintéticos (CHAGAS, 2004).

NOVELINO *et al.* (2007a) demonstraram que o timol, substância majoritariamente presente na espécie *Thymus vulgaris L.* da família Lamiaceae, representando a média de 52% na composição total das substâncias do tomilho (JAKIEMIU *et al.*, 2010), apresentou considerável atividade carrapaticida sobre larvas do carrapato dos bovinos. Também foi evidenciado que o timol apresenta atividade repelente sobre larvas desse mesmo ixodídeo (NOVELINO *et al.*, 2007b). Atividade carrapaticida do timol também foi demonstrada sobre larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Entretanto, larvas e fêmeas ingurgitadas desse carrapato foram pouco susceptíveis a esse monoterpene (DAEMON *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009). Esses resultados motivaram a realização de novas pesquisas mais aprofundadas sobre essa substância e sua propriedade carrapaticida.

Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a possível potencialização carrapaticida do timol em solubilização etanólica sobre larvas de *R.(B.) microfilos*. Para tanto, foram realizados dois experimentos. No primeiro foram testadas três diferentes formulações etanólicas de timol, sobre larvas do carrapato dos bovinos, a fim de selecionar a solução com melhor custo benefício. Na segunda etapa, a melhor formulação foi testada em diferentes concentrações sobre larvas desse mesmo carrapato, a fim de avaliar se a nova forma de solubilização potencializou a atividade carrapaticida do timol.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A subclasse Acari, da classe Arachnida, à qual pertencem os carrapatos e outros ácaros é um grupo muito heterogêneo, apresentando grande diversidade de hábitos e habitats (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Os carrapatos estão classificados na ordem Ixodida, e divididos em três famílias: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae. Dentre as espécies de carrapatos existentes no mundo, *R. (B.) microplus* conhecido vulgarmente como carrapato dos bovinos, é a espécie que desperta o maior interesse econômico, a ponto de centralizar a atenção de indústrias de carrapaticidas, órgãos governamentais e instituições de pesquisa (MARTINS *et al.*, 2006) (Figura 1).

Esse carrapato apresenta ampla distribuição mundial, sendo encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do globo (JOHNSTON, 1986). No Brasil sua adaptação foi favorecida pela umidade e calor que propiciam condições favoráveis á sobrevivência e manutenção de suas colônias (POWELL & REID, 1982).



Figura 1: Fêmea ingurgitada de *R. microplus*.
 Fonte: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Imagens/carr6.jpg>

O ciclo de vida desse ixodídeo divide-se em fase de vida livre e fase parasitária. A fase de vida livre inicia-se após a queda da fêmea ingurgitada do hospedeiro, que passa por um período de pré-postura, que tem, em média, duração de dois a três dias, podendo se estender a mais de 90 dependendo principalmente das condições de temperatura. Após esse período a fêmea começa a realizar a ovipostura, sendo que uma única teleógina pode colocar 3000 a 4000 ovos durante 17 a 90 dias. A fase de incubação dura em torno de 25 dias. Depois da incubação, ocorre a fase de eclosão, para a qual são necessários de cinco a dez dias, podendo, no entanto, durar até mais de 100 dias (ROCHA, 2010).

Após a eclosão das larvas é necessário um período de quatro a 20 dias para que se tornem larvas infestantes. Portanto, o tempo de vida livre do carrapato dos bovinos gira em torno de 28 a 51 dias, podendo se estender a mais de 300 dias. Além disso, as larvas podem ficar mais de seis meses sem se alimentar. Em condições ótimas de temperatura e umidade, a queda/ postura/ eclosão tem duração de um mês (GONZALES, 1975).

A fase de vida parasitária inicia-se quando a larva infestante se fixa no hospedeiro passando a parasitá-lo e, durante o hematofagismo a larva se ingurgita, sendo a duração média desse período de 5 dias, podendo variar entre três a oito dias. O carrapato ainda passará por duas mudas (larva para ninfa e ninfa para adulto) para que chegue ao estágio adulto, onde posteriormente é seguido da cópula entre os adultos.

O início da queda das fêmeas ingurgitadas ocorre no 19º dia da infestação, sendo, em média, entre o 22º e 23º dias (Figura 2). A fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões (GONZALES, 1975), já a fase de vida livre sofre interferências de acordo com o clima, principalmente a fatores como temperatura e umidade.

Rhipicephalus (B.) microplus possui considerável importância no cenário mundial, por ser o vetor dos agentes causadores da tristeza parasitária bovina, que é causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela riquétsia do gênero *Anaplasma* (McCOSKER, 1975) além de ser o responsável por diversos danos econômicos (HORN & ARTECHE, 1985 in NOVELINO *et al.*, 2007b). Além disso, este carrapato pode causar danos ao couro, acarretando prejuízos devido às reações inflamatórias no local onde ele se fixa (TAYLOR, 2001), e os orifícios originados, além de desvalorizar o produto, podem favorecer a penetração de pequenas larvas de moscas, causadoras de bicheira e berne. (FURLONG, 2005). Outros prejuízos que podem ser citados estão relacionados à mão-de-obra, despesas com instalações, compra dos carrapaticidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos nos rebanhos (CORDOVÉS, 1999). Estima-se que no Brasil o prejuízo causado por este parasito na produção de leite e carne é de US\$2 bilhões/ano (GRISI *et al.*, 2002).

Segundo Jonsson *et al.* (2000), na Austrália, o custo total para a criação de gado (excluindo custos associados com a febre do carrapato) baseado nas práticas de manejo de 1998 é de quatro milhões e noventa e seis mil dólares por ano, sendo que 49% deste custo está relacionado aos custos do controle e 51% as perdas na produção.



Figura 2: Fêmea ingurgita de *R. microplus* em período de oviposição.
Fonte: <http://www.mgel.msstate.edu/tick.htm>

2.2 – Resistência e alternativas de controle de *Rhipicephalus (B.) microplus*.

