

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

Laryssa Xavier Araújo

**ATIVIDADE DO TIMOL, CARVACROL E EUGENOL SOBRE LARVAS
DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) E *Rhipicephalus
sanguineus* s.l. (ACARI: IXODIDAE) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS
E SEMI-NATURAIS**

Juiz de Fora

2015

Laryssa Xavier Araújo

Atividade do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) em condições laboratoriais e semi-naturais

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. Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Co-orientadores: Prof. Dr. Erik Daemon

Msc. Ralph Maturano

Juiz de Fora

2015

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

Araújo, Laryssa Xavier.

Atividade do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) em condições laboratoriais e semi-naturais : CAPÍTULO I - Sinergismo entre timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) / CAPÍTULO II - Atividade acaricida do timol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) em condições semi-naturais / Laryssa Xavier Araújo. -- 2015.

83 p. : il.

Orientador: Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Coorientador: Erik Daemon

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2015.

1. carrapato dos bovinos. 2. carrapato vermelho do cão. 3. monoterpeno. 4. fenilpropanóide. I. Monteiro, Caio Márcio de Oliveira, orient. II. Daemon, Erik, coorient. III. Título.

Laryssa Xavier Araújo

Atividade do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) em condições laboratoriais e semi-naturais

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 12 de fevereiro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

Profª. Dra. Isabele da Costa Ângelo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

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

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, Claudyr e Judith, meus familiares e amigos, e ao Gustavo por estarem sempre presentes em minha vida, torcendo pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus caminhos e me dar a certeza de que nunca estou só;

Ao meu orientador Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro pela confiança, apoio e amizade. Por me incentivar na superação dos meus limites e por tudo que me ensinou;

Ao co-orientador Prof. Dr. Erik Daemon por ter me recebido em sua equipe, permitindo que eu desenvolvesse este trabalho e por todos os ensinamentos;

Ao co-orientador Msc. Ralph Maturano por sua paciência e disposição em ensinar;

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação;

Aos amigos do LAP, que foram essenciais para o desenvolvimento desse estudo e contribuíram para que esses dias fossem mais prazerosos;

À amiga Tatiane Novato pela parceria fundamental neste estudo;

Aos funcionários da Pós-Graduação, por todo auxílio, e à Rosângela pela amizade e pelos almoços deliciosos;

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, pela longa e acolhedora amizade. E ainda, pela disponibilidade de equipamentos e cessão dos carrapatos necessários para a realização deste estudo;

Aos meus pais, Claudyr e Judith, por me apoiarem em todas as minhas decisões e não medirem esforços para que eu alcance meus objetivos;

Ao meu irmão, Hygor, pelo companheirismo e amizade;

À toda minha família, por acreditarem no meu potencial e torcerem pelo meu sucesso;

Ao Gustavo, por estar sempre ao meu lado, me fazendo ver o lado bom de todas as coisas e me incentivando a acreditar nos meus sonhos;

Aos meus amigos, que compreenderam minha ausência e nunca me abandonaram;

À CAPES pela bolsa concedida;

E aos membros presentes na banca, por suas contribuições que aprimorarão este trabalho.

“Eu posso contribuir apenas com uma gota de água para o oceano mas, com minha gota, ele jamais será o mesmo.”

(Madre Teresa de Calcutá)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
<i>Rhipicephalus microplus</i>	16
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato.....	17
Controle de carrapatos.....	19
Controle de carrapatos com substâncias de origem vegetal.....	20
Interações entre substâncias de origem vegetal utilizadas como pesticidas.....	25
Controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> na fase não parasitária.....	28
Referências Bibliográficas.....	32
CAPÍTULO I - Sinergismo entre timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae) e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Acari: Ixodidae).....	40
Resumo.....	41
Introdução	42
Material e Métodos.....	44
Local do estudo.....	44
Obtenção dos carrapatos.....	44
Obtenção e diluição das substâncias.....	45
Teste de pacote de larvas.....	45
Análise dos dados.....	47
Resultados.....	47
Discussão.....	52
Conclusões Gerais.....	56
Referências Bibliográficas.....	57
CAPÍTULO II - Atividade acaricida do timol sobre larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae) em condições semi-naturais.....	62
Resumo.....	63
Introdução	64

Material e Métodos.....	65
Local do estudo.....	65
Obtenção dos carrapatos.....	66
Obtenção e diluição do timol.....	66
Preparação dos vasos contendo mudas de <i>Brachiaria decumbens</i>	66
Experimento.....	68
Análise dos dados.....	71
Resultados.....	71
Discussão.....	73
Conclusões Gerais.....	77
Referências Bibliográficas.....	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Concentrações letais de 50% (CL50) do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* s.l., em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$)..... 49
- Tabela 2.** Sinergismo das combinações binárias das substâncias carvacrol, timol e eugenol sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$)..... 50
- Tabela 3.** Sinergismo das combinações binárias das substâncias carvacrol, timol e eugenol sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$)..... 51

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Número médio de larvas vivas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas de vasos tratados com timol em diferentes concentrações e percentual de eficácia dos tratamentos. (média \pm desvio padrão)..... 71
- Tabela 2.** CL50 e CL90 do timol sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* mantidas em condições semi-naturais..... 72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (A) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (B) fazendo a postura de ovos, que posteriormente foram utilizados para os testes *in vitro* com larvas não ingurgitadas..... 44

Figura 2. Realização do teste de pacote de larvas: A: Larvas não ingurgitadas sendo colocadas no centro de papel filtro com dimensões 6 cm x 6 cm; B: Papel filtro dobrado ao meio e fechado nas laterais com cliques binder; C: Papel filtro sendo umedecido com 90 µl da solução testada em cada lado; D: Câmara climatizada com temperatura de 27±1°C e UR>80±10%; E: Contagem do número de larvas vivas e mortas com a utilização de bomba de vácuo..... 46

CAPÍTULO II

Figura 1. A: Vaso preenchido com 20 kg de solo proveniente de áreas de pastagem da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, MG. B: Plantio das mudas de *Brachiaria decumbens*. C: Vasos com fita adesiva nas bordas, mantidos em área com incidência direta de sol e chuva nas instalações externas do Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizada no município de Juiz de Fora..... 67

Figura 2. A: Larvas de *Rhipicephalus microplus* sendo depositadas na base das mudas de *Brachiaria decumbens*. B: Migração das larvas para o ápice das folhas de *B. decumbens*. C: Aplicação do timol nas diferentes concentrações testadas com pulverizador manual..... 69

Figura 3. Vasos contendo larvas de *Rhipicephalus microplus* distribuídos em fileiras, cada uma correspondente a um tratamento com determinada concentração de timol. Os vasos foram mantidos em área aberta com incidência direta de sol e chuva..... 69

Figura 4. A: Corte dos filetes de capim contendo larvas de *Rhipicephalus microplus*. B: Filetes de capim contendo as larvas. C: Contagem das larvas vivas por meio de sucção utilizando uma bomba a vácuo acoplada em uma mangueira de borracha com uma ponteira adaptada na extremidade..... 70

Figura 5. A: Larvas de *Rhipicephalus microplus* do grupo tratado, mortas e ainda aderidas à forrageira; B: Larvas de *R. microplus* do grupo controle, vivas, aglomeradas e caminhando sobre a forrageira..... 72

Atividade do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) em condições laboratoriais e semi-naturais

RESUMO

Substâncias de origem vegetal como óleos essenciais e seus componentes têm demonstrado potencial para serem empregados no controle de diferentes pragas, incluindo carrapatos. Entre essas substâncias destacam-se os monoterpenos timol e carvacrol e o fenilpropanóide eugenol, moléculas que já tiveram sua atividade evidenciada sobre os carrapatos *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* s.l., espécies de grande importância econômica. Apesar da ação isolada dessas substâncias sobre carrapatos ter sido demonstrada *in vitro* em diferentes trabalhos, até o momento não existem estudos sobre o efeito da combinação das mesmas e relato de possível ação sinérgica sobre ixodídeos. Também são escassos os trabalhos que avaliam a atividade dessas substâncias em ambientes naturais ou semi-naturais, visando controlar carrapatos com ações direcionadas sobre a fase não parasitária. Dessa forma, este estudo teve como objetivos, avaliar os efeitos das combinações dos monoterpenos timol e carvacrol e do fenilpropanóide eugenol sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. e avaliar a atividade carrapaticida do timol sobre larvas de *R. microplus* em condições semi-naturais. O primeiro capítulo traz os resultados dos efeitos das combinações das substâncias sobre as larvas desses carrapatos e para esse fim, foi utilizado o teste de pacote de larvas. Primeiramente foi feito o cálculo de CL50 e em seguida essas substâncias foram testadas em associação ou isoladas em concentrações subletais. Para larvas de *R. microplus* foram observados valores de CL50 para o timol, carvacrol e eugenol de 1,53; 1,76 e 4,67 mg/mL, respectivamente, e sinergismo entre todas as nove combinações testadas. Os valores de CL50 do timol, carvacrol e eugenol observados para larvas de *R. sanguineus* s.l., foram de 2,98; 3,29 e 5,19 mg/mL, respectivamente, sendo esse o primeiro estudo a determinar a CL50 dessas substâncias para *R. sanguineus* s.l. Para esta espécie, oito misturas apresentaram efeito sinérgico e apenas a combinação de carvacrol+timol na concentração da CL50, apresentou efeito sinérgico moderado. No segundo capítulo foi observado, pela primeira vez na literatura, que o timol ao ser aplicado em mudas de *Brachiaria decumbens* infestadas artificialmente com larvas de *R. microplus* foi capaz de reduzir

significativamente a infestação por esse carrapato. As maiores concentrações (10, 15, 20, 25 e 30,0 mg/mL) ocasionaram eficácias acima de 95% e os valores encontrados para as CL50 e CL90 foram de 3,45 e 9,25 mg/mL, respectivamente. Conclui-se que associações entre timol, carvacrol e eugenol em concentrações subletais apresentam efeito sinérgico sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. e que o timol apresenta potencial para redução de larvas de *R. microplus* em condições semi-naturais.

Palavras-chave: carrapato dos bovinos, carrapato vermelho do cão, monoterpeno, fenilpropanóide.

Activity of thymol, carvacrol and eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in laboratorial and semi-natural conditions

ABSTRACT

Substances of plant origin, such as essential oils and their components have demonstrated the potential to be used to control different pests, including ticks. Among these substances stand out monoterpenes thymol and carvacrol and the phenylpropanoid eugenol, molecules that already had their activity demonstrated against ticks *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* s.l., species of great economic importance. Despite the isolated action of these substances on ticks has been demonstrated *in vitro* in different papers, until now there are no studies on the effect of the combination of these substances and report of possible synergistic action on ticks. Also there are few studies that evaluate the activity of these substances in natural and semi-natural environments in order to control ticks with targeted actions on the non-parasitic phase. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of combinations of monoterpenes thymol and carvacrol and phenylpropanoid eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* s.l. and evaluate the insecticidal activity of thymol on larvae of *R. microplus* in semi-natural conditions. The first chapter presents the results of the effects of combinations of substances on the larvae of these ticks. For *R. microplus* larvae were observed LC50 values for the thymol, carvacrol and eugenol of 1.53; 1.76 and 4.67 mg/ml, respectively, and synergism between all combinations tested. The LC50 values of thymol, carvacrol and eugenol observed for larvae of *R. sanguineus* s.l., were 2.98; 3.29 and 5.19 mg/ml, respectively. This is the first work reporting the LC50 values of these three substances against *R. sanguineus* s.l. For this species, eight combinations showed synergistic effect and only the combination of carvacrol+thymol in the concentration of LC50, showed moderate synergism. In this study it was observed that the larvae of *R. microplus* were more sensitive to the tested substances and their combinations. In the second chapter it was observed for the first time that thymol when applied in *Brachiaria decumbens* seedlings artificially infested with larvae of *R. microplus* was able to significantly reduce the infestation by this tick. The highest concentrations (10, 15, 20, 25 and 30.0 mg/ml) resulted efficiencies above 95% and the values found for the LC50 and LC90 were 3.45 and 9.25

mg/ml, respectively. It is concluded that associations between thymol, eugenol and carvacrol at sublethal concentrations have a synergistic effect on larvae of *R. microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* s.l. and thymol has the potential for reducing *R. microplus* larvae in semi-natural conditions.

Key-words: brown-dog-tick, cattle tick, monoterpene, phenylpropanoid.

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitos obrigatórios de vertebrados e estão amplamente distribuídos em todo o planeta. O parasitismo por esses artrópodes pode ocasionar diferentes efeitos nocivos à saúde de seus hospedeiros como lesões cutâneas, anemia devido à espoliação sanguínea, transmissão de patógenos e inoculação de toxinas, podendo até levar seus hospedeiros à morte. Atualmente existem aproximadamente 65 espécies descritas no Brasil e dentre essas, destaca-se *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* s.l como espécies de grande importância em sanidade animal (ANDREOTTI & KOLLER, 2013).

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é o principal carrapato encontrado parasitando bovinos, sendo responsável por gerar prejuízos à produtividade na pecuária por causar debilidade, anemia, predisposição a meioses, perda de peso, perdas na produção de carne e leite e desvalorização do couro dos animais (FURLONG *et al.*, 2003; ANDREOTTI, 2010). Além disso, este carrapato é vetor dos agentes etiológicos responsáveis pela anaplasmose e babesiose bovina, doenças que devido às semelhanças na sintomatologia são agrupadas no complexo “Tristeza Parasitária Bovina” (LABRUNA & MACHADO, 2006).

Atualmente, fortes evidências apontam que existem pelo menos duas linhagens de carrapatos no mundo com diferenças biológicas, morfológicas, genéticas e capacidade de vetorização de patógenos sendo denominadas como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). No entanto, o status taxonômico dessa espécie ainda não foi completamente solucionado devido a perda do espécime tipo (NAVA *et al.*, 2015; DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2015). *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato parasita principalmente cães e sua importância médico-veterinária deve-se, sobretudo, à sua capacidade em transmitir os agentes patogênicos causadores da babesiose e erlichiose canina. Além disso, esse ixodídeo pode transmitir aos seres humanos as bactérias *Rickettsia conori* e *R. rickettsii*, agentes etiológicos da Febre Botonosa no Mediterrâneo e da Febre das Montanhas Rochosas nos EUA e México, respectivamente (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). No Brasil, esta espécie é um potencial vetor deste último agente (LABRUNA, 2009).

A utilização de carrapaticidas sintéticos, apesar de apresentar significativa contribuição no controle de carrapatos ao longo da história, atualmente torna-se cada vez menos eficaz devido ao uso contínuo e muitas vezes de forma indiscriminada, levando à seleção de indivíduos resistentes.

Somado a isso, deve-se mencionar também a crescente preocupação com os impactos negativos gerados pela utilização indiscriminada desses produtos, fato que pode levar a contaminação do ambiente e intoxicação de humanos e animais (ELLSE & WALL, 2013). Uma alternativa ao uso desses produtos é a utilização de substâncias de origem vegetal que podem ser extraídas de plantas e que apresentam propriedades carrapaticidas (BORGES *et al.*, 2011).

Dentre essas substâncias encontram-se os monoterpenos timol e carvacrol e o fenilpropanóide eugenol. A atividade carrapaticida dessas substâncias isoladas foi comprovada em estudos *in vitro* sobre larvas de *R. microplus*, *R. sanguineus* s.l., *Dermacentor nitens* e *Amblyomma cajennense* sensu lato (DAEMON *et al.*, 2012a e b; MONTEIRO *et al.*, 2012; SENRA *et al.*, 2013a; SENRA *et al.*, 2013b), ninfas de *R. sanguineus* s.l. e *A. cajennense* s.l. (MONTEIRO *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011) e fêmeas de *R. microplus* (MONTEIRO *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2013; VALENTE *et al.*, 2014). Estudos demonstram que a utilização combinada de substâncias de origem vegetal (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides), quando comparada ao uso isolado das mesmas, pode ser responsável por potencializar a atividade devido à ação sinérgica obtida com certas misturas (PAVELA, 2010).

Ainda sobre o controle de carrapatos, destaca-se que a maioria dos métodos (realidade ou pesquisa) de combate desses artrópodes são destinados a ações sobre a fase parasitária e pouca atenção tem sido dada ao desenvolvimento de métodos de controle sobre as fases não parasitárias. A aplicação de carrapaticidas na pastagem ou locais de repouso dos hospedeiros poderia auxiliar no controle de *R. microplus*, agindo sobre outros estágios do ciclo de vida (LABRUNA, 2004 e 2008), permitindo o desenvolvimento de alternativas auxiliares que possam ser empregadas no manejo integrado, evitando a dependência de apenas um método.

O presente estudo foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa de controle de parasitos com substâncias de origem vegetal desenvolvida no Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora, com o objetivo de propor novas alternativas para o controle de carrapatos. Nesse sentido, o primeiro capítulo foi realizado com o intuito de avaliar o efeito da associação do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l., enquanto no segundo capítulo foi avaliada a atividade do timol sobre larvas de *R. microplus* em condições semi-naturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é originário da Ásia e atualmente ocorre em vários países do mundo. Foi introduzido nas regiões tropicais e subtropicais devido à importação de gado. Sua distribuição na Região Neotropical vai desde o norte da Argentina até o México, incluindo as Ilhas do Caribe e Antilhas, com exceção do Chile, estando presente também no continente Africano (PEREIRA & LABRUNA, 2008). Apesar de ser conhecido como o carrapato dos bovinos, este carrapato também pode parasitar outros hospedeiros, como equinos, ovinos e caprinos.

Em grandes infestações, esse carrapato é responsável por acarretar muitos prejuízos à pecuária brasileira. Os danos causados por sua ação direta são devidos à espoliação sanguínea que causa a irritação dos animais, prurido, anemia, perda de peso, predisposição à miíases e a desvalorização do couro em razão das injúrias ocasionadas pela fixação das peças bucais (FURLONG *et al.*, 2003). Esse artrópode também é capaz de transmitir agentes patogênicos, como os protozoários *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Piroplasmida: Babesidae) e *Babesia bovis* (Babes, 1888) (Piroplasmida: Babesidae), e a bactéria *Anaplasma marginale* que geram doenças classificadas no quadro denominado “Tristeza Parasitária Bovina” (PEREIRA & LABRUNA, 2008; ANDREOTTI, 2010). Além disso, os prejuízos também decorrem da necessidade de um grande investimento por parte do produtor para o controle desse ectoparasito, como a contratação de mão de obra especializada, gastos com instalações e compra de carrapaticidas e equipamentos adequados para a sua aplicação no rebanho (ANDREOTTI, 2010). Estima-se que as perdas anuais decorrentes do parasitismo e tentativa de controle deste ixodídeo, sejam de US\$ 3,24 bilhões no Brasil (GRISI *et al.*, 2014).

Esse carrapato apresenta ciclo monoxeno, ou seja, os processos de muda de larva para ninfa e ninfa para adulto ocorrem sobre o hospedeiro e essa fase tem duração em média de 18-22 dias, podendo chegar até 30 dias. O gado torna-se infestado ao entrar em contato com a pastagem onde existam larvas. Essas larvas sobem no corpo dos animais e se fixam para realizar o repasto sanguíneo, que dura em média 6 a 8 dias. Após isso, sofrem muda para o estágio de ninfa que se alimenta por cerca de 7 a 9 dias, atingindo, posteriormente, o estágio adulto (machos e fêmeas).

Quando fertilizada, a fêmea ingere grande quantidade de sangue e após o ingurgitamento, desprende-se do bovino e cai ao solo onde irá realizar a postura de seus ovos. O macho pode permanecer sexualmente ativo no hospedeiro por até 70 dias (FURLONG *et al.*, 2003; GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

Após caírem no solo, as fêmeas buscam um local com umidade e temperatura adequados para iniciar o processo de postura. Em condições climáticas apropriadas (umidade alta e temperatura entre 24-28°C), uma fêmea pode ovipor 2.000 a 4.000 ovos que resultarão na eclosão de 85-95% das larvas. As larvas sobrevivem por até 30 dias em jejum em locais quentes e mais de 120 dias em locais com condições climáticas amenas (GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

As larvas recém-eclodidas permanecem agrupadas e em repouso na base da vegetação enquanto ocorre o endurecimento da quitina da cutícula por meio do contato com o ar (dura em torno de sete dias) e tal processo confere maior resistência para as larvas contra a dessecação. Após isso, elas se tornam muito ativas, subindo e aglomerando-se na haste ou ponta do capim à espera da passagem de um novo hospedeiro (PEREIRA & LABRUNA, 2008).

2.2 *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) é uma espécie com grande importância econômica, sendo responsável por problemas em saúde pública e principalmente em sanidade animal. No entanto, o status taxonômico dessa espécie não está muito bem esclarecido, uma vez que existem fortes evidências moleculares, biológicas, morfológicas e de capacidade de vetoração de patógenos apontando que existem pelo menos duas linhagens distintas sendo denominadas como *R. sanguineus* (NAVA *et al.*, 2015; DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2015), uma de origem tropical que ocorre do norte do México, América Central, e áreas tropicais da América do Sul que está diretamente relacionada com carrapatos *R. sanguineus* da África do Sul e Moçambique. Enquanto a linhagem temperada que inclui carrapatos de localidades temperadas e frias do sul da América do Sul formaram um clado com carrapatos *R. sanguineus* do oeste da Europa (Espanha, França e Itália). Entretanto, devido à perda do espécime tipo e à vaga descrição original dessa espécie, ainda não foi possível essa reclassificação (NAVA *et al.*, 2015; DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2015). Atualmente pesquisadores têm direcionado esforços para

proposição de um neótipo, para que depois possam ser desenvolvidos estudos que permitam esclarecer os aspectos sobre as espécies crípticas denominadas como *R. sanguineus* ao redor do mundo (NAVA *et al.*, 2015).

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae), mais comumente conhecido como "carrapato-vermelho-do-cão", foi capaz de colonizar áreas habitadas por humanos e caninos em uma ampla faixa de hábitat, provavelmente devido à domesticação de cães. Essa espécie de carrapato é originária da região afrotropical, sendo introduzida nas Américas com a colonização e apresentando, atualmente, distribuição global, com prevalência em regiões subtropicais e tropicais (GUGLIELMONE *et al.*, 2006; GRAY *et al.*, 2013).

A importância médico-veterinária dessa espécie deve-se principalmente à transmissão de agentes patogênicos para os cães, como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES, 2008, GRAY *et al.*, 2013), podendo também, em grandes infestações, causar anemia, abscesso na pele e paralisia dos animais (GRAY *et al.*, 2013). Este carrapato também é responsável por transmitir doenças para os seres humanos, sendo incriminado como vetor da *Rickettsia conori* (agente etiológico da Febre Botonosa) na região do Mediterrâneo (SOUSA & BACELLAR, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2005) e de *R. rickettsii* nos EUA e México (BUSTAMANTE & VARELA, 1947; DEMMA *et al.*, 2005). No Brasil, esse ixodídeo é considerado como potencial vetor deste último agente (LABRUNA, 2009; PACHECO *et al.*, 2011), fato reforçado por relatos recentes sobre o parasitismo dessa espécie em humanos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006; LOULY *et al.*, 2006; GUGLIELMONE *et al.*, 2006), somado ao fato que esse agente já foi isolado de *R. sanguineus* s.l. no Brasil (PACHECO *et al.*, 2011).

Seu ciclo de vida é trioxeno e as mudas de larva para ninfa e ninfa para adulto ocorrem no ambiente. As larvas e ninfas permanecem no hospedeiro por cerca de 3 a 7 dias, enquanto as fêmeas permanecem em média de 5 a 10 dias e os machos, mais de 15 dias. Após esse período, os estágios ingurgitados se desprendem e buscam locais protegidos, como fendas e rachaduras de parede ou no solo para sofrer ecdise ou fazer a oviposição (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES, 2010). As fêmeas ingurgitadas e fertilizadas realizam a postura de cerca de 1.000 a 3.000 ovos (LABRUNA, 2004). O tempo que as formas de vida livre podem sobreviver no ambiente é variado. BELLATO & DAEMON (1997) realizaram um estudo em laboratório, em que em temperatura controlada de 27°C, as larvas sobreviveram até 77 dias sem se alimentar. Essa estimativa foi de até 94 dias para ninfas e 195 dias para adultos. Por ser um carrapato de

hábito nidícola, *R. sanguineus* s.l. é encontrado, em todas as fases de seu ciclo de vida, em habitações ou locais de repouso de seus hospedeiros.

2.3 Controle de carrapatos

O controle do carrapato dos bovinos, *R. microplus*, é feito, principalmente, com a aplicação de carrapaticidas sintéticos sobre os animais. Para obter-se um maior sucesso no controle, o mais indicado é a realização de um controle estratégico que preconiza o uso de carrapaticidas nas épocas desfavoráveis à sobrevivência dos carrapatos na pastagem, sendo necessário o conhecimento sobre sua biologia e interações com o meio ambiente. No entanto, o que acontece, na maioria das propriedades, é a realização do controle apenas nos períodos em que é observado um grande número de fêmeas ingurgitadas no rebanho. Além disso, a escolha do produto é feita sem critérios técnicos e sua troca acontece de maneira indiscriminada. Outros cuidados também não são tomados, como a correta preparação do produto e a aplicação nos intervalos necessários para o controle efetivo (FURLONG *et al.*, 2003; FURLONG *et al.*, 2007; FURLONG & PRATA, 2013).

Assim como para *R. microplus*, o controle de *R. sanguineus* s.l. é feito utilizando-se produtos químicos sintéticos. São indicados carrapaticidas à base de piretróides para aplicação no ambiente, uma vez que os carrapatos observados sobre os cães representam apenas 5% da população, estando os 95% restantes, em locais de repouso de seus hospedeiros. Nos cães, devem ser aplicados produtos de longa ação e até mesmo, a utilização de coleiras impregnadas com carrapaticidas, que possuem longa persistência terapêutica sobre o hospedeiro (LABRUNA, 2004). A frequência dos tratamentos depende do grau de infestação e a duração do efeito residual do carrapaticida, sendo necessário um exame regular dos animais. A eficácia do tratamento do ambiente irá depender do nível de infestação, da presença de infestações próximas às áreas tratadas, o efeito residual do carrapaticida e das condições ambientais. Além disso, a aplicação desses produtos no ambiente deve ser feita de maneira adequada, pois o uso impróprio desses agentes pode acarretar poluição ambiental e toxicidade para humanos e organismos não-alvo (DANTAS-TORRES, 2008).

O grande risco da utilização de carrapaticidas em longo prazo e de forma indevida é, além da contaminação ambiental e intoxicação de animais e humanos, a ocorrência da seleção de populações de carrapatos resistentes a esses produtos (DANTAS-TORRES, 2008; FURLONG & PRATA, 2013). Estudos têm demonstrado a ocorrência de populações de *R. microplus* resistentes à cipermetrina (SILVA *et al.*, 2005; RECK *et al.*, 2014), ao fipronil (CASTRO-JANER *et al.*, 2010; RECK *et al.*, 2014) e ao clorpirifós, amitraz, ivermectin e fluazuron (RECK *et al.*, 2014). Em *R. sanguineus* s.l., resistência já foi encontrada para o amitraz (MILLER *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005) e à cipermetrina, deltametrina e coumafós (MILLER *et al.*, 2001; BORGES *et al.*, 2007).

É importante lembrar que os carrapaticidas são bens não renováveis e uma vez que a resistência a esses compostos se estabeleça em uma população, ela não poderá ser revertida e o desenvolvimento de novas bases químicas é demorado e necessita de grandes investimentos (FURLONG *et al.*, 2003). Dessa forma, é fundamental a procura por alternativas ao uso desses produtos. Estudos têm demonstrado que substâncias naturais, extraídas de plantas, como óleos essenciais e seus constituintes são agentes promissores no combate a esses ectoparasitos (GOMES *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2013; SENRA *et al.*, 2013a e b).

2.4 Controle de carrapatos com substâncias de origem vegetal

Óleos essenciais são compostos naturais complexos, voláteis e que possuem um forte odor. Esses óleos são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas e desempenham papéis importantes na natureza, atuando na defesa das plantas contra patógenos e predadores e na atração de insetos polinizadores (BAKKALI *et al.*, 2008). Essas substâncias são extraídas de materiais vegetais, principalmente pelo método de destilação a vapor que consiste na evaporação e condensação de líquidos, a fim de produzir, refinar e concentrar óleos essenciais. Os principais constituintes dos óleos essenciais são os terpenóides ou terpenos e os fenilpropanóides, sendo que a concentração dessas substâncias nos óleos de uma mesma espécie vegetal pode variar de acordo com a estação do ano, hora do dia, condições de crescimento e composição genética da planta (PENGELLY, 2004).

Esses óleos ou alguns de seus componentes são utilizados na fabricação de produtos como perfumes e maquiagens. Além disso, devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica e inseticida são largamente empregados na indústria de produtos sanitários, odontológicos, agronômicos como pesticidas, como preservadores, aditivos alimentares e remédios naturais (BAKKALI *et al.*, 2008).