O carrapato dos bovinos representa grande entrave econômico para produtores, podendo ser o vetor de agentes causadores de diversas doenças e sua eliminação completa é extremamente difícil, sendo que desde o final do século XIX pesquisadores vêm buscando produtos com a finalidade de combater *R.(B.) microplus* (FURLONG *et al.*, 2007).

Na Austrália, em 1896, o primeiro produto promissor foi uma formulação á base de arsênico, porém em 1937, ocorreram os primeiros relatos de resistência a essa substância. No Brasil, cepas resistentes também foram relatadas nessa época, fazendo com que grande preocupação fosse gerada em torno do assunto e grande quantidade de investimentos fosse feita pelas indústrias químicas para tentar descobrir alguma alternativa ao combate desses parasitos (FURLONG *et al.*, 2007). Os produtos químicos como os organofosforados, organoclorados, amidínicos, piretróides sintéticos, fenilpirazóis, benzofenilureas, lactonas macrocíclicas utilizados no controle desses parasitas têm sido questionados, especialmente após o surgimento de resistência dos carrapatos a essas substâncias (LI *et al.*, 2003; 2004).

Isso ocorre em virtude do mau uso desses agentes carrapaticidas, além do risco de intoxicação de animais e de humanos devido ao uso inadequado e indiscriminado desses produtos.

Nas últimas décadas dois métodos têm sido estudados visando o implemento do controle dos carrapatos, o controle biológico e o imunológico. (DA SILVA *et al.*, 1996; ALVES-BRANCO *et. al.*, 1983, ANDREOTTI *et al.*, 2002; DA COSTA *et al.*, 2002; FRAZZON *et. al.*, 2000).

O controle biológico pode ser feito com a utilização de predadores e patógenos no combates a esses parasitos, demonstrados através de alguns exemplos como a garça vaqueira *Egretta ibis* (ALVES-BRANCO *et. al.*, 1983), formigas carnívoras (GONZALES, 1975), bactérias (*Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans*) (BRUM, 1988), fungos (como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*), muito estudados nos últimos anos em diferentes espécies de carrapato (FREITAS *et al*, 2005). e nematóides entomopatogênicos como *Heterorhabditidis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditidis amazonsensis* RSC-5 (MONTEIRO *et al*, 2009)

O controle imunológico tem por finalidade o desenvolvimento de vacinas através dos novos descobrimentos nos campos da biologia molecular de antígenos que possam gerar resposta imune-protetora contra esses parasitos (KELLY & COLLEY, 1988). Um desses antígenos, com boa resposta acaricida, é uma proteína de intestino de *R.(B.) microplus* denominada Bm86 (FREITAS *et al*, 2005). Apesar dos avanços no combate ao carrapato através do implemento de novas técnicas baseadas na imunologia, o uso de carrapaticidas associados são indicados, já que o uso solitário das vacinas não garante eficácia satisfatória (WILLADSEN *et. al*, 1996).

O uso de óleos essenciais e extratos provenientes de plantas assim como novas moléculas sintetizadas a partir desses produtos tem sido uma forma alternativa e promissora de combate a carrapatos, pois aquelas sintetizam grande quantidade de substâncias para protegê-las dos insetos fitófagos e outros herbívoros. Os metabólitos secundários das plantas geralmente são biosintetizados para deter a sua própria predação e atuam como arma fundamental de proteção. Alguns desses metabólitos possuem atividade pesticida como demonstrado por CLEMENTE *et. al.* (2007) em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* e também evidenciados por outros autores (PRATES *et al.*, 1993; CHAGAS *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2005, 2007).

2.3 - Plantas e a Presença de Timol

O timol ou ácido tímico pode ser encontrado em diversas espécies de plantas, figurando dentre as plantas do taxon genérico *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e de árvores de pequeno porte (Terblanché et. al., 1996). A espécie *Lippia sidoides*, possui o teor de timol variável obtido do seu óleo essencial, compreendida entre 34,2 a 95,1% em várias determinações. (Ferreira et. al., 2003) pois segundo Miraldi ET. al. (2001) e Silva ET. al. (1999) ,seu rendimento e composição podem ser influenciados pelas condições climáticas, hora da coleta, idade da planta, cuidados na preparação da matéria-prima vegetal, além de outros fatores.

Pode ser encontrado também na família das Lamiaceas que compreende 150 gêneros, com cerca de 2800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo. Muitas dessas espécies foram introduzidas no Brasil com intuito de serem usadas como condimentos e agentes aromatizantes como, por exemplo, a sálvia (*Salvia officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), entre outras (PORTE; GODOY, 2001).

Dentre essas espécies da família das Lamiaceas, o tomilho (*Thymus vulgaris* L.) se destaca devido ao alto teor de timol encontrado na sua composição, sendo este presente na média de 54,89% dos constituintes total da planta sendo que o maior rendimento do óleo essencial é proveniente das folhas. (Jakiemiu, et al., 2010). Além das diversas contribuições dos diferentes extratos e óleos essenciais na indústria em geral, principalmente alimentícia, muitos outros efeitos, tais como atividades antifúngicas, pesticidas e antibacterianas do óleo essencial de tomilho foram demonstradas por diversos investigadores como Higes et. al.(1996), Daferera et. al. (2000) e Bagamboula et. al. (2004).(Figura 3)