Atualmente tem se intensificado o número de estudos sobre a investigação da ação desses óleos sobre diferentes espécies de carrapatos, buscando novas alternativas de controle que sejam eficientes e ofereçam menos risco para o homem, animais e ambiente. A atividade carrapaticida dos óleos de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus* foi observada por CLEMENTE *et al.* (2010) sobre larvas não ingurgitadas de *A. cajennense* s.l. e *D. nitens*. Esses autores testaram os óleos nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50% e constataram que sobre as larvas de *A. cajennense* s.l. os dois óleos causaram mortalidade acima de 50% apenas na concentração de 50%. Entretanto, sobre larvas de *D. nitens*, os óleos de *E. citriodora* e *C. nardus* causaram mortalidade acima de 80% e 90%, respectivamente, a partir da concentração de 12,5%.

GOMES *et al.* (2012) avaliaram o efeito do óleo de *Lippia sidoides* sobre larvas de *D. nitens* e larvas e fêmeas de *R. microplus*. Os autores observaram mortalidade de 100% para larvas de *R. microplus* na concentração de 15 µl/ml. Para larvas de *D. nitens*, esse percentual de mortalidade só foi observado na concentração de 20 µl/ml. Para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, foi observada eficácia acima de 95% a partir da concentração de 60 µl/ml. Além disso, esses autores realizaram a análise quantitativa dos constituintes químicos por cromatografia do óleo utilizado. Timol (67,6%) e carvacrol (6,3%) foram as principais substâncias constituintes do óleo de *L. sidoides* testado, podendo ser os principais responsáveis pela mortalidade dos ectoparasitos.

Em estudo desenvolvido por CRUZ *et al.* (2013) foi demonstrada a atividade do óleo essencial de *Lippia gracilis* extraído de diferentes genótipos e de seus principais constituintes, timol e carvacrol, sobre larvas não ingurgitadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Concentrações a partir de 4 mg/mL do óleo de *L. gracilis* causaram mortalidade próxima a 100% das larvas de *R. microplus* em todos os genótipos testados. O genótipo LGRA-201 apresentou o menor valor de CL50 (1,31 mg/mL) para larvas e LGRA-106 para fêmeas ingurgitadas (4,66 mg/mL). As substâncias isoladas, carvacrol e timol foram mais ativas que o óleo, apresentando

valores de CL50 para larvas e fêmeas, respectivamente, de 0,22 e 4,46 mg/mL para o carvacrol e 3,86 e 5,50 mg/mL para o timol.

A atividade carrapaticida do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* sobre larvas não ingurgitadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foi demonstrada em estudo desenvolvido por LAGE *et al.* (2015). Esses autores observaram mortalidade acima de 99% das larvas de *R. microplus* a partir da concentração de 15 mg/mL. Para fêmeas, o óleo causou redução significativa no peso da massa de ovos e percentual de eclosão a partir concentração de 60 e 40 mg/mL, respectivamente, sendo verificado também percentual de controle de 96,3%.

Substâncias puras como o timol, carvacrol e eugenol são responsáveis por conferir propriedades biológicas aos óleos essenciais de diferentes espécies vegetais (GALLUCCI *et al.*, 2009). Essas substâncias são denominadas fenóis por possuírem um grupo hidroxila ligado a um anel aromático em suas estruturas químicas e estão presentes em uma grande variedade de plantas. Os fenóis podem apresentar atividade bactericida, antisséptica, anti-helmíntica e inseticida (PENGELLY, 2004). Os monoterpenos, nos quais estão incluídos o timol e o carvacrol, são estruturas formadas pela junção de duas unidades isoprênicas (C 10), apresentando uma grande variedade de estruturas. Substâncias dessa classe são as mais representativas nos óleos essenciais, constituindo 90% dessas misturas (BAKKALI *et al.*, 2008). Os fenilpropanóides, dos quais faz parte o eugenol, são moléculas aromáticas derivadas do fenilpropano. Essas substâncias ocorrem em menor frequência que os terpenos (BAKKALI *et al.*, 2008), no entanto, em certas espécies de plantas são encontrados em quantidades significativas e nos vegetais que ocorrem, são responsáveis por conferir gosto e aroma predominante (SANGWAN *et al.*, 2001).

O timol é uma substância pouco solúvel em água que pode ser encontrada na forma de cristais grandes translúcidos, incolores ou brancos, estando presente nos óleos de tomilho (*Thymus spp.*) e orégano (*Origanum vulgare*), espécies da família Lamiaceae e no óleo do “alecrim-pimenta” (*Lippia sidoides*) que pertence à família Verbanaceae, como também em outras plantas do gênero *Lippia* (PENGELLY, 2004; NEVES, 2009). Estudos *in vitro* têm demonstrado a atividade bactericida (BOTELHO *et al.*, 2007; NOSTRO *et al.*, 2007), nematocida (NTALLI *et al.*, 2011), moluscicida (FERREIRA *et al.*, 2011), inseticida (PAVELA, 2011) e acaricida (CAVALCANTI *et al.*, 2010; GEORGE *et al.*, 2010) deste monoterpeno.

A ação carrapaticida do timol foi comprovada para os estágios de larva e adulto de *R. microplus*. Sobre larvas não ingurgitadas, tanto o timol diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 1%

(NOVELINO *et al.*, 2007), quanto em etanol 50% (SCORALIK *et al.*, 2012) foram capazes de causar mortalidade acima de 99% na concentração de 10 mg/mL. O mesmo foi observado por MONTEIRO *et al.* (2010), que relataram que o timol apresentou eficácia acaricida acima de 90% em todas as concentrações (1,0, 1,5 e 2,0%) testadas sobre fêmeas ingurgitadas. Entretanto, nesse mesmo estudo não foi observada atividade sobre os ovos, uma vez que o percentual de eclosão dos grupos tratados foi semelhante ao observado para o grupo controle (acima de 90%).

Para o carrapato *R. sanguineus* foram feitos estudos da atividade carrapaticida do timol para os estágios de larva, ninfa e adulto. DAEMON *et al.* (2009) avaliaram a atividade acaricida do timol diluído em DMSO 1% sobre larvas ingurgitadas e não ingurgitadas dessa espécie e observaram maior mortalidade das larvas ingurgitadas, utilizando esse tipo de diluição. Em contrapartida, quando o timol foi diluído em etanol 50%, DAEMON *et al.* (2012b) constataram mortalidade acima de 95% para larvas não ingurgitadas de *R. sanguineus* na concentração de 10 mg/mL. Resultado semelhante foi encontrado por SENRA *et al.* (2013). MONTEIRO *et al.* (2009) avaliaram a atividade acaricida do timol diluído em DMSO 1% sobre ninfas ingurgitadas e fêmeas de *R. sanguineus*, sendo observada mortalidade de 100% a partir da concentração de 0,5% (5,0 mg/mL) para ninfas, contudo, no teste com fêmeas foi observada eficácia de apenas 41,41% na maior concentração testada (2,0% = 20 mg/mL).

MENDES *et al.* (2011) testaram as concentrações de 2,5, 5, 10, 15 e 20 mg/mL do timol diluído em DMSO 1% sobre larvas não ingurgitadas e ingurgitadas e ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* s.l. A maior mortalidade observada para larvas não ingurgitadas foi de 94,5% na maior concentração testada (20 mg/mL). Já para larvas ingurgitadas foi observado 100% de mortalidade desde a primeira concentração (2,5 mg/mL) e para ninfas ingurgitadas, a mortalidade de 100% foi observada a partir da concentração de 10 mg/mL. SENRA *et al.* (2013b) testaram as mesmas concentrações de timol (diluído em etanol 50%) sobre larvas e ninfas, não ingurgitadas, de *A. cajennense* s.l. e observaram mortalidade de 100% a partir da concentração de 5,0 mg/mL para larvas e 10,0 mg/mL para ninfas. Esses resultados evidenciam que a diluição do timol em etanol, potencializa o efeito dessa substância para os instares não ingurgitados.

O efeito carrapaticida do timol em solução hidroetanólica, também foi verificado para larvas de *D. nitens* no estudo conduzido por DAEMON *et al.* (2012b), em que foi demonstrado que o timol causou mortalidade superior a 90% das larvas de *D. nitens* a partir da concentração de 10,0 mg/mL.

O carvacrol possui forma líquida de coloração amarelo claro e também é pouco solúvel em água. Essa substância é um monoterpene isômero do timol, possuindo um grupo hidroxila localizado em local diferente na sua estrutura molecular. Esse monoterpene é o principal constituinte dos óleos essenciais de plantas aromáticas da família Lamiaceae, como o orégano e o tomilho (PENGELLY, 2004; NEVES, 2009). Assim como o timol essa substância demonstrou atividade sobre bactérias (BOTELHO *et al.*, 2007; NOSTRO *et al.*, 2007), nematóides (NTALLI *et al.*, 2011), insetos (PAVELA, 2011) e ácaros (CAVALCANTI *et al.*, 2010).

Com relação a estudos com carrapatos, pesquisas evidenciaram a atividade dessa molécula sobre larvas de *D. nitens* (SENRA *et al.*, 2013a), larvas e fêmeas de *R. microplus* (CRUZ *et al.*, 2013), larvas e ninfas de *R. sanguineus* s.l e *A. cajennense* s.l (SENRA *et al.*, 2013b) e ninfas de *Ixodes scapularis* e *A. americanum* (DOLAN *et al.*, 2011). SENRA *et al.* (2013a) observaram mortalidade de 100% das larvas de *R. microplus* e *D. nitens* a partir da concentração de 2,5 mg/mL. Já para larvas e ninfas de *A. cajennense* s.l e *R. sanguineus* s.l. foi observada mortalidade de 100% a partir das concentrações de 5,0 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente (SENRA *et al.*, 2013b).

A principal fonte de eugenol é o óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, planta da família Myrtaceae, no entanto, esse fenilpropanóide também é um dos principais constituintes dos óleos da folha de louro (*Laurus nobilis*), noz-moscada (*Myristica fragrans*) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica*) (PENGELLY, 2004; NEVES, 2009). Essa substância mostrou-se ativa em diferentes estudos sobre ácaros (SPARAGANO *et al.*, 2013), fungos (AMIRI *et al.*, 2008), nematóides (LI *et al.*, 2013) e bactérias (DEVI *et al.*, 2010). A sua atividade carrapaticida já foi comprovada sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *D. nitens* (MONTEIRO *et al.*, 2012), larvas e fêmeas de *R. microplus* (MONTEIRO *et al.*, 2012; VALENTE *et al.*, 2014) e larvas e ninfas não ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l e *A. cajennense* s.l. (SENRA *et al.*, 2013b). MONTEIRO *et al.* (2012) observaram 100% de mortalidade das larvas de *R. microplus* e *D. nitens* a partir da concentração de 5 µl/ml de eugenol, diluído em etanol 50%. Além disso, esses autores avaliaram o tempo para que ocorresse tal mortalidade na concentração de 5 µl/ml e observaram que na primeira hora após o tratamento já havia ocorrido a mortalidade total das larvas das duas espécies. SENRA *et al.* (2013b) testaram cinco concentrações (2,5, 5, 10, 15 e 20 µl/ml) de eugenol, diluído em etanol 50%, sobre larvas e ninfas de *R. sanguineus* s.l e *A. cajennense* s.l. Para *R. sanguineus* s.l. foi observada mortalidade de 100% das larvas e ninfas a

partir da concentração de 10 µl/ml. Já para *A. cajennense* s.l, a mortalidade de 100% das larvas só foi observada na concentração de 15 µl/ml e das ninfas, em 20 µl/ml. Em teste com fêmeas ingurgitadas, VALENTE *et al.* (2014) observaram que o eugenol na concentração de 5% foi capaz de inibir 100% da postura de *R. microplus*. Quando testado na concentração de 30%, o eugenol causou a morte de 100% das fêmeas ingurgitadas em apenas 24h após o tratamento. Ainda sobre o eugenol, também foi demonstrado que essa substância apresenta atividade repelente para larvas de *R. microplus* e *D. nitens* (ZERINGOTA *et al.*, 2013).

O modo de ação de muitos óleos essenciais ou seus componentes ainda é desconhecido. Existem evidências de efeitos tóxicos ao sistema nervoso dos insetos (ELLSE & WALL, 2013). Em carrapatos, MATOS *et al.* (2014) observaram o efeito deletério do timol nos ovários de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l., uma vez que as fêmeas expostas a diferentes concentrações dessa substância (1,25; 2,5 e 5,0 mg/mL) apresentaram alterações nos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento.

2.5 Interações entre substâncias de origem vegetal utilizadas como pesticidas

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias e sua atividade biológica irá variar dependendo dos tipos e da quantidade de constituintes presentes na sua composição. Isso porque muitas substâncias contidas nos óleos podem apresentar atividade sinérgica ou antagonista, podendo otimizar ou minimizar a atividade de determinado óleo. Assim, conhecendo-se a natureza desses agentes sinérgicos, é possível desenvolver novas misturas que sejam mais eficazes, diminuindo a quantidade de substâncias utilizadas e ainda assim, atingir níveis satisfatórios de controle (HUMMELBRUNNER & ISMAN, 2001; PAVELA, 2008).

HUMMELBRUNNER & ISMAN (2001) avaliaram o efeito de diferentes monoterpenos (timol, trans-anetol, α -terpineol e citronelal) isolados e em misturas binárias sobre *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae), praga de vegetais e da cultura do tabaco. Esses autores observaram que a substância trans-anetol foi um importante agente sinérgico quando misturada aos demais compostos. A mistura de citronelal com α -terpineol também apresentou efeito sinérgico, enquanto, as misturas de timol com citronelal ou α -terpineol apresentaram apenas efeito aditivo.

Estudando os efeitos sinérgicos de monoterpenos sobre a mortalidade de *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Insecta: Diptera), PAVELA (2008) observou sinergismo entre a substância *p*-cimeno em mistura com γ -terpineno, carvacrol ou 1,8-cineol por meio de testes com aplicação tópica. Efeito aditivo foi verificado nas misturas de eugenol com carvacrol ou γ -terpineno e carvacrol com γ -terpineno. Já nos testes de fumigação, o efeito sinérgico mais significativo foi observado na mistura de γ -terpineno com *p*-cimeno ou 1,8-cineol e na mistura de 1,8-cineol com cimeno ou timol. No entanto, nas misturas de eugenol com *p*-cimeno ou γ -terpineno e na mistura de timol com carvacrol, *p*-cimeno ou γ -terpineno foi verificado efeito aditivo. Apenas a mistura de timol e carvacrol apresentou efeito antagônico, fato incomum, uma vez que a maioria dos estudos presentes na literatura tem evidenciado que a associação dessas substâncias apresenta efeito sinérgico ou aditivo.

SINGH *et al.* (2009) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a toxicidade e ação fagoinibidora, individual e em misturas binárias, das substâncias: linalol, 1,8-cineol, timol, *a*-terpineol, trans-anetol, carvacrol, eugenol e metil eugenol, contra a broca do milho, *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera:Pyralidae). Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que as misturas de timol+linalool ou 1,8-cineol e terpineol+linalool ou 1,8-cineol apresentaram sinergismo no controle das larvas de *C. partellus*. Entretanto, o linalol e o 1,8-cineol apresentaram apenas efeito aditivo quando combinados um com o outro ou com o trans-anetol. Já as diferentes misturas com eugenol, metil eugenol e carvacrol não apresentaram efeito sobre essa espécie.

PAVELA (2010) observou o efeito sinérgico de seis monoterpenos em experimentos de fumigação e aplicação tópica sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae). Nos experimentos com aplicação tópica, nove das quinze misturas testadas apresentaram sinergismo, sendo o efeito sinérgico mais significativo encontrado na mistura de *p*-cimeno com γ -terpineno e carvacrol, não sendo observado efeito antagônico em nenhuma mistura utilizando essa forma de aplicação. Nos experimentos com fumigação, também foi observado sinergismo em nove misturas dos quinze pares testados. Porém, o efeito sinérgico mais acentuado foi observado com a associação de *a*-terpineno com carvacrol e *p*-cimeno com timol ou carvacrol. Nesse método de aplicação foi observado efeito antagônico na mistura de carvacrol com 1,8-cineol.

Avaliação da toxicidade do óleo de *Lippia sidoides* e dos compostos, carvacrol, 1,8-cineol e timol, isolados e em misturas binárias e terciárias sobre o coleóptero *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) foi conduzida em estudo realizado por LIMA *et al.* (2011). Nesses experimentos, todas as misturas, exceto carvacrol+1,8-cineol após 48h (que apresentou efeito antagônico), apresentaram efeito sinérgico sobre adultos de *T. molitor*. O efeito sinérgico mais acentuado foi encontrado nas misturas contendo timol, indicando que essa substância apresenta um importante papel em interações sinérgicas sobre essa espécie de coleóptero.

CHAUBEY (2012) avaliou a repelência, toxicidade aguda e efeitos inibitórios do desenvolvimento de duas substâncias, α -pineno e β -cariofileno, isoladas e em combinação sobre *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). O autor observou que a combinação das duas substâncias apresentou efeito sinérgico, potencializando a ação das mesmas sobre diferentes fases do ciclo de vida deste inseto.

Ao avaliarem a atividade inseticida do óleo essencial de *Geranium maculatum* (gerânio) e o efeito da associação dos seus componentes majoritários, citronellol, geraniol, citronelal e linalol sobre fêmeas do piolho *Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778 (Phthiraptera: Pediculidae), GALLARDO *et al.* (2012) verificaram que as substâncias testadas apresentaram atividade inseticida, sendo observado também efeito sinérgico de todas as misturas.

A avaliação do efeito de misturas binárias de diferentes compostos de óleos essenciais sobre *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Pyralidae) foi realizado por KOUL *et al.* (2013). Nesse estudo, os autores constataram que as espécies apresentaram padrões diferentes de resposta às combinações testadas. Entretanto, o timol e o linalol apresentaram atividade sinérgica sobre as três espécies e o carvacrol apresentou antagonismo quando combinado com todas as outras substâncias testadas (linalol, 1,8-cineol, timol, trans-anetol), também para as três espécies.

Esses estudos demonstram que a combinação de substâncias que apresentam efeito sinérgico entre si age de forma benéfica no controle de pragas, potencializando o efeito das substâncias sem que haja a necessidade de aumentar a dosagem das mesmas.

Estudos sobre a avaliação do efeito da associação de substâncias de origem vegetal sobre carrapatos são escassos, e até o momento, apenas uma pesquisa foi desenvolvida nesse campo de

investigação. Esse estudo foi desenvolvido por NOVATO (2014), que avaliou o efeito da combinação dos monoterpenos timol e carvacrol e do fenilpropanóide (*E*)-cinamaldeído, em diferentes concentrações, sobre larvas não ingurgitadas de *A. sculptum* e *D. nitens*. Os resultados mostraram que todas as combinações de timol+(*E*)-cinamaldeído foram antagônicas para as duas espécies, assim como as combinações de carvacrol+(*E*)-cinamaldeído para *D. nitens*. Sinergismo moderado foi observado nas combinações das CL50 de timol+carvacrol e de 1/4 das CL50 de carvacrol+(*E*)-cinamaldeído sobre *A. sculptum*. Para *D. nitens* ocorreu sinergismo nas combinações de 1/2 da CL50 de carvacrol+timol e na CL50 de carvacrol+timol.

Apesar do teste estatístico mais utilizado para a análise da interação de substâncias ser o qui-quadrado, NOVATO (2014) optou pelo uso do programa CompuSyn® versão 1.0 (CHOU, 2006), que classifica as interações com base em valores de Índices de Combinação (IC). Esse método foi escolhido por tratar-se de uma análise mais sensível às variações na interação de concentrações diferentes das substâncias estudadas.

2.6 Controle de *Rhipicephalus microplus* na fase não parasitária

A aplicação de carrapaticidas químicos sobre animais infestados buscando atingir a parcela da população presente na fase parasitária, é o principal meio de controle utilizado para o combate de infestações por *R. microplus*. Geralmente tal método é repetido diversas vezes ao ano, variando-se de maneira indiscriminada os produtos utilizados, as formas de aplicação e os intervalos de banho (FURLONG *et al.*, 2003).

Um tratamento alternativo que poderia auxiliar no controle desse ectoparasito seria destinar ações de controle direcionadas para a fase não parasitária com intuito de atingir a parcela da população desse artrópode que se encontra no ambiente. Uma possibilidade seria através da aplicação dos carrapaticidas tradicionais sobre a pastagem. Embora ainda não se tenha estudos no Brasil, existem relatos sobre a eficácia desse método de aplicação em outras partes do mundo, sobre outras espécies de carrapatos (LABRUNA, 2008). Contudo, esse tipo de aplicação merece ser avaliado com cuidado, devido aos riscos de contaminação ambiental. Outra alternativa para o combate de populações de *R. microplus*, agindo sobre a fase não parasitária, pode ser feita por meio da aplicação de agentes de controle biológico ou substâncias de origem vegetal, uma vez

que essas formas de controle oferecem menos riscos ao ambiente e aos seres vivos. Estudos sobre essa temática têm sido desenvolvidos principalmente com agentes de controle biológico.

Visando avaliar a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* s.l. (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883 sobre larvas de *R. microplus*, BITTENCOURT *et al.* (2003) desenvolveram um estudo com a pulverização deste fungo nas concentrações de 10^7 e 10^9 conídios/ml, em canteiros de *Brachiaria decumbens*, sendo realizadas três aplicações consecutivas do fungo para avaliar seu efeito cumulativo. Sete dias após cada aplicação foi feita a avaliação do número de larvas vivas presentes nos canteiros. A eficácia total após os três tratamentos foi de 25,86% no tratamento com 10^7 e 40,03% no tratamento com 10^9 conídios/ml. Além disso, foi observado que de um tratamento para o outro ocorreu um aumento gradativo neste percentual, indicando o efeito cumulativo do fungo.

BASSO *et al.* (2005) avaliaram a eficiência de *M. anisopliae* isolado E9, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* presentes em pastagens de *Brachiaria brizantha* e do híbrido Tifton 85 (*Cynodon* spp.). Neste trabalho foi avaliada a recuperação de larvas nas pastagens entre o 35° e o 61° dias após a infestação com as fêmeas. Esses autores observaram, em ambas as pastagens estudadas, redução de 73 a 94%, na quantidade de larvas recuperadas nas parcelas com inoculação de fungo quando comparadas aos grupos controle. Entretanto, o número de larvas recuperadas em todas as coletas foi maior em *B. brizantha*, o que indica haver interferência das diferentes condições microclimáticas determinadas em cada forrageira sobre a biologia do fungo.

Além da aplicação de fungos, também foram conduzidos estudos para avaliação da ação de nematóides entomopatogênicos sobre fêmeas ingurgitadas no momento de oviposição no solo. MONTEIRO (2014) avaliou a patogenicidade dos nematóides *Heterorhabditis bacteriophora* isolados HP88 e LPP30, *Heterorhabditis indica* isolado LPP1 e *Heterorhabditis baujardi* isolado LPP7, em formulação inseto cadáver, para o controle de *R. microplus* por meio de testes em condições semi-naturais. Após 22 dias do início dos tratamentos, os isolados *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis baujardi* LPP7 ocasionaram 100 e 98% de mortalidade das fêmeas, respectivamente. Para os isolados *H. bacteriophora* LPP30 e *H. indica* LPP1, foram observadas taxas de mortalidade máximas de 76% após 22 dias. Além disso, todos os isolados foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) a postura das fêmeas em relação ao grupo controle, com redução mais acentuada nos isolados HP88 e LPP7 (97,2 e 91,9%, respectivamente). Após 65 dias da adição dos insetos cadáveres infectados nos vasos, foi feito um

novo experimento, adicionando-se cinco fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* nos vasos correspondentes aos tratamentos com os isolados HP88 e LPP7. Passados 22 dias desse tratamento foi observado que os isolados HP88 e LPP7 ainda permaneciam ativos, ocasionando percentual de inibição da postura de 59,1 e 43,1%, respectivamente.

A prática de adubação da pastagem por meio de aplicação de ureia também tem se mostrado uma medida promissora para redução da população de *R. microplus* na fase não parasitária. Para avaliar o efeito desse tipo de adubação sobre a biologia reprodutiva de fêmeas de *R. microplus*, CUNHA *et al.* (2008) realizaram um estudo em pastagem de capim Mombaça (*Panicum maximum*), em que fêmeas de *R. microplus* foram depositadas em 10 canteiros e posteriormente, os mesmos foram adubados com 60 gramas de ureia. Após 40 dias, foi arrastada uma flanela branca em cada canteiro, para quantificação do número de larvas. Os autores observaram redução de 85,97% das larvas de *R. microplus* no grupo tratado.

Com relação à aplicação de substâncias de origem vegetal, existem muitos estudos *in vitro*, mas ainda são escassas as investigações *in vivo* e, além disso, ainda não foram realizadas pesquisas no Brasil investigando a ação dessas substâncias por meio de aplicações no ambiente. No entanto, estudos com essa abordagem já foram conduzidos em outros países sobre outras espécies de carrapatos. Investigando a eficácia do nootkatone sobre ninfas e adultos de *Ixodes scapularis* Say, 1821 (Acari: Ixodidae) e ninfas de *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758) (Acari: Ixodidae) e do carvacrol sobre ninfas de *I. scapularis* e *A. americanum* DOLAN *et al.* (2009) testaram essas substâncias durante três anos seguidos, em diferentes concentrações e modos de aplicação na vegetação. A aplicação dos dois produtos na concentração de 5%, utilizando pulverizador costal resultou em 100% de mortalidade das ninfas das duas espécies no primeiro dia após o tratamento. O mesmo foi observado quando o nootkatone 5% foi aplicado sobre adultos de *I. scapularis*, entretanto, após 7 a 14 dias da aplicação, o percentual de controle diminuiu, indicando baixo poder residual. Uma solução encontrada pelos autores foi a utilização de bomba de alta pressão para a aplicação do nootkatone, que foi capaz de manter o percentual de controle acima de 95% para as duas espécies após 42 dias de aplicação.

JORDAN *et al.* (2011) avaliaram a capacidade de duas aplicações de acaricidas naturais derivados de plantas, nootkatone, carvacrol e EcoTrol T&O, em suprimir ninfas de *Ixodes scapularis* e *Amblyomma americanum* em ambiente natural de pastagem. A formulação aquosa de 2% de nootkatone causou mortalidade acima de 90% e 95% de *I. scapularis* e *A. americanum*,

após a primeira e segunda aplicações, respectivamente. Aplicações de carvacrol a 2% e do EcoTrol T&O causaram uma diminuição rápida das duas espécies, mas após 14 dias o controle declinou para menos que 70%. A segunda aplicação elevou o percentual de controle novamente, que foi mantido acima de 85% por até 21 dias.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRI, A.; DUGAS, R.; PICHOT, A. L.; BOMPEIX, G. In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, 126: 13–19, 2008.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 36 p., 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/871264>>. Acesso em: Dezembro de 2014.

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

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

BASSO, L. M. S.; MONTEIRO, A. C.; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; E MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 40(6): 595-600, 2005.

BELLATO, V. & DAEMON, E. Efeitos de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 6(1): 21-27, 1997.

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

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A. MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40: 349-356, 2007.

BORGES, L. M. F.; SOARES, S. F.; FONSECA, I. N.; CHAVES, V. V.; LOULY, C. C. B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, 36(1): 87-95, 2007.

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**, 20(89–96), 2011.

BUSTAMANTE, M. E. & VARELA, G. Distribución de las rickettsiosis en Mexico. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, 8: 3-14, 1947.

- CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J. R.; MENDES, M. C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, 173: 300–306, 2010.
- CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, 101: 829–832, 2010.
- CHAUBEY, M. K. Acute, Lethal and Synergistic effects of some terpenes against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ecologia Balkanica**, 4(1): 53-62, 2012.
- CLEMENTE, M. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SCORALIK, M. G.; GOMES, F. T.; PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 107: 987–992, 2010.
- CRUZ, E.M.O.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.A.; ARAUJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, 195: 198– 202, 2013.
- CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R.; MARTINS, J. R.; RIBEIRO, A. C. C. L.; DOMNGUES, L. N.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; WANDERLEY, R. P. B.; ROSA, R. C. D. Efeito da adubação com ureia em pastagem, sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 17(1): 64-68, 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). **Parasitology Research**, 105: 495–497, 2009.
- DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; FAZA, A.; PRATA, M.C.A.; 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**, 111(5): 1901-1905, 2012a.
- DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. M. O.; GOLDNER, M. S.; MASSONIC, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, 186: 542– 545, 2012b.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(1): 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 152: 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, 3: 26, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B. & DOMENICO OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, 28(10), 2012.

DANTAS-TORRES, F. & OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, 208: 9-13, 2015.

DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.S.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; BLAU, D.M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G.A.; LEVIN, M.L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S.R.; CHEEK, J.E.; SWERCLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected Tick Vector in Arizona. **New England Journal of Medicine**, 353(6): 587-594, 2005.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, 130: 107-115, 2010.

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**, 102(6): 2316-24, 2009.

ELLSE, L. & WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, doi: 10.1111/mve.12033, 2013.

FERREIRA, P.; SOARES, G. L. G.; D'ÁVILA, S.; BESSA, E. C. A. The influence of thymol+DMSO on survival, growth and reproduction of *Bradybaena similaris* (Mollusca: Bradybaenidae). **Zoologia**, 28 (2): 145-150, 2011.