Figura 3 : Fotografia do arbusto de *Thymus vulgaris* – tomilho

Extraído de: www.herbario.com.br/dataherb13/tomillo.jpg

2.4 – Timol

O timol, ácido tímico ou isopropilmetacresol, cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{14}O$, apresenta-se na forma de cristais incolores ou pó branco, com odor irritante, pouco solúvel em água e muito solúvel em álcool (REYNOLDS, 1996). Essa molécula possui ponto de fusão entre 48° e $52^{\circ}C$ (Farmacopéia Portuguesa VIII, 2005) e pode ser obtido sinteticamente ou através de alguns óleos essenciais provenientes de plantas como *Mentha piperita* (Hortelã pimenta) *Lippia sidoides* (Alecrim-pimenta, Alecrim-cravo e Alecrim-cavalo) (COSTA *et al.*, 2007), *Pectis apodocephala* e *Pectis oligocephala* (ALBUQUERQUE *et al.* 2007) e principalmente da espécie *Thymus officinalis*, vulgarmente conhecida como tomilho, planta de origem mediterrânea e com diversas propriedades biológicas, tais como antiespasmódico (MEISTER *et al.*, 1999.), antibacteriana (DOB *et al.*, 2006), antifúngica (SOLIMAN; BADEAA, 2002), antitabagismo (CARLINI *et al.*, 2006), giardicida (AMARAL *et al.*, 2006) e atividade antioxidante (TEPE *et al.*, 2005). A primeira edição da Farmacopéia Brasileira Oficial, publicada em 1926, inclui 1.702 monografias de medicamentos. Dentre essas, duas monografias remetem ao tomilho (BRANDÃO *et al.*, 2006).

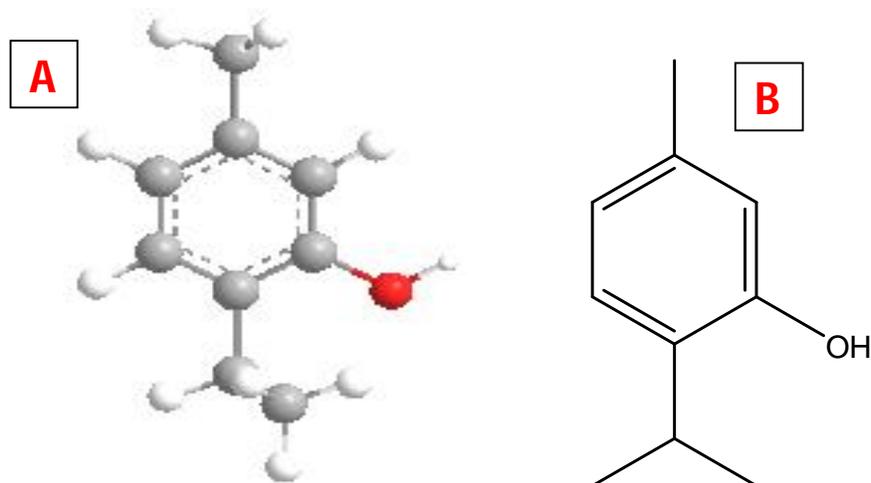


Figura 4: Estrutura Química do Timol. **A:** Estrutura 3D. **B:** Estrutura plana molecular.

O ácido tímico também é utilizado no combate a varroose, doença causada devido à presença do ácaro *Varroa destructor* em abelhas (CHIESA, 1991). Também se pode citar sua atividade moluscicida (FERREIRA *et al.*, 2009).

Segundo a Food and Drug Administration e Environmental Protection, o timol é reconhecido como um componente seguro e indicado para aplicações no campo em cultura de produtos comestíveis. A utilização desse monoterpene também pode representar a redução de custo de produção e de resíduos de pesticidas, fato demonstrado na utilização do timol no controle da bactéria *Ralstonia solanacearum*, agente causador da murcha bacteriana do tomateiro. (JI *et al.*, 2005).

Para formulações de enxágüe bucal, colutórios, é usado nas concentrações de 0,15 a 0,25%; em formulações para aftas usa-se 3% e no tratamento de infecções fúngicas, tais como as causadas na lâmina ungueal e algumas dermatites, como as paroníquias, são utilizadas a 2% (BATISTUZZO *et al.*, 2006). Na veterinária o timol é usado na dermatologia como antifúngico e antipruriginoso, porém é irritante em concentrações acima da dose posológica padrão e são contra-indicados para o uso em felídeos (SPINOSA *et al.*, 2006).

Esse monoterpene possui algumas incompatibilidades gerais, compreendidas entre químicas, físicas e farmacêuticas ocasionando efeitos desfavoráveis. As incompatibilidades são frente a iodo, álcalis, agentes oxidantes, acetanilida, antipirina, salol, naftol, uretana, brometo de canfora, sais de quinina, óleos e matérias gordurosas, se liquefaz na presença de canfora, hidrato de cloral, mentol e é incompatível com álcool ou veículos alcoólicos para uso interno (CAVALCANTI, 2008).

O timol também vem sendo pesquisado e utilizado como agente carrapaticida obtendo, *in vitro*, eficácia relevante. (NOVELINO *et al.*, 2007; DAEMON *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010)

2.5 – Dimetilsulfóxido (DMSO).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um subproduto do processamento da madeira e da destilação do petróleo (SPINOSA *et al.*, 2006), é um composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO , massa molar de 150.22 g/mol e temperatura de congelamento 18,5°C. Era empregado como solvente industrial e hoje serve como veículo para vários medicamentos (SPINOSA *et al.*, 2006). Tem grande número de propriedades benéficas, porem há poucas evidências científicas para justificar seu uso (VIEIRA & PINHEIRO, 2004).

O DMSO é muito bem absorvido pela pele e mucosas em cerca de 5 minutos, e, em aproximadamente 20 minutos é distribuído para diferentes tecidos. Essa substância também tem a propriedade de carrear consigo substâncias de pequeno peso molecular também possuindo a propriedade de penetrar a barreira hematoencefálica, diminuindo a produção de prostaglandinas no sistema nervoso central.

Não é utilizado como veículo cosmético quando o objetivo é uma ação em nível basal da pele, sendo este substituído por óleos de origem mineral tais como vaselina, parafina, óleo mineral, silicones, ceras e alcoóis graxos. (VIGLIOGLIA & RUBIN, 1997).