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

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

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

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

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

GEORGE, D. R.; OLATUNJI, G.; GUY, J. H.; SPARAGANO, O. A. E. Effect of plant essential oils as acaricides against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, with special focus on exposure time. **Veterinary Parasitology**, 169: 222–225, 2010.

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

GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PENÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 4: 171– 180, 2013.

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

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

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 715-720, 2001.

JORDAN, R. A.; DOLAN, M. C.; PIESMAN, J.; SCHULZE, T. L. Suppression of host-seeking *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) nymphs after dual applications of plant-derived acaricides in New Jersey. **Journal of Economic Entomology**, 104(2): 659-664, 2011.

- KOUL, O.; SINGH, R.; KAUR, B.; KANDA, D. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. **Industrial Crops and Products**, 49: 428–436, 2013.
- LABRUNA, M. B. Biológica-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, 13: 123–124, 2004.
- LABRUNA, M. B. & MACHADO, R. Z. Capítulo 10: Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. 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, 155-164, 2006.
- LABRUNA, M. B. Capítulo 5: Combate contra *R. (B.) microplus*. In: Pereira, M.C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. P. J.; Klafke, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, controle e resistência. **MedVet Livros**, São Paulo, 65-80, 2008.
- LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1166: 156–166, 2009.
- LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, 148: 124-129, 2015.
- LI, H. Q.; LIU, Q. Z.; LIU, Z. L.; DU, S. S.; DENG, Z. W. Chemical Composition and Nematicidal Activity of Essential Oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, 18: 4170-4180, 2013.
- LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; CARVALHO, S.M.; RODRIGUES, V.G.; GUIMARÃES, L.G.L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 35(4): 664-671, 2011.
- LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; OLIVEIRA, V. F.; BORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, 7(1): 103-106, 2006.
- MATOS, R. S.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. ; FURQUIM, K. ; SAMPIERI, B.; REMEDIO, R.; ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, 113: 4555-4565, 2014.
- MATSUMOTO K, BROUQUI P, RAOULT D, PAROLA P. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 5: 363–372, 2005.

- 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**, 183: 136–139, 2011.
- MILLER, R.J.; GEORGE, J.E; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J.B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **Journal of Medical Entomology**, 38(2): 298-302, 2001.
- 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**, 105:1093–1097, 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**, 106:615–619, 2010.
- MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. S.; FAZA, A.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, 111(3): 1295-1300, 2012.
- MONTEIRO, Caio Márcio de Oliveira. Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) com nematóides entomopatogênicos: aplicação em formulação inseto cadáver e compatibilidade com outros agentes de controle. **Dissertação** (Doutorado em Parasitologia Animal) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2014.
- NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; VENZAL, J. M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLDA, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, 208: 2-8, 2015.
- NEVES, Ana Paula. Ensaio sobre controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* através de processos agroecológicos. **Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, Santa Catarina, 2009.
- NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, 56: 519–523, 2007.
- NOVATO, Tatiane Pinheiro Lopes. Efeito da combinação entre o timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari:Ixodidae) e *Dermacentor nitens*

(Acari:Ixodidae). **Dissertação** (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 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**, 101:809–811, 2007.

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

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R. C.; L ABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, 25: 148–155, 2011.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compounds on the house fly (*Musca domestica* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 11(5): 451-459, 2008.

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

PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, 109:1547–1553, 2011.

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

PEREIRA, M.C. & LABRUNA, M.B. Capítulo 3: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M.C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. P. J.; Klafke, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, controle e resistência. **MedVet Livros**, São Paulo, 15-56, 2008.

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

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, 34: 3–21, 2001.

SCORALIK, M.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, 110 (2):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**, 112(4): 1461-1466, 2013a.
- SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; MATOS, R.; MELO, D.; GOMES, G.; CARVALHO, M.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 112(10): 3471-3476, 2013b.
- SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R.; ARAÚJO, G. M. B.; SANTOS, V. D.; SILVA NETO, A. B.. Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, 01: 59-62, 2005.
- SINGH, R.; KOUL, O.; RUP, P.J.; JINDAL, J. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, 29(2): 93–101, 2009.
- SOUSA, R. & BACELLAR, F. Morbi-mortalidade por *Rickettsia conorii* em Portugal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13: 180–184, 2004.
- SPARAGANO, O.; KHALLAAYOUNE, K.; DUVALLET, G.; NAYAK, S.; GEORGE, D. Comparing terpenes from plant essential oils as pesticides for the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). **Transboundary and Emerging Diseases**, 60(2): 150–153, 2013.
- VALENTE, P.P.; AMORIM, J.M.; CASTILHO, R.O.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, M.F.B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 113:417–423, 2014.
- ZERINGOTA, V. ; SENRA, T. O. S. ; CALMON, F. ; MATURANO, R. ; FAZZA, A. P. ; CATUNDA-JR., F. E. A. ; MONTEIRO, C. M. O. ; CARVALHO, M. G. ; DAEMON, E. . Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 112: 2675-2679, 2013.

CAPÍTULO I

**SINERGISMO ENTRE TIMOL, CARVACROL E EUGENOL SOBRE LARVAS DE
Rhipicephalus microplus (ACARI: IXODIDAE) E *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (ACARI:
IXODIDAE)**

RESUMO

O efeito das combinações dos monoterpenos timol e carvacrol e do fenilpropanóide eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. foram avaliados através do teste de pacote de larvas. Primeiramente, determinou-se a CL50 de cada substância a partir de seis concentrações (0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/mL). Para avaliação das interações entre as substâncias, após a determinação da CL50, cada substância foi testada isolada ou associada (1:1) a outra substância (combinações binárias) na concentração da CL50, além das concentrações de 1/4 e 1/2 da CL50. Para cada teste também foi feito um grupo controle tratado com o solvente (etanol 70° GL) e em todos os experimentos, os grupos foram mantidos em câmaras climatizadas (27±1°C e UR>80±10) individualizadas. Para o cálculo da CL50 de cada substância foi realizada a análise de Probit pelo programa POLOPC®. Os valores de CL50 para *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. foram de 1,53 e 2,98; 1,76 e 3,29; 4,67 e 5,19 mg/mL, para o timol, carvacrol e eugenol, respectivamente, sendo esse o primeiro estudo a determinar as CL50 dessas três substâncias para *R. sanguineus* s.l. Para a avaliação dos efeitos (sinérgico, aditivo e antagônico) das associações foi utilizado o programa CompuSyn para realização do cálculo do índice de combinação (IC). Nas associações sobre larvas de *R. microplus*, as nove combinações testadas apresentaram efeito sinérgico, com IC menor que 0,70. Para *R. sanguineus*, oito misturas apresentaram efeito sinérgico (IC < 0,70) e apenas a mistura contendo carvacrol+timol na concentração da CL50 apresentou efeito sinérgico moderado, com IC entre 0,70 e 0,90. O presente estudo foi o primeiro a determinar a interação dessas substâncias sobre larvas dessas espécies carrapatos. Conclui-se que as combinações entre carvacrol+timol, carvacrol+eugenol e timol+eugenol apresentaram efeito sinérgico sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. Esses resultados poderão servir de subsídio para futuros testes em condições de campo, a fim de validar novas alternativas no manejo integrado de carrapatos, reduzindo a utilização de produtos químicos e, conseqüentemente, os problemas ocasionados por estes produtos.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, carrapato vermelho do cão, controle, fenilpropanóide, monoterpeno.

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é um carrapato originário da Ásia que foi introduzido em outros países juntamente com a importação de gado desse continente para outras regiões do mundo e atualmente encontra-se presente no México e em diferentes países na América Central, América do Sul, África e Ásia (PEREIRA & LABRUNA, 2008; GARCIA *et al.*, 2013). Sua grande importância econômica deve-se aos prejuízos provocados à pecuária bovina devido à espoliação sanguínea que ocasiona perda de peso, estresse, diminuição na produção de carne e leite dos animais, além da desvalorização do couro e predisposição a miíases (GRISI *et al.*, 2002). Além disso, ainda se tem os prejuízos indiretos relacionados à transmissão de patógenos e aos gastos com mão de obra, equipamentos e carrapaticidas para seu combate. No Brasil, as perdas econômicas na pecuária bovina, ocasionadas pelo parasitismo por esse carrapato são estimadas em 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI *et al.*, 2014).

Atualmente sabe-se que no mundo existem pelo menos duas linhagens com diferenças morfológicas, biológicas, genéticas e na capacidade de vetoração de patógenos sendo denominadas como *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (Latreille, 1806). Uma linhagem “tropical” que ocorre em áreas tropicais da América do Sul, no norte do México, América Central, África do Sul e Moçambique e uma linhagem “temperada” que ocorre em localidades temperadas e frias do sul da América do Sul e do oeste da Europa (Espanha, França e Itália) (NAVA *et al.*, 2015). No entanto, até o momento o status taxonômico dessa espécie ainda permanece incerto devido à perda do espécime-tipo, somado ao fato da descrição original da espécie ser muito vaga (NAVA *et al.*, 2015; DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2015). *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) é parasito preferencial de cães e, eventualmente, de outros hospedeiros, incluindo humanos (MILLER *et al.*, 2001; DANTAS-TORRES, 2008 e 2010). Esse carrapato é vetor dos agentes causadores da babesiose e erlichiose caninas (DANTAS-TORRES, 2008). Além disso, apresenta importância para a saúde pública devido à sua capacidade de transmitir patógenos para humanos, como *Rickettsia conori* na região do Mediterrâneo e *Rickettsia rickettsii* em algumas áreas da América do Norte (DEMMA *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, 2006).

O controle desses ectoparasitos é feito principalmente com a utilização de carrapaticidas sintéticos. Embora apresentem contribuição significativa no combate a populações de carrapatos, esses produtos quando utilizados de maneira indiscriminada acabam levando à seleção de populações de carrapatos resistentes, já havendo relatos de populações de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. resistentes a diferentes bases químicas (MARTINS *et al.*, 2006; ANDREOTTI, 2010). Além disso, a má utilização desses produtos pode deixar resíduos nos alimentos e ambiente e levar à intoxicação de animais e de humanos (JONGEJAN & UILENBERG, 2004).

Esses fatos evidenciam a necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle que causem menos impactos negativos. Nesse contexto, a utilização de produtos de origem vegetal tem demonstrado ser uma alternativa promissora ao uso de produtos químicos sintéticos (CHAGAS, 2004). Na natureza, os óleos essenciais são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas, sendo formados por uma mistura de substâncias que desempenham papel importante na proteção das plantas contra predadores e patógenos, sendo que esse efeito pode advir do resultado de sinergia de todas as moléculas que os constituem (BAKKALI *et al.*, 2008).

O timol e o carvacrol são monoterpenos encontrados em óleos essenciais, principalmente em plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) (NTALLI *et al.*, 2011). A atividade acaricida do timol e do carvacrol já foi demonstrada para *A. cajennense* s.l. (Fabricius, 1787) (MENDES *et al.* 2011; SENRA *et al.*, 2013b), *Dermacentor nitens* (Neumann 1897) (DAEMON *et al.*, 2012b; SENRA *et al.*, 2013^a), *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. (MONTEIRO *et al.* 2010; DAEMON *et al.* 2012b; SENRA *et al.*, 2013^a). O eugenol é um fenilpropanóide encontrado em algumas plantas das famílias Myrtaceae, Lauraceae e Lamiaceae cuja atividade carrapaticida já foi verificada para *R. microplus*, *D. nitens* (MONTEIRO *et al.*, 2012), *A. cajennense* s.l e *R. sanguineus* s.l (SENRA *et al.*, 2013b).

Alguns estudos demonstraram que misturas entre diferentes substâncias de origem vegetal possuem ação sinérgica sobre bactérias (DIDRY *et al.*, 1994), nematóides (NTALLI *et al.*, 2011) e insetos (PAVELA, 2010; GALLARDO *et al.*, 2012). Recentemente, NOVATO (2014) avaliou a interação das combinações de carvacrol, timol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *D. nitens* e observou efeito sinérgico entre a associação do timol e carvacrol. Diante deste quadro, o presente estudo teve como objetivo avaliar as interações (sinérgica, aditiva ou antagônica) das misturas entre os monoterpenos carvacrol e timol e do fenilpropanóide eugenol sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP), localizado no Laboratório Avançado de Zoologia, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Obtenção dos carrapatos

Para a obtenção das larvas de *R. microplus* foram utilizadas fêmeas ingurgitadas (Figura 1A) provenientes da estirpe sensível Porto Alegre (POA), mantidas através de infestações artificiais em bovinos alocados na fazenda da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais. As larvas de *R. sanguineus* s.l. utilizadas foram provenientes de fêmeas ingurgitadas (Figura 1B) obtidas por meio de infestações artificiais em coelhos *Oryctolagus cuniculus*, Linnaeus, 1758, através da técnica proposta por NEITZ *et al.* (1971). Para a realização dos experimentos foram utilizadas larvas com idade entre 15 a 25 dias pós-eclosão.

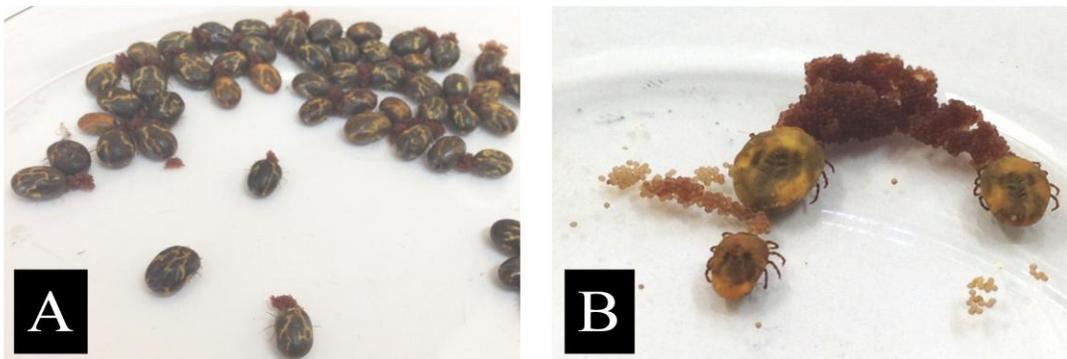


Figura 1. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (A) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (B) fazendo a postura de ovos, que posteriormente foram utilizados para os testes *in vitro* com larvas não ingurgitadas.

2.3 Obtenção e diluição das substâncias

As substâncias utilizadas foram adquiridas comercialmente, juntamente com a emissão de certificados de grau de pureza igual ou superior a 99%. Os cristais de timol foram obtidos da empresa Henrifarma Químicos e Farmacêuticos LTDA e o carvacrol e o eugenol foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich®. Para a diluição das substâncias, foi utilizado etanol 70°GL, solvente que possui baixa toxicidade para larvas não ingurgitadas de *R. microplus* (CHAGAS *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2007) e *R. sanguineus* (CALMON, 2013).

2.4 Teste de pacote de larvas

Para a realização dos experimentos foi empregado o teste de pacote de larvas proposto por STONE & HAYDOC (1962) adaptado por MONTEIRO *et al.* (2012). Nesse método, aproximadamente 100 larvas não ingurgitadas foram colocadas no centro de papel de filtro (Figura 2^a) com dimensões 6 cm x 6 cm, e em seguida, foi dobrado ao meio e fechado nas laterais com cliques binder (Figura 2B). Após isto, cada lado do papel filtro foi umedecido com 90 µl da solução testada (Figura 2C) e, então, os envelopes contendo os carrapatos foram acondicionados em câmara climatizada (27±1°C e UR>80±10%) por 24 horas (Figura 2D). Passado este período, os envelopes foram abertos para a contagem do número de larvas vivas e mortas com a utilização de bomba de vácuo (Figura 2E) para a sucção das larvas vivas após a abertura dos envelopes. O percentual médio da mortalidade foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\left(\frac{\text{N}^\circ \text{ de larvas mortas}}{\text{N total de larvas}} \right) \times 100.$$

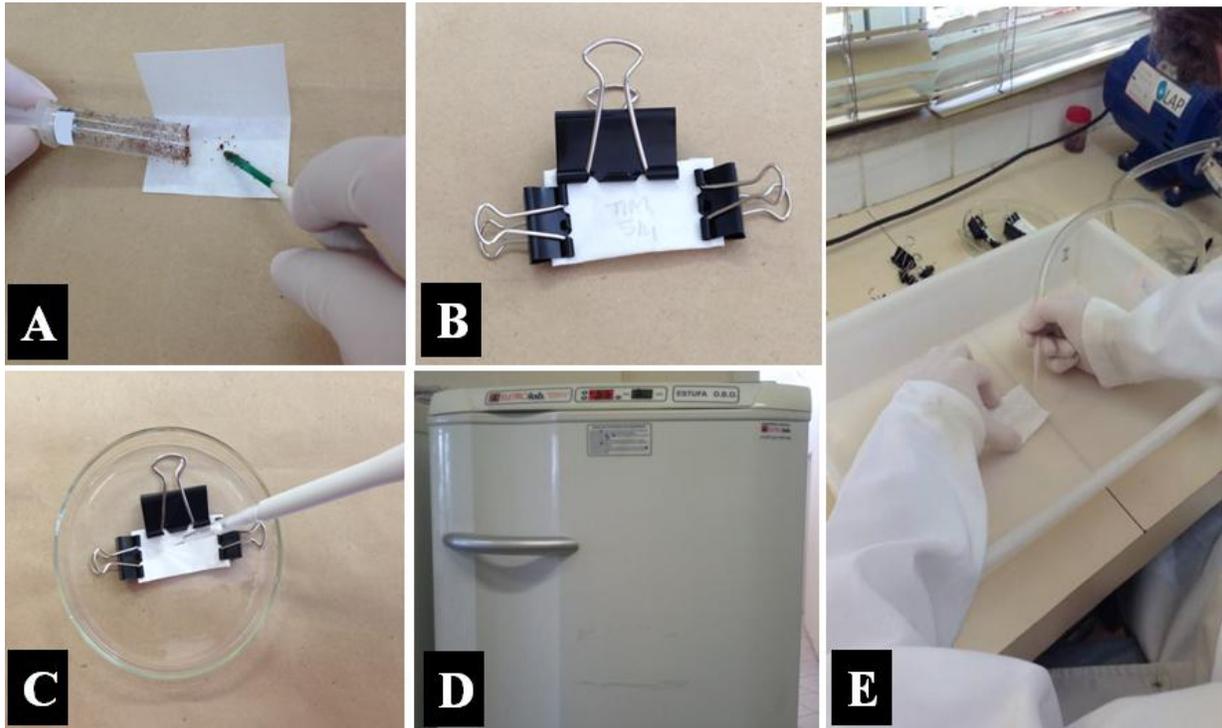


Figura 2. Realização do teste de pacote de larvas: A: Larvas não ingurgitadas sendo colocadas no centro de papel filtro com dimensões 6 cm x 6 cm; B: Papel filtro dobrado ao meio e fechado nas laterais com cliques binder; C: Papel filtro sendo umedecido com 90 μ l da solução testada em cada lado; D: Câmara climatizada com temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$; E: Contagem do número de larvas vivas e mortas com a utilização de bomba de vácuo.

Para a determinação das concentrações letais de 50% (CL50) para o timol, carvacrol e eugenol, foram testadas as concentrações de 0,31, 0,62, 1,25, 2,5, 5,0 e 7,5 mg/mL (cada concentração = um tratamento), selecionadas a partir de testes prévios (dados não publicados). Também foi feito um grupo controle com o solvente (etanol 70°GL). Foram realizadas seis repetições para cada grupo (tratados e controle).

Para avaliação das interações entre as substâncias, após a determinação da CL50, cada substância foi testada isolada e associada (1:1) a outra substância (combinações binárias) na concentração da CL50, além das concentrações de 1/4 e 1/2 da CL50. Para cada grupo foram feitas 10 repetições. Os grupos tratados com cada substância isolada e o controle foram acondicionados em câmaras climatizadas ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$) individuais a fim de se evitar eventuais interferências devido à volatilização das substâncias. A mesma precaução foi adotada

nos testes com as combinações entre as substâncias, sendo cada combinação (grupo tratado) acondicionada individualmente. Esse procedimento foi seguido para as duas espécies de carrapatos.

2.5 Análise dos dados

A análise de Probit foi realizada para calcular os valores das CL50 de cada substância para cada espécie de carrapato (FINNEY, 1971), utilizando o programa POLOPC[®] (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA, USA).

Para a análise das interações entre as substâncias foi utilizado o programa CompuSyn[®] versão 1.0 (CHOU & MARTIN, 2005). Os efeitos das combinações foram classificados de acordo com os resultados do Índice de Combinação (IC), seguindo a classificação proposta por NOVATO (2014): sinergismo (<0,70), sinergismo moderado (0,70-0,90), aditivo (0,90-1,10), antagonismo moderado (1,10-1,45) e antagonismo (>1,45), em adaptação a classificação preconizada por (CHOU & MARTIN, 2005).

3 RESULTADOS

Não foi observada mortalidade no grupo controle, em nenhuma das etapas dos experimentos.

Na determinação da CL50, nos experimentos realizados com larvas de *R. microplus*, foram observados valores similares para timol (1,53 mg/mL) e carvacrol (1,76 mg/mL), com sobreposição dos intervalos de confiança, sendo que tais valores diferiram do observado para o eugenol (4,67 mg/mL) (Tabela 1). Para larvas de *R. sanguineus* s.l. os resultados foram semelhantes, com diferenças dos valores de CL50 do timol (2,98 mg/mL) e carvacrol (3,29 mg/mL) para o valor encontrado para o eugenol (5,19 mg/mL) (Tabela 1).

A atividade das substâncias isoladas e os efeitos das misturas binárias testadas nas concentrações das frações das CL50 para larvas de *R. microplus* são apresentados na Tabela 2. Nos tratamentos com o timol nas concentrações de 1/4 e 1/2 da CL50 e da CL50 foi observado percentual de mortalidade de 0,91, 1,84 e 46,65%, respectivamente, das larvas de *R. microplus*.

Para o carvacrol, nas mesmas concentrações citadas acima, foi observado percentual de mortalidade de 0,51, 8,44 e 37,40%. O eugenol causou mortalidade de 1,59, 5,40 e 51,10% nas concentrações de 1/4 e 1/2 da CL50 e na CL50, respectivamente. Todas as misturas testadas apresentaram efeito sinérgico, não sendo observado efeito aditivo ou antagônico. Os menores valores de IC foram observados nas misturas do timol com o eugenol, quando combinados nas frações de 1/4 e 1/2 da CL50, sendo observados valores de 0,180 e 0,095, respectivamente. Em contrapartida, a mistura com maior valor de IC (0,520) foi a de 1/2 da CL50 de carvacrol+eugenol.

Para larvas de *R. sanguineus* s.l., os percentuais de mortalidade observados para o timol testado nas concentrações de 1/4 e 1/2 da CL50 e na CL50 foram de 0,46, 0,88 e 47,43%, respectivamente. O carvacrol causou mortalidade de 0,31, 4,84 e 49,68%, e o eugenol de 1,33, 1,06 e 33,87%, nessas mesmas concentrações (Tabela 3). Todas as combinações de carvacrol+eugenol e timol+eugenol apresentaram efeito sinérgico ($IC < 0,7$). Para a combinação de carvacrol+timol, foi observado sinergismo nas concentrações de 1/4 e 1/2 da CL50; no entanto, na associação entre as CL50 de cada substância, o grau de sinergismo foi moderado ($IC = 0,890$). Não foi observado efeito aditivo ou antagônico em nenhuma das combinações (Tabela 3) e os menores valores de IC foram observados nas associações do timol+eugenol, nas concentrações de 1/2 da CL50 e na CL50, com valores de 0,286 e 0,178, respectivamente.

Tabela 1 – Concentrações letais de 50% (CL50) do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$).

Espécie	Compostos	CL50 (mg/mL)	Intervalo de confiança (95%)	Slope \pm DP
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Timol	1,53	1,34-1,74	4,30 \pm 5,08
	Carvacrol	1,76	1,57-1,96	4,10 \pm 0,30
	Eugenol	4,67	4,30-5,08	8,88 \pm 0,97
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Timol	2,98	2,66-3,33	5,06 \pm 0,40
	Carvacrol	3,29	2,98-3,63	6,67 \pm 0,57
	Eugenol	5,19	4,55-5,92	3,94 \pm 0,38

Slope = inclinação da reta; DP = desvio padrão.

Tabela 2 - Sinergismo das combinações binárias das substâncias carvacrol, timol e eugenol sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$).

Substância A	Substância B	Fração da CL50	Concentração A+B (mg/mL)	Mortalidade Larval (%) \pm DP				Efeito
				Substâncias isoladas		Combinação		
				A	B	A+B	IC	
Carvacrol	Timol	1/4	0,44+0,38	0,51 \pm 1,60	0,91 \pm 1,94	72,95 \pm 21,85	0.320	Sinergismo
Carvacrol	Timol	1/2	0,88+0,76	8,44 \pm 7,27	1,84 \pm 2,22	93,35 \pm 6,76	0.391	Sinergismo
Carvacrol	Timol	CL50	1,76+1,53	37,40 \pm 22,02	46,65 \pm 37,66	100,0 \pm 0,0	0.439	Sinergismo
Carvacrol	Eugenol	1/4	0,44+1,16	0,51 \pm 1,60	1,59 \pm 2,33	80,58 \pm 21,19	0.292	Sinergismo
Carvacrol	Eugenol	1/2	0,88+2,33	8,44 \pm 7,27	5,40 \pm 9,83	85,81 \pm 22,14	0.520	Sinergismo
Carvacrol	Eugenol	CL50	1,76+4,67	37,40 \pm 22,02	51,10 \pm 31,06	99,79 \pm 0,66	0.268	Sinergismo
Timol	Eugenol	1/4	0,38+1,16	0,91 \pm 1,94	1,59 \pm 2,33	93,89 \pm 10,06	0.180	Sinergismo
Timol	Eugenol	1/2	0,76+2,33	1,84 \pm 2,22	5,40 \pm 9,83	100,0 \pm 0,0	0.095	Sinergismo
Timol	Eugenol	CL50	1,53+4,67	46,65 \pm 37,66	51,10 \pm 31,06	100,0 \pm 0,0	0.192	Sinergismo

Índice de Combinação (IC) < 0,70 = sinergismo; 0,70 – 0,90 = sinergismo moderado; 0,90 – 1,10 = aditivo; 1,10-1,45 = antagonismo moderado; >1,45 = antagonismo (NOVATO, 2014). CL50 = concentração letal de 50%; DP = desvio padrão.

Tabela 3 – Sinergismo das combinações binárias das substâncias carvacrol, timol e eugenol sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$).

Substância A	Substância B	Fração da CL50	Concentração A+B (mg/mL)	Mortalidade larval (%) \pm DP				
				Substâncias isoladas		Combinação		
				A	B	A+B	IC	Efeito
Carvacrol	Timol	1/4	0,82+0,75	0,31 \pm 0,51	0,46 \pm 1,02	35,52 \pm 19,10	0.526	Sinergismo
Carvacrol	Timol	1/2	1,65+1,49	4,84 \pm 3,42	0,88 \pm 1,46	88,99 \pm 13,39	0.537	Sinergismo
Carvacrol	Timol	CL50	3,29+2,98	49,68 \pm 7,61	47,43 \pm 14,22	94,46 \pm 5,94	0.890	Sinergismo moderado
Carvacrol	Eugenol	1/4	0,82+1,30	0,31 \pm 0,51	1,33 \pm 1,86	15,72 \pm 7,13	0.668	Sinergismo
Carvacrol	Eugenol	1/2	1,65+2,60	4,84 \pm 3,42	1,06 \pm 1,41	71,73 \pm 18,56	0.617	Sinergismo
Carvacrol	Eugenol	CL50	3,29+5,19	49,68 \pm 7,61	33,87 \pm 27,76	97,35 \pm 3,16	0.574	Sinergismo
Timol	Eugenol	1/4	0,75+1,30	0,46 \pm 1,02	1,33 \pm 1,86	45,47 \pm 12,90	0.377	Sinergismo
Timol	Eugenol	1/2	1,49+2,60	0,88 \pm 1,46	1,06 \pm 1,41	95,10 \pm 5,91	0.286	Sinergismo
Timol	Eugenol	CL50	2,98+5,19	47,43 \pm 14,22	33,87 \pm 27,76	100,0 \pm 0,0	0.178	Sinergismo

Índice de Combinação (IC) < 0,70 = sinergismo; 0,70 – 0,90 = sinergismo moderado; 0,90 – 1,10 = aditivo; 1,10-1,45 = antagonismo moderado; >1,45 = antagonismo (NOVATO, 2014). CL50 = concentração letal de 50%; DP = desvio padrão.

4 DISCUSSÃO

Apesar da atividade acaricida do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* ter sido demonstrada em diferentes trabalhos (NOVELINO *et al.*, 2007; DAEMON *et al.*, 2009; DAEMON *et al.*, 2012a; DAEMON *et al.*, 2012b; MONTEIRO *et al.*, 2012; SENRA *et al.*, 2013a; SENRA *et al.*, 2013b), até o momento, não haviam sido feito estudos sobre a interação dessas substâncias sobre essas espécies de carrapatos. A atividade sinérgica de combinações do timol+carvacrol foi observada por NOVATO (2014) em estudo com larvas de *A. sculptum* e *D. nitens*. Nesse sentido, o presente estudo foi o primeiro relato a respeito do efeito sinérgico de combinações de timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l.