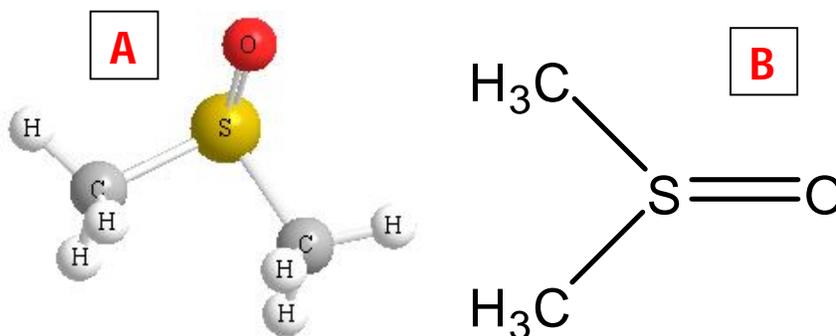


Figura 4: Estrutura química do dimetilsulfóxido(DMSO). **A:** Estrutura em terceira dimensão. **B:** Estrutura plana molecular.

O dimetilsulfóxido também pode ser usado como antiinflamatório, diurético potente, anestésico local, relaxante muscular, vasodilatador e como agente inotrópico (VIEIRA & PINHEIRO, 2004). É também considerado eliminador eficaz de radicais livres em lesões teciduais (SOUZA *et al.*, 2008). Na veterinária, é utilizado para tratamento de equinos como

agente antiinflamatório tópico nos membros, sendo também indicado para traumas cerebrais e de coluna (SPINOSA, *et al.*, 2006). Em cães, é principalmente usado para alívio antiinflamatório de ouvido (SPINOSA, *et al.*, 2006), porém não pode ser usado em animais de consumo, tais como bovinos e suínos, dado sua permeação cutânea, a produção de resíduos somados a sua ação teratogênica, razão essa em que a utilização no primeiro terço da gravidez é vedada. Em cães, o uso prolongado pode levar ao desenvolvimento de catarata (SPINOSA *et al.*, 2006).

Os efeitos colaterais mais comuns são: edema, eritema, desidratação cutânea e prurido, pela liberação de histaminas (SPINOSA *et al.*, 2006) e em uso tópico, sua utilização tem sido restringida devido à irritação que pode causar à pele (LEONARDI & CHORILLI, 2008), porém, por outro lado, segundo Jacob (2003) e Muir, (2003), o DMSO é uma substância de baixa toxicidade.

A falta de estudos faz com que o dimetilsulfóxido seja uma substância de uso e ações controversas, sendo que o Food and Drug Administration (FDA) já recusou sete pedidos de realização de estudos clínicos em pacientes dos oito requeridos, obtendo assim aprovação somente para cistite intersticial em 1978 (JACOB, 2003).

2.6 – SOLUÇÃO

Solução são produtos da dissolução de substâncias em determinado líquido que formam um sistema homogêneo. Consideram-se dois componentes: os solventes de natureza líquida e o soluto que pode ser sólido ou líquido (SPINOSA *et al.*, 2006).

As soluções se classificam em aquosas (hidróleos) alcoólicas (alcóleos), simples e extrativas ou tinturas, etéreas (eteróleos), dentre outras (gliceroleos, sorbitoleos) de menor interesse em dermatologia. Dentre as soluções utilizadas no geral, podemos ver também soluções muito utilizadas que veiculam inclusive algumas substâncias carrapaticidas e acaricidas (SPINOZA *et al.*, 2006).

As soluções alcoólicas, mesmo não sendo as principais formulações utilizadas em produtos com finalidade cosmética, têm algumas vantagens como de permanecerem fisicamente estáveis e serem de fácil preparo (BAREL *et al.*, 2001) fazendo com que essa forma farmacêutica figure entre as mais utilizadas na saúde animal, perdendo apenas para formulações de shampoo (SPINOZA *et al.*, 2006).

SEÇÃO I

EFICÁCIA CARRAPATICIDA DO TIMOL EM SOLUBILIZAÇÃO ETANÓLICA SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus (B.) microplus* (ACARI: IXODIDAE).

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo propor um novo método de solubilização do timol para fins carrapaticidas e comprovar a eficácia dessa nova formulação sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*. Para realização do trabalho foram feitos dois experimentos, sendo adotado o teste de larvas com papel de filtro impregnado nas duas etapas para avaliar o potencial das soluções formuladas. No primeiro experimento, larvas de *R.(B.) microplus* foram expostas a três novas formulações de timol: *Formulação 1* – Água QSP + álcool 30% (v/v) + timol 2%; *Formulação 2* – Água QSP + álcool 50% (v/v) + timol 2%; *Formulação 3* – Água QSP + álcool 40% (v/v) + DMSO 5% + timol 2%. Para cada formulação foi preparado um controle (mesmas formulações isentas de timol), sendo formado também um grupo controle onde as larvas não receberam nenhum tratamento. Foram realizados, para cada grupo, 10 repetições com aproximadamente 100 larvas. A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foi selecionada a formulação com melhor desempenho e relação custo/benefício sendo essa testada nas concentrações 0,25%; 0,5% e 1,0% sobre larvas desse mesmo carrapato. No primeiro experimento, a mortalidade dos grupos tratados com timol com as diferentes formulações foi superior a 95%, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos controles. No segundo experimento, por apresentar a melhor relação custo benefício, foi selecionada a formulação 2 – (Água QSP + álcool 50% (v/v) + timol 2%) e nessa etapa, os valores referentes à mortalidade das larvas foram de 94,0%, 96,5% e 99,9% para as concentrações de 0,25%, 0,5% e 1,0%, respectivamente. Os resultados são discutidos no corpo do trabalho.

Palavras-chave – carrapato dos bovinos, monoterpeno, Lamiaceae.

INTRODUÇÃO

O timol ou ácido tímico (2-isopropil-5-metil-fenol) é um monoterpênóide derivado de plantas da família Lamiaceae (MESHKATALSADAT *et al.*, 2007), podendo ser encontrado na forma de cristais incolores com aroma irritante, sendo pouco solúvel em água (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII, 2005). Este monoterpeno já teve seu potencial bactericida, fungicida, nematocida, moluscicida, inseticida e acaricidas evidenciado por diferentes autores, em diferentes espécies alvo e com diferentes tipos de formulações (IMDORF *et al.*, 1995; MANSOUR *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 2009).

Testes em condições de laboratório revelaram que o timol apresentou atividade carrapaticida sobre larvas não ingurgitadas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (B.) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) (Sinonímia – *Boophilus microplus*) (NOVELINO *et al.*, 2007a, MONTEIRO *et al.*, 2010), sobre larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1808) (DAEMON *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009). Novelino *et al.* (2007) também demonstrou atividade repelente do timol sobre larvas do carrapato dos bovinos. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que o timol pode ser uma alternativa promissora para ser empregada no manejo integrado de carrapatos. Entretanto, nesses estudos a solubilização do timol foi feita com aquecimento em banho ou em placa aquecedora para facilitar sua solubilização em água (NOVELINO *et al.*, 2007; DAEMON *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010), contudo, esse processo de aquecimento poderia levar a perda parcial do princípio ativo, uma vez que seu ponto de fusão está compreendido entre 48 e 52°C (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII, 2005).

Além da perda parcial do timol volatilizado, a formulação atual utiliza dentre seus componentes o DMSO, um solvente orgânico largamente utilizado em formulações dermocosméticas em animais (SPINOSA *et al.*, 2006) com objetivo de promover a permeação de substâncias através das camadas da pele, sendo sua adição na formulação, para fins tópicos, questionável.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo propor uma nova metodologia de solubilização do timol e avaliar a possível potencialização de sua atividade carrapaticida sobre larvas de *R. (B.) microplus*, considerando que é a espécie mais economicamente importante na

região Neotropical (MARTINS *et al.*, 2006), sendo responsável por perdas de 2 bilhões anuais de dólares no Brasil (GRISI *et al.*, 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil e no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Os carrapatos utilizados no presente estudo foram cedidos pelo Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Os cristais de timol foram obtidos por intermédio das empresas Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA¹.

Composição e preparo da formulação

Para preparação das formulações, foram pesados e triturados 200 mg de timol* em Gral de porcelana. Depois da diminuição das partículas, foram feitas as diluições para o volume final de 10 ml cada: **Formulação 1** – (Água QSP + álcool 70% (v/v) + timol 2%); **Formulação 2** – (Água QSP + álcool 50% (v/v) + timol 2%); **Formulação 3** – (Água QSP + álcool 40% (v/v) + DMSO 5% + timol 2%). Na formulação 3, o teste piloto indicou que nesta concentração, o álcool não foi capaz de solubilizar eficazmente o timol. Por essa razão foi acrescentado o DMSO como adjuvante na solubilização.

Experimento 1

Para realização do experimento foi utilizada a técnica de pacote de larvas (STONE & HAYDOC, 1962) adaptada por Leite (1988). Nesta metodologia, cerca de 100 larvas, com aproximadamente 4 dias de vida, foram colocadas em papéis de filtro (2 x 2 cm) impregnados com as concentrações a serem testadas e em sequência, os envelopes foram fechados dentro de papéis de filtro com dimensões de 6 x 6 cm, com extremidades vedadas com auxílio de pregadores. Foram formados sete grupos, com 10 repetições, sendo cada grupo tratado com uma das formulações de timol a 2% ou com seu respectivo controle (mesmas formulações

¹ lote 4620601, certificado de análise 026596, fabricado em 21/04/2008 e Valido até 21/04/2011 em balança analítica modelo AY200, calibrada em 31/03/2010, certificado número 74.10.

isentas de timol). Também foi formado um grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. Após a montagem do experimento os grupos foram mantidos em câmara climatizada a (27 ± 1 ° C e UR > $80 \pm 10\%$). Após 24 horas foi feita a avaliação da mortalidade com a utilização de uma bomba de vácuo com uma pipeta adaptada na extremidade de uma mangueira. A mortalidade foi obtida pela seguinte fórmula:

Mortalidade (%) = (total de larvas mortas/total de larvas) x 100.



Figura 6: **A** - Pacotes de larvas de *R.(B.) microplus* armazenados em B.O.D. no laboratório sobre condições de temperatura 27 ± 1 °C e umidade relativa > $80 \pm 10\%$. **B** – Abertura do pacote de larvas após 24 horas. **C** - Contagem das larvas com a utilização de uma bomba de vácuo com uma ponteira adaptada na extremidade da mangueira.

Experimento 2

Nesse estudo, foi utilizada a mesma metodologia do experimento 1 e a partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foi selecionada a formulação com melhor desempenho e relação custo benefício. A formulação foi testada nas concentrações 0,25%,

0,5% e 1,0%. Também foi formado um grupo controle (formulação isenta de timol). Após a montagem do experimento os grupos foram mantidos nas mesmas condições citadas anteriormente, e a mortalidade foi avaliada da mesma forma.

Analise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Biostat versão 5.0. Os valores percentuais foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. Os valores médios de cada tratamento foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). No caso de distribuição não paramétrica, os valores foram comparados através de testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Student Newman-Keuls ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A mortalidade de todos os grupos tratados com as formulações contendo timol foram superiores a 95%, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação a todos os grupos controle, onde a mortalidade em nenhum dos tratamentos foi superior a 0,53%. Não foram constatadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as médias quando comparado os grupos controle entre si. Mesmo fato observado comparando os grupos tratados com formulações contendo timol a 2% (Tabela 1).