Em trabalhos anteriores realizados com eugenol (MONTEIRO *et al.*, 2012), timol (SCORALICK *et al.*, 2012) e carvacrol (SENRA *et al.*, 2013a) sobre *R. microplus* foi observado alta mortalidade das larvas desde as menores concentrações testadas, sendo verificados percentuais de mortalidade próximos a 100%. O mesmo foi observado no trabalho de SENRA *et al.* (2013b) com carvacrol e eugenol e DAEMON *et al.* (2012b) com o timol sobre larvas de *R. sanguineus* s.l. Assim, nesses estudos, não foi realizado o cálculo para a determinação das CL50 dessas substâncias, sendo esse o primeiro estudo a determinar as CL50 dessas três substâncias para *R. sanguineus* s.l. As CL50 do timol e carvacrol para *R. microplus* foram determinadas por CRUZ *et al.* (2013) e do eugenol foi determinada em estudos de VALENTE *et al.* (2014). Entretanto, esses autores utilizaram metodologia diferente da utilizada no presente estudo.

Com base nos valores encontrados para a CL50 de cada substância, foi observado que a ordem de atividade das substâncias foi a mesma para as duas espécies de carrapatos, com timol e carvacrol apresentando atividade similar, enquanto o eugenol apresentou menor atividade, com o maior valor de CL50 para as duas espécies. O mesmo foi observado por PAVELA (2010) para o timol e o carvacrol, quando testadas sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) em aplicação tópica dessas substâncias. Em contrapartida, em testes com carrapatos CRUZ *et al.* (2013) observaram maior atividade do carvacrol (CL50= 0,22 mg/mL) quando comparado ao timol (CL50 = 3,86 mg/mL), sobre larvas de *R. microplus*, enquanto NOVATO (2014) realizando testes com *A. sculptum* e *D. nitens*, observou que o timol

apresentou maior atividade que o carvacrol para as duas espécies, com CL50 de 2,04 e 2,17 mg/mL e o carvacrol 3,49 e 3,33 mg/mL, respectivamente. As diferenças encontradas entre os estudos apresentados acima podem estar relacionadas às diferenças nas metodologias utilizadas, procedência das substâncias testadas e diferenças de suscetibilidade entre espécies e cepas de carrapatos. Com relação ao eugenol, a menor atividade dessa substância quando comparada ao timol e carvacrol também foi verificada sobre *Spodoptera litura*, (HUMMELBRUNNER & ISMAN, 2001), *Spodoptera littoralis* (PAVELA, 2010) e *Chilo partellus* (SINGH *et al.*, 2009).

Comparando os valores de CL50 de uma mesma substância para as duas espécies de carrapato, foi possível observar que *R. microplus* foi mais sensível a ação dessas substâncias, uma vez que foram observados menores valores de CL50 para essa espécie. A maior sensibilidade de *R. microplus* a produtos de origem vegetal, quando comparada a sensibilidade de larvas de *R. sanguineus* s.l. vem sendo relatada na literatura. SCORALIK *et al.* (2012), testando o timol sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, observaram mortalidade de 94% na concentração de 2,5 mg/mL, enquanto DAEMON *et al.* (2012b) utilizando a mesma concentração sobre larvas de *R. sanguineus* s.l. observaram mortalidade de 47,5%, sendo verificados valores acima de 90% a partir da concentração de 10 mg/mL. Fato similar foi verificado para o eugenol, uma vez que em testes realizados por MONTEIRO *et al.* (2012), foi encontrado percentual de mortalidade de 99,4% das larvas de *R. microplus* após o tratamento com a concentração de 2,5 µl/ml, enquanto SENRA *et al.* (2013b) observaram, na mesma concentração, mortalidade de apenas 19,2% para larvas de *R. sanguineus* s.l., sendo que mortalidade acima de 90% foi verificada somente a partir da concentração de 5,0 µl/ml. A menor sensibilidade de *R. sanguineus* s.l. à ação do timol pode estar relacionada, segundo DAEMON *et al.* (2009), a uma possível menor permeabilidade cuticular deste carrapato, resultado de sua adaptação às condições climáticas de seu local de origem, o continente Africano.

No presente estudo, a combinação de carvacrol+timol apresentou efeito sinérgico sobre larvas de *R. microplus* desde a menor concentração (1/4 da CL50) combinada de cada substância, onde o percentual de mortalidade chegou a 72,95%, enquanto as substâncias isoladas, nas mesmas concentrações, não causaram sequer 1% de mortalidade das larvas. O mesmo ocorreu para *R. sanguineus* s.l., sendo verificada mortalidade de 35,52% das larvas, na combinação de 1/4 da CL50 de cada substância, enquanto as substâncias isoladas causaram mortalidade inferior a 0,5%. Em estudo com larvas não ingurgitadas de *D. nitens* e *A. sculptum*, NOVATO (2014)

observou interações aditivas e sinérgicas em combinações de carvacrol+timol. A interação sinérgica entre timol e carvacrol também foi observada por LIMA *et al.* (2011) utilizando essa mistura sobre adultos de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758). GOMES *et al.* (2012) observaram que o óleo de *Lippia sidoides* contendo timol (67,6%) e carvacrol (6,3%), apresentou maior atividade carrapaticida do que o timol puro sobre larvas de *D. nitens*. Segundo esses autores, tais resultados podem ocorrer devido à ação sinérgica entre o timol e o carvacrol presentes naquela amostra do óleo. O timol e carvacrol apresentam estruturas químicas isômeras e um grupo hidroxila localizado em locais diferentes no anel fenólico. De acordo com AHMAD *et al.* (2011), o grupo hidroxila aumenta a capacidade hidrofóbica dessas substâncias, ajudando-os a romper células bacterianas. Acredita-se que isto também ocorra nas células das larvas estudadas, fazendo com que a combinação do timol e do carvacrol apresente atividade maior do que a ação das substâncias isoladas.

Embora seja relatado na maioria dos estudos que a associação entre o timol e o carvacrol apresenta efeito sinérgico sobre diferentes organismos, cabe destacar que esse efeito não é sempre verificado. Para larvas das espécies *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Pyralidae), KOUL *et al.* (2013) observaram que o carvacrol apresentou efeito antagônico quando combinado a todas outras substâncias testadas (linalol, 1,8-cineol, trans-anetol), inclusive o timol. Tais fatos demonstram que os resultados encontrados para interações entre substâncias para uma determinada espécie não podem ser extrapolados para outras, uma vez que essa resposta parece ter caráter espécie-específica e pode variar entre grupos taxonômicos distintos.

As demais combinações de carvacrol+eugenol e timol+eugenol, para *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. apresentaram efeito sinérgico. Monoterpenos fenólicos como o timol e o carvacrol e fenilpropanóides como o eugenol demonstram tendência de, em combinação com outras substâncias, serem capazes de aumentar a atividade das misturas (BASSOLÉ & JULIANI, 2012). Este fato foi observado no presente estudo sobre carrapatos e por outros autores sobre bactérias (DIDRY *et al.*, 1994; PEI *et al.*, 2009), insetos (PAVELA, 2008; PAVELA, 2010; LIMA *et al.*, 2011) e nematóides (NTALLI *et al.*, 2011). Em células bacterianas e eucarióticas o timol e o carvacrol, que apresentam natureza hidrofóbica, são capazes de incorporarem-se à membrana celular e fazerem com que esta perca sua alta impermeabilidade, facilitando a entrada de outras

substâncias no citoplasma e sua combinação com proteínas intracelulares (BAKKALI *et al.*, 2008; PEI *et al.*, 2009; AHMAD *et al.*, 2011). Além disso, DEVI *et al.* (2010) observaram que a atividade do eugenol sobre bactérias deve-se à sua capacidade de causar uma ruptura da membrana citoplasmática, aumentando a sua permeabilidade e ocasionando o extravasamento de íons e outros componentes celulares, como as proteínas. Assim, o efeito sinérgico nas associações de timol+eugenol e carvacrol+eugenol, observado no presente estudo está, possivelmente, relacionado ao mecanismo de ação conjunta dessas substâncias sobre a membrana celular de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l.

Todas as combinações avaliadas apresentaram efeito sinérgico para as duas espécies; entretanto, para *R. microplus* a associação das mesmas substâncias apresentou maior sinergismo, sendo observados menores valores de IC quando comparados às mesmas combinações para *R. sanguineus* s.l. Esses resultados estão, provavelmente, ligados ao fato de *R. microplus* ser mais sensível à ação das substâncias isoladas e, dessa forma, mais suscetível ao efeito das combinações, sendo observado maior efeito sinérgico.

O principal objetivo em criar combinações sinérgicas é reduzir a concentração utilizada dessas substâncias e, ainda assim, aumentar sua atividade sobre o organismo alvo, aumentando sua atividade biológica (TRIPATHI *et al.*, 2009). Além disso, a complexidade química de uma mistura diminui a possibilidade da seleção de resistência nos organismos alvo (HARRIS, 2002). Conclui-se que a mistura das concentrações subletais das substâncias testadas apresentam efeito sinérgico para as duas espécies de carrapatos estudadas. Entretanto, o grau de sinergismo entre as substâncias varia de acordo com a concentração combinada, entre as espécies estudadas e, possivelmente, entre os diferentes estágios de uma mesma espécie de carrapato. Dessa forma, são necessárias investigações acerca do efeito dessas combinações para os demais estágios de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l.

5 CONCLUSÕES GERAIS

1. As combinações binárias das doses subletais do timol, carvacrol e eugenol apresentam efeito sinérgico sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l.;
2. O timol e o carvacrol apresentam atividade similar para as duas espécies de carrapatos estudadas devido aos valores encontrados para a CL50 dessas substâncias e à sobreposição dos intervalos de confiança;
3. Com base nos valores determinados para a CL50 de cada substância, foi observado que o eugenol apresenta atividade inferior que o carvacrol e o timol nos testes sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l.
4. *Rhipicephalus microplus* apresenta maior sensibilidade do que *R. sanguineus* s.l. à todas as substâncias e combinações testadas;
5. O grau de sinergismo entre as substâncias varia com a concentração e com a espécie de carrapato estudada.
6. As combinações de timol e carvacrol com o eugenol apresentaram os menores valores de IC para as duas espécies, sendo assim as misturas mais eficientes e que poderiam ser indicadas para futuros testes em campo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, 30: 41–50, 2011.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 36 p., 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/871264>>. Acesso em: Dezembro de 2014.

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

BASSOLÉ, I.H.N & JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, 17: 3989-4006, 2012.

CALMON, Fernanda. Avaliação da toxicidade de solventes e surfactante sobre os estágios imaturos de *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) e estudos preliminares sobre ectoparasitos de aves silvestres de fragmentos de Mata Atlântica na Zona da Mata de Minas Gerais. **Dissertação** (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2013.

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

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13: 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.

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

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.

- DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; FAZA, A.; PRATA, M.C.A.; 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**, 111(5): 1901-1905, 2012a.
- DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. M. O.; GOLDNER, M. S.; MASSONIC, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, 186: 542– 545, 2012b.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(1): 64-67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 152: 173–185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, 3: 26, 2010.
- DANTAS-TORRES, F. & OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, 208: 9-13, 2015.
- DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.S.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; BLAU, D.M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G.A.; LEVIN, M.L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S.R.; CHEEK, J.E.; SWERCLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal of Medicine**, 353(6): 587-594, 2005.
- DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, 130: 107–115, 2010.
- DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, 69: 25-28, 1994.
- FINNEY, D. J. **Probit Analysis, 3rd ed.**; Cambridge University Press: London, U.K., 333 pp, 1971.
- 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**, 49(2): 332-335, 2012.
- GARCIA, M.V.; MATIAS, J. & ANDREOTTI, R. Espécies de carrapatos relatadas no estado de Mato Grosso do Sul. In: Andreotti, R. & Koller, W.W. Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas. **Embrapa**, Brasília-DF, 16-31, 2013.

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

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

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária** 21(125): 8-10, 2002.

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

HARRIS, R. Synergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, 12(4), 2002.

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 715-720, 2001.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, 129: S3–S14, 2004.

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

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

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

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**, 183: 136–139, 2011.

- MILLER, R.J.; GEORGE, J.E; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J.B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **Journal of Medical Entomology**, 38(2): 298-302, 2001.
- 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**, 106:615–619, 2010.
- MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. S.; FAZA, A.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, 111(3): 1295-1300, 2012.
- NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; VENZAL, J. M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLDA, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, 208: 2-8, 2015.
- NEITZ, W. O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H. S. Laboratory investigations on the life cycle of the paralysis tick *Ixodes rubidicundus* (Neumann, 1904). **Journal of Veterinary Research**, 38: 215-224, 1971.
- NOVATO, Tatiane Pinheiro Lopes. Efeito da combinação entre o timol, carvacrol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari:Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari:Ixodidae). **Dissertação** (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 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**, 101:809–811, 2007.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, 67: 341–351, 2011.
- PAVELA, R. Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compounds on the house fly (*Musca domestica* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 11(5): 451-459, 2008.
- PAVELA, R. Acute and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biopesticides**, 3(3): 573 – 578, 2010.
- PEI, R.S.; ZHOU, F.; JI, B.P.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, 74(7): M379-83, 2009.

PEREIRA, M.C. & LABRUNA, M.B. Capítulo 3: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M.B.; Szabó, M. P. J.; Klafke, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, controle e resistência (2008). **MedVet Livros**, São Paulo, 15-56, 2008.

SCORALIK, M.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, 110 (2):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**, 112(4): 1461-1466, 2013a.

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

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

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

TRIPATHI, A.K.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; BHATTACHARYA, P.R. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytoterapy**, 1(5): 052-063, 2009.