Tabela 1 - Mortalidade média de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) tratadas com três diferentes formulações de timol a 2% e mantidas sob condições de laboratório (27 ± 1 ° C e UR > $80 \pm 10\%$). Laboratório de Artrópodes Parasitos, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Tratamentos	Mortalidade média (%) \pm desvio padrão
Controle (sem tratamento)	0,42 ^a \pm 0,89
Controle 1 (Água QSP+ álcool 70%(v/v))	0,53 ^a \pm 0,93
Controle 2 (Água QSP+ álcool 50%(v/v))	0,00 ^a \pm 0,00
Controle 3 (Água QSP+ álcool 40%(v/v) + DMSO 5%)	0,44 ^a \pm 0,78
Formulação 1 (Água QSP+ álcool 70%(v/v) + timol 2%)	99,73 ^b \pm 0,57
Formulação 2 (Água QSP+ álcool 50%(v/v) + timol 2%)	96,65 ^b \pm 3,57
Formulação 3 (Água QSP + álcool 40%(v/v) + DMSO 5% + timol 2%)	96,39 ^b \pm 4,08

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

No segundo experimento (tabela 2), devido a apresentar a melhor relação custo benefício, foi selecionada a formulação 2 – (Água QSP + álcool 50%(v/v) + timol 2). Os valores referentes à mortalidade das larvas foram de 94,0%, 96,5% e 99,9% para as concentrações de 0.25%, 0.5% e 1.0%, respectivamente, e, foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre todos os grupos tratados e o controle, onde a mortalidade foi inferior a 0.3%. Também foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o grupo tratado com timol a 0,25% e timol a 1,0%.

Tabela 2 - Mortalidade média de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) tratadas com diferentes concentrações de timol e mantidas sob condições de laboratório (27 ± 1 ° C e UR > 80 ± 10 %). Laboratório de Artrópodes Parasitos, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Tratamentos	Mortalidade média (%) \pm desvio padrão
Controle – (água QSP + álcool 50% (v/v))	0,26 ^a \pm 0.57
Timol 0.25%	94,00 ^b \pm 4.70
Timol 0.5%	96,57 ^{bc} \pm 5.08
Timol 1.0%	99,93 ^c \pm 0.21

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

DISCUSSÃO

Nos experimentos realizados, foram propostas três novas formas de solubilização do timol utilizando-se nova metodologia de preparo da solução diferindo do método adotados por Novelino *et al.* (2007); Daemon *et al.* (2009), Monteiro *et al.* (2009) e Monteiro *et al.* (2010), onde as principais diferenças são a retirada do Dimetilsulfóxido (DMSO) como agente de solubilização do timol e a não utilização de aquecimento durante o processo de preparo.

Na metodologia adotada por Novelino *et al.* (2007), Daemon *et al.* (2009), Monteiro *et al.* (2009) e Monteiro *et al.* (2010), a emulsificação do timol em solução aquosa de DMSO a 1% foi realizada com aquecimento de 60° C, fato esse em decorrência da baixa solubilidade do mesmo em água. No presente trabalho, foi proposta a solubilização do timol em álcool etílico visto a alta solubilidade do timol (REYNOLDS, 1996) frente a essa substância, fazendo com que o aquecimento da solução não fosse mais necessário, evitando a possível perda do princípio ativo. Cabe ainda destacar, que não foi utilizado o DMSO na solubilização de duas das três formulações testadas.

Os resultados do primeiro experimento demonstraram que as três formulações testadas apresentaram atividade carrapaticida sobre larvas de *R. (B.) microplus* uma vez que o percentual de mortalidade foi superior a 95% nos três grupos tratados, atingindo assim a eficácia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para produtos carrapaticidas (MAPA, 1990).

Para a realização do segundo experimento, uma vez que a atividade das três soluções foram similares, foi escolhida a formulação 2 que não necessita da utilização de DMSO que pode levar a irritação ocasional no local de aplicação da pele ao carrear compostos através da barreira dérmica (LEONARDI & CHORILLI, 2008), diferindo também da formulação 3, uma vez que utiliza menor quantidade de álcool, comparada com a formulação 1. Segundo Spinosa *et al.* (2006), maiores concentrações de álcool etílico podem elevar o preço do produto e são contra-indicadas para peles irritadas, esfoladas e escoriadas. A formulação 3 foi eliminada devido á presença de DMSO que não se faz necessário em uso tópico.

No segundo experimento pode-se constatar que a concentração de 0,25 e 0,5% de timol resultou na mortalidade de 94,00 e 96,57% das larvas de *R. (B.) microplus*, respectivamente. Esse resultados são superiores aos encontrados por Novelino *et al.* (2007) que utilizando as mesma concentrações, com outra forma de solubilização, relatou que a mortalidade foi de 22,69 e 71,99% sobre as larvas desse mesmo ixodídeo. A mortalidade na concentração de timol a 1,0% foi de 99,93, sendo similar ao observado por Novelino *et al.* (2007), que constataram mortalidade de 100%. Com base nesses resultados podemos inferir que a nova solubilização do timol potencializou sua atividade carrapaticida.

A melhor eficácia da nova formulação pode estar ligada com o não aquecimento da solução evitando a possível perda do princípio ativo por evaporação, devido a sua faixa de fusão estar compreendida entre 48^o a 52^o C (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII, 2005) e pela melhor solubilidade do timol em álcool (REYNOLDS, 1996).

Assim como discutido por BAGGIO (2004) em seu manuscrito sobre produtos com timol sobre controle da varrose, são necessárias maiores pesquisas levando em consideração os componentes das formulacões e suas influencias na eficácia do princípio ativo utilizado. São necessárias também, mais pesquisas relativas á eficácia carrapaticida do timol em testes de campo bem como a influência das apresentações farmacêuticas nessa eficácia, levando em consideração seus componentes e alvo de ação.

CONCLUSÃO

As formulações elaboradas no experimento 1 demonstraram que a modificação dos componentes e proporções não obtiveram impacto significativo na eficácia carrapaticida do timol.

Nas condições estudadas, a formulação utilizada no segundo experimento potencializou a atividade carrapaticida do timol frente às larvas de *R. (B.) microplus*, melhorando sua solubilidade e evitando sua evaporação.

A formulação incorporada de timol a 2% em álcool 50% (v/v) foi a que obteve, além da atividade comprovada, potencializada em 4 vezes relativa a metodologia utilizada atualmente, sendo esta isenta de DMSO.

A não utilização do aquecimento durante o processo de formulação contribuiu para a não volatilização do princípio ativo, potencializando sua eficácia carrapaticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M. R. J. R., *et al.* Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, June 2007.
- ALVES-BRANCO F.P., ECHEVARRIA F.A.M. & SIQUEIRA A.S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. **Comunicado Técnico da EMBRAPA**. 1: 1-4, 1983
- AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; BARBOSA-FILHO J.M.; REIS, A.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; MACEDO, R.O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognsia** 16(*Supl.*): 696-720, 2006
- ANDREOTTI R.; GOMES, A.; MALVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI S.D.; SAMPAIO C.A. & TANAKA, Aparecida Sadae. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**. 2: 557-563, 2002
- BAGGIO, A.; ARCULEIO, P.; NANETTI, A.; MARINELLI, E.; MUTINELLI, F. Fields trials with different thymol-based products for the control of varroosis . **Apicultural research** , p.395, Feb 2004 .

- BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Micro.**, Ghent, Belgium, v. 21, n. 1, p. 33-42, 2004.
- BAREL,A.O.; PAYE,M.; MAIBACH, H.I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Marcel Dekker, New York, 2001.
- BATISTUZZO, J. A.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário Médico Farmacêutico** 3^a ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, 321-322, 2006
- BRANDÃO, M. G.L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 408-420, 2006
- BRUM J.G.W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont *et al.*, 1981: etiopatogenia e sazonalidade. 200f. **Tese (Doutor em Ciências)**. Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J., 1988.
- CAVALCANTI, L. C. **Incompatibilidades farmacotécnicas, Motivo, Recomendação ao uso Terapeutico**. 2^o ed. São Paulo, Pharmabooks, 2008.
- CARLINI, E. A.; RODRIGUES E.; MENDES, F. R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 690-695, 2006.
- 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*. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.** 39, 247–253., 2002
- CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13: 156–160, 2004.
- CHIESA, F. “Effective control of varroaosis using powered thymol”. **Apidologie**, v.22: 135-145, 1991.
- CLEMENTE, M. A.; GOMES, F. T.; SCOTTON,A. C. B. S.;GOLDNER, M. S.; REIS, E. S.; ALMEIDA, M. N. Avaliação do Potencial de Plantas Medicinais no Controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 516-518, jul. 2007.
- CORDOVÉS C.O. **Carrapato: controle e erradicação**. Alegrete: Galha, 130p, 1999.

- COSTA, A. S. *et al.* Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, Mar. 2007
- DA COSTA G.L.; SARQUIS M.I.; DE MORAES A.M. & BITTENCOURT, V. R. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**. 154: 207-209, 2002.
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. CG/EM analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **J. Agric. Food Chem.**, Athens, Greece, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, 2000.
- DA SILVA V.J.I.; MARTINEZ, R.H.M.; OLIVEIRA, A.T.D.; HECK, A.; LOGULLO C.; GONZALES J.C.; DEWES H. & MASUDA A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**. 62: 155-160, 1996.
- 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). **Parasitology Research** 105:495-497, 2009.
- DOB, T.; DAHMANE, D.; BENABDELKADER, T.; CHELGHOUM C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. **Int J. Aromath** 16: 95-100, 2006.
- FARMACOPÉIA PORTUGUESA**. 8.ed. São Paulo: Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), Lisboa, 2005, Prescrições Gerais, Monografias T-Z, pg. 3059.
- FERNANDES, F. F.; FREITAS, E.; COSTA, A.C.; SILVA, I.G. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Pesq. Agropec. Bras.** 40, 1243-1245, 2005.
- FERNANDES, F. F.; LELES, R.N.; SILVA, I.G.; FREITAS, E. P. S. Study of the activity of *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) on larvae of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae). **Arq. Bras Med. Vet. Zootec.** 59, 145-149, 2007.
- FERRAZ, R. R. N.; MOREIRA, S. R. S.; HEILBERG, I. P. Efeitos do timol sobre os parâmetros urinários envolvidos na formação de cálculos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, Aug. 2009.
- FERREIRA, J.L.P.; VELASCO, E.; PAULA, A.E.S.; ARAÚJO, R.B.; PACHECO, J.M. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 09-11, 2003.

- FERREIRA, P. *et al* . The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 52, n. 4, Aug. 2009
- FRAZZON, A. P. G.; VAZ JR., I. S.; MASUDA A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**. 94: 117-125, 2000.
- FREITAS D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ JR., I. S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**. 33: 109-117, 2005.
- FURLONG, J. 2005. **Carrapatos: problemas e soluções**. 1 ed. Juiz de Fora :Embrapa Gado de Leite , p65.
- FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. S. **O carrapato dos bovinos e resistência: temos o que comemorar?**, Ed. 159, p.2, 2007.
- GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **“Ectoparasitos de importância veterinária”** 1 ed. São Paulo: FAPESP – Editora Plêiade, 2001.
- GONZALES, J. C. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 104p, 1975.
- GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 101p., 1974.
- GRISI L.; MASSARD C. L.; MOYA-BORJA G. E.; PEREIRA I.B .Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária** 21:8–10, 2002.
- HIGES, M.; LLORENTE, J. Ensayo de la eficacia del timol en el control de la varroosis de *Apis mellifera* en colmenas en producción. **Actas del II Congreso de la SEAE. Agricultura ecológica y desarrollo rural**. Navarra, p. 205-210, 1996.
- IMDORF, A.; KILCHENMAN, V. & BOGDANOV, S. Toxiziat von thymol; campher, menthol and eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* oud ind *Apis mellifera* L. in laborest. **Apidologie**, 26: 27-31.
- JACOB, S. Current status of dimethyl sulfoxide (DMSO). Disponível em: <<http://www.dmsso.org/articles/information/jacob.htm>>. Acessado em: 25 de novembro de 2010.
- JAKIEMIU E. A. R.; SCHEER A. P.; OLIVEIRA J. S.; CÔCCO L. C.; YAMAMOTO C. I. ; Deschamps C. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) . **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, jul./set. 2010.

- JI, P.; MOMOL, M.T.; OLSON, S.M.; PRADHANANG, P.M.; JONES, J.B. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. **Plant Dis** 89:497–500, 2005.
- JONSSON, N.; MAYER D.G. & GREEN P.E.. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**. 88: 79-92., 2000.
- JOHNSTON L.A.Y.; KEMP D.H. & PEARSON R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**. 16: 27-34, 1986.
- KELLY E.A.B. & COLLEY D.G. *In vivo* effects of monoclonal anti-I3t4 antibody on immune responsiveness of mice infected with *Schistosoma-mansoni* - reduction of irradiated cercariae-induced resistance. **Journal of Immunology**. 140:2737-2745, 1988.
- LEITE, R.C. *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887): Susceptibilidade, uso atual e retrospectiva de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiogeográficas da baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem Epidemiológica. **PhD Thesis**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil, p119. 1988.
- LEOARDI G. R.; CHORILLI M. **Dermofarmácia: Bases Dermatocóséticas, Microemulsões e Lipossomas**. São Paulo, RxEditora, p.18, 2008.
- LI, A.Y.; DAVEY R.B.; MILLER, R.J.; et al. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. **J. Med. Entomol.**, v.40, p.482-490, 2003.
- LI, A.Y.; DAVEY R.B.; MILLER, R.J.; et al. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v.41, p.193-200, 2004.
- MANSOUR, S.A.; MESSEHEA, S.S. & EL-GENGAIHI, S.E. Botanical biocides. 4. Mosquitocidal activity of certain *Thymus capitatus* constituents. **J. Nat. Toxins**, 9 (1): 49-62 . 2000.
- MAPA. **Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura. Diário de 22.01.90, p. 1506-1509, 1990.
- MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J. & LEITE, R.C. **Controle de carrapatos**. P. 145-153. In: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; M. ARZUA; BECHARA, H.G..(Org). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para identificação de species**. São Paulo: Instituto Butantan, 223p. P. 145-153, 2006.

- MEISTER A, BERNHARDT G, CHRISTOFFEL V, BUSCHAUER A. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. **Planta Med.** 65: p. 512-516, 1999.
- MESHKATALSADAT, M.H.; SARABI, R.S.; MOHARMIPOUR, S. Chemical constituents of *Thymus eriocalyx* leaves of Iranian origin plant. **Asian J Chem** 19:1648–1650, 2007.
- MIRALDI, E.; GIACHETTI, D.; FERRI, S. Quality control of aromatic drugs reported in **European Pharmacopoeia** 3. ed., IL Fármaco, v. 56, p. 365-371, 2001.
- MONTEIRO, C.M.D.O., DAEMON, E., CLEMENTE, M.A., ROSA, L.D.S., MATURANO, R., 2009, Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 105, 1093-1097.
- MUIR, M. DMSO: many uses, much controversy. Disponível em: <<http://www.dmsol.org/articles/information/muir.htm>>. Acessado em: 27 de setembro de 2004.
- NOVELINO, A. M. S.; DAEMON, E.; SOARES, G. L. G;.. Avaliação da Atividade Repelente do Timol, Mentol, Salicilato de Metila e Ácido Salicílico sobre Larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec**, v. 59, n. 3, p. 700-704, 2007.
- [PANDEY, G.](#); [DORRIAN S.J.](#); [RUSSELL, R.J.](#); [OAKESHOTT, J.G.](#) Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. **Biochemical and Biophysical research communications** ,Mar 13;380(3):710-4. Epub 2009.
- POWELL, R.T.; & REID, T.J. Project tick control. **Queens. Agric. J.**, 108 (6): p.279-300, 1982.
- PRATES, H. T.; OLIVEIRA, A.B.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A.A. Atividade carrapaticida e composição química do óleo essencial do capim-gordura. **Pesq. Agropec. Bras.** 28, p.621–625, 1993.
- REYNOLDS, J.E.F. **Martindale The Extra Pharmacopoeia**, 31^a ed., ed. Royal Pharmaceutical Society, London, 1996
- ROCHA, C. M. B. M.. **Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus*** (Canestrini, 1887) Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG. Disponível em:<http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_32.pdf>. Acesso dia 30 de novembro de 2010.
- SILVA, M.G.V.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.;ALENCAR, J.W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, p. 32-34, 1999.

- SOLIMAN, K.M.; BADEAA, R.I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food Chem. Toxicol** 40: p.1669-1675, 2002.
- SOUZA, A.H. *et al* . Dimethyl sulfoxide effects on the febrile response to lipopolysaccharide injection in rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria Zootecnica**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, June 2008.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M.. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 706-707,2006.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M.M.. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 710, 2006.
- STONE B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). **Bull Entomol Res** 53:563–578 **Parasitol Res** (2009) 105:495–497 497, 1962.
- TAYLOR M.A. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**. 161: p.253-268, 2001.
- TEPE, B.; SOKMEN, M.; AKPULAT, H.A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp.*sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. **J. Food Eng.** 66: p.447-454, 2005.
- TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae): A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 471-485, 1996.
- WILLADSEN, L.A.D. & JONGEJAN, F. Immunology of the Tick-Host Interaction and the control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitol. Today**, 15(7): p. 258-62, 1999.
- WILLADSEN, P.; COBON G. & MCKENNA R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**. 18:p. 241-246, 1996.
- VIEIRA, F. C.; PINHEIRO, V. A. **Formulário Veterinário Farmacêutico** 1^aed. São Paulo: Editora Pharmabooks. p.296-297, 2007.
- VIGLIOGLIA, P. A., RUBIN, J. **Cosmiatria II**. Buenos Aires: Panamericana de Publicaciones, p.22-37, 1997.