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

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ACARICIDA DO TIMOL SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) EM CONDIÇÕES SEMI-NATURAIS

RESUMO

O presente estudo foi o primeiro a avaliar a atividade do timol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* em condições semi-naturais. Para isso foram realizados testes em vasos contendo mudas de *Brachiaria decumbens* infestados artificialmente com larvas dessa espécie e mantidos em área com incidência direta de sol e chuva. O timol, diluído em etanol 50°GL, foi testado nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; e 30,0 mg/mL, sendo formado também um grupo controle tratado com o solvente (etanol 50°GL). Cada tratamento foi composto por cinco vasos (cada vaso = uma repetição), dispostos em fileiras, mantendo a distância de 50 cm entre os tratamentos, com exceção do grupo controle que foi mantido a uma distância maior dos demais tratamentos, para evitar interferências, devido à volatilidade do timol. O experimento foi realizado em três etapas (três dias). No primeiro dia foi feita a aplicação das larvas de *R. microplus* na base das mudas de *B. decumbens*. Depois de 24 horas, após constatar que as larvas já se encontravam no ápice do capim, foi feita a aplicação de aproximadamente 25 mL de solução por vaso, com a concentração correspondente a cada tratamento. A avaliação da sobrevivência das larvas foi feita 24 horas após a aplicação das soluções. Cada vaso foi analisado individualmente e os filetes de capim que continham larvas foram cortados com tesoura, acondicionados em placas de Petri e levados para o laboratório para a realização da contagem das larvas vivas. Nas maiores concentrações (10, 15, 20, 25 e 30,0 mg/mL) foi observada redução acima de 95% no número de larvas vivas em relação ao grupo controle. Entretanto, os tratamentos com as menores concentrações (2,5 e 5,0 mg/mL) não diferiram significativamente do controle ($p > 0,05$), apresentando eficácia abaixo de 60%. Os valores encontrados para as CL50 e CL90 foram de 3,45 e 9,25 mg/mL, respectivamente. Esses resultados permitem concluir que a aplicação do timol em pastagem de *B. decumbens* sob condições semi-naturais, em concentrações a partir de 10 mg/mL, é capaz de controlar infestações de larvas de *R. microplus* com eficácia superior a 95%. Sendo esse o primeiro estudo a avaliar a ação do timol sobre carrapatos em ambientes semi-naturais, os resultados observados servirão de subsídio para futuros estudos em ambientes naturais e para investigações acerca da atividade do timol sobre outros estágios não parasitários de *R. microplus* e as consequências do uso dessa substância no ambiente.

Palavras-chave: *Brachiaria decumbens*, carrapato dos bovinos, condições semi-naturais, timol

1 INTRODUÇÃO

O parasitismo exercido por *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) sobre bovinos prejudica a produtividade na pecuária, uma vez que este ectoparasito pode causar debilidade, anemia, perda de peso, perdas na produção de carne e leite, podendo ainda em grandes infestações levar o animal à morte. Além disso, esse ixodídeo é responsável pela transmissão de agentes patogênicos como os protozoários *Babesia bovis* (Babes, 1888) (Piroplasmida: Babesidae) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Piroplasma: Babesidae), além da bactéria *Anaplasma marginale*, que podem causar a doença cujo quadro clínico é conhecido como “Tristeza Parasitária Bovina” (JONSSON, 2006; ANDREOTTI, 2010). Os prejuízos também ocorrem devido aos gastos com mão de obra e compra de carrapaticidas e equipamentos adequados para o tratamento dos animais (FURLONG *et al.* 2007; ANDREOTTI, 2010). Estima-se que apenas no Brasil, sejam perdidos anualmente US\$ 3,24 bilhões devido ao parasitismo exercido por este carrapato e os gastos com seu controle (GRISI *et al.*, 2014).

A utilização de carrapaticidas sintéticos apresenta significativa contribuição para o controle de carrapatos, no entanto, o uso indiscriminado desses produtos na tentativa de controlar infestações de *R. microplus*, tem se tornado cada vez mais comum, acarretando problemas relativos à contaminação de alimentos (carne e leite) e ambiente e à intoxicação de animais e humanos. Além disso, o uso desses produtos sem critérios técnicos promove a seleção de populações resistentes aos carrapaticidas, demandando assim o desenvolvimento de novas formas de controle (MENDES *et al.*, 2008).

Durante todo o ciclo de vida deste carrapato, apenas cerca de 5% da sua população encontra-se sobre o hospedeiro, sendo que os outros 95% são encontrados no ambiente na forma de larvas infestantes, ovos e fêmeas em período de pré-postura ou postura. Isso indica a necessidade de programas de controle contínuos, pois uma simples aplicação de carrapaticidas sobre o hospedeiro não é capaz de controlar toda a população de carrapatos (PEREIRA & LABRUNA, 2008). Trabalhos realizados em outros países sobre outras espécies de carrapatos demonstraram alta eficácia com a aplicação de piretróides e organofosforados no ambiente, levando à diminuição de até 90% da infestação em áreas tratadas (LABRUNA, 2008). Segundo

LABRUNA (2008), tal iniciativa é merecedora de atenção em futuras pesquisas de controle de *R. microplus*, sem obviamente, deixar de considerar os riscos de contaminação ambiental.

O timol, monoterpene encontrado em óleos essenciais de diferentes espécies de vegetais, principalmente em plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) (NTALLI *et al.*, 2010), é uma substância que possui potencial para esse tipo de aplicação, por apresentar atividade sobre diferentes espécies de carrapatos e por oferecer menor impacto ao ambiente quando comparado aos produtos carrapaticidas comerciais (Isman *et al.*, 2011). Sua eficácia sobre carrapatos foi comprovada *in vitro* para larvas e fêmeas de *R. microplus* (NOVELINO *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2010; SCORALIK *et al.*, 2012), larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* s.l. (Fabricius, 1787) (MENDES *et al.*, 2011; SENRA *et al.*, 2013), larvas, ninfas e fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille, 1806) (MONTEIRO *et al.*, 2009; SENRA *et al.*, 2013) e larvas de *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (DAEMON *et al.*, 2012).

Com relação à contaminação ambiental, estudos têm demonstrado que o timol oferece baixo risco devido à sua rápida dissipação e ao baixo nível de resíduos que são deixados no ambiente (HU & COATS, 2008). Nos Estados Unidos, o timol é considerado um aditivo alimentar seguro à saúde dos humanos pela Agência Food and Drug Administration (FDA). Estudo desenvolvido por JI *et al.* (2005), demonstrou que a aplicação do timol em culturas de tomate para o controle da bactéria *Ralstonia solanacearum* foi capaz de aumentar a produção e qualidade dos frutos devido à diminuição de plantas infectadas. Nos EUA, estudos demonstraram que a aplicação do carvacrol, monoterpene isômero do timol, sobre vegetação infestada por carrapatos foi capaz de reduzir significativamente a densidade populacional de ninfas de *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758) e *Ixodes scapularis* Say, 1821 (DOLAN *et al.*, 2009; JORDAN *et al.*, 2011). Desta forma, o objetivo deste experimento foi avaliar a atividade de diferentes concentrações de timol sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, por meio de testes em condições semi-naturais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP), localizado no Laboratório Avançado de Zoologia, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Obtenção dos carrapatos

Para a obtenção das larvas de *R. microplus*, foram utilizadas fêmeas ingurgitadas provenientes da estirpe sensível Porto Alegre (POA), mantidas através de infestações artificiais em bovinos alocados na fazenda da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais (registro CEUA-EGL 11/2013). Após a obtenção, as fêmeas foram levadas para o laboratório, onde foram lavadas em água destilada, secas em papel toalha, colocadas em placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\%$) para a realização de postura. Após 15 dias do início da postura, os ovos foram pesados em alíquotas de 100 mg, acondicionados em seringas plásticas com extremidade distal cortada, vedadas com algodão hidrófilo e mantidos nas mesmas condições de temperatura e umidade mencionadas anteriormente. Para realização do experimento foram utilizadas larvas com idade de 15 dias pós-eclosão, sendo selecionadas para o experimento seringas com percentual de eclosão acima de 95%.

2.3 Obtenção e diluição do timol

O timol utilizado foi obtido da Empresa Henrifarma Químicos e Farmacêuticos Ltda., com certificado de grau de pureza de 99,9%. No presente estudo, foram utilizadas as seguintes concentrações de timol em solução hidroetanólica (etanol 50°GL): 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; e 30,0 mg/mL. A diluição das substâncias seguiu metodologia utilizada por SCORALIK *et al.* (2012).

2.4 Preparação dos vasos contendo mudas de *Brachiaria decumbens*

Foram utilizados vasos plásticos com dimensões de 25 cm de altura e 26 cm de diâmetro para o plantio das mudas de *Brachiaria decumbens*. Os vasos foram preenchidos com 20 kg de solo proveniente de áreas de pastagem da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, MG (Figura 1A), sem prévia esterilização, visando

manter as condições mais próximas do ambiente natural. Em seguida, aproximadamente seis mudas de *B. decumbens* foram adicionadas em cada vaso (Figura 1B).

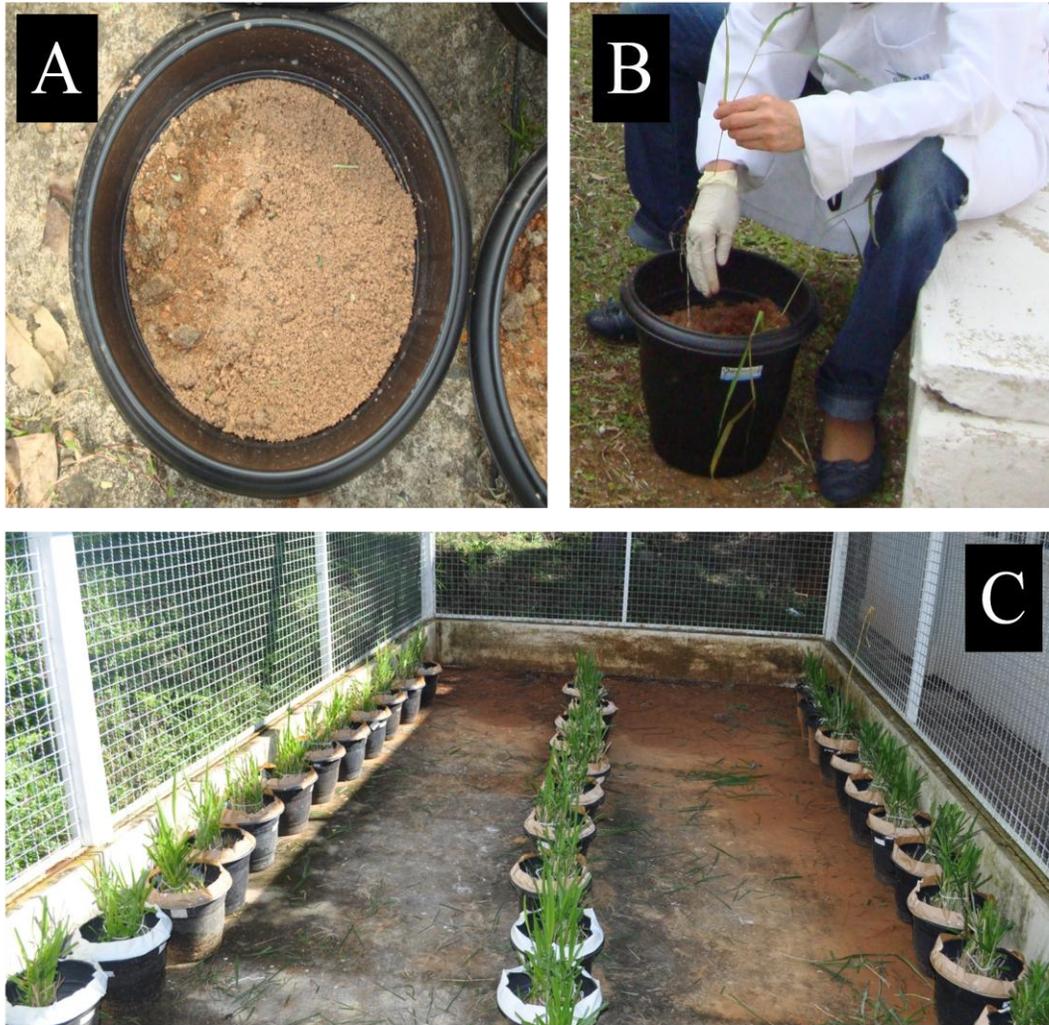


Figura 1. A: Vaso preenchido com 20 kg de solo proveniente de áreas de pastagem da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, MG. B: Plantio das mudas de *Brachiaria decumbens*. C: Vasos com fita adesiva nas bordas, mantidos em área com incidência direta de sol e chuva nas instalações externas do Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizada no município de Juiz de Fora.

Todos os vasos foram mantidos em área com incidência direta de sol e chuva nas instalações externas do Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizada no município de Juiz de Fora (Figura 1C). Os vasos foram molhados diariamente

por todo período anterior ao início do experimento, sendo feita também adubação com uréia para acelerar o crescimento das mudas. No entanto, 30 dias antes do início do experimento, as adubações com ureia foram interrompidas para evitar resíduos desse composto que é tóxico para *R. microplus* (CUNHA *et al.*, 2008). Também foram feitas podas eventuais para manutenção da gramínea apenas na parte central dos vasos e com altura de 40 cm.

2.5 Experimento

A preparação e manutenção dos vasos foram feitas durante os meses de maio a julho e a aplicação dos tratamentos foi feita no início do mês de agosto, do mesmo ano. Todo o experimento foi realizado em 72 horas. No primeiro dia uma fita adesiva foi colada nas bordas dos vasos para impedir a fuga das larvas (Figura 1C). Logo depois foi feita a deposição das larvas na base das mudas de *B. decumbens* em 40 vasos plásticos. Em cada vaso foram depositadas larvas provenientes de 100 mg de ovos previamente acondicionados no interior de uma seringa (Figura 2A).

Após 24 horas, foi feita a observação da migração das larvas para o ápice das folhas de *B. decumbens* em todos os vasos (Figura 2B) e, em seguida, foi feita a aplicação do timol nas diferentes concentrações testadas. Para cada concentração (tratamento) foram escolhidos cinco vasos aleatoriamente, e com a utilização de pulverizador manual foi feita a aplicação de aproximadamente 25 mL da solução em cada vaso (Figura 2C). A aplicação foi concentrada na parte superior das plantas, onde as larvas estavam aglomeradas. Para evitar a contaminação de outros vasos, no momento da pulverização, cada vaso foi levado para uma área isolada, onde foi feita a aplicação e identificação do vaso (com fita adesiva) de acordo com o tratamento. Após essa etapa, os vasos de cada tratamento foram enfileirados na parte externa do Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, com 50 cm de distância entre cada fileira (Figura 3). A aplicação também foi feita sempre pela mesma pessoa para evitar qualquer interferência na forma de aplicação.

Também foi formado um grupo controle com aplicação de etanol 50° GL, solvente que possui baixa toxicidade para larvas de *R. microplus* (CHAGAS *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2007). Devido à volatilidade do timol, os vasos referentes ao grupo controle foram mantidos afastados dos vasos dos grupos tratados.



Figura 2. A: Larvas de *Rhipicephalus microplus* sendo depositadas na base das mudas de *Brachiaria decumbens*. B: Migração das larvas para o ápice das folhas de *B. decumbens*. C: Aplicação do timol nas diferentes concentrações testadas com pulverizador manual.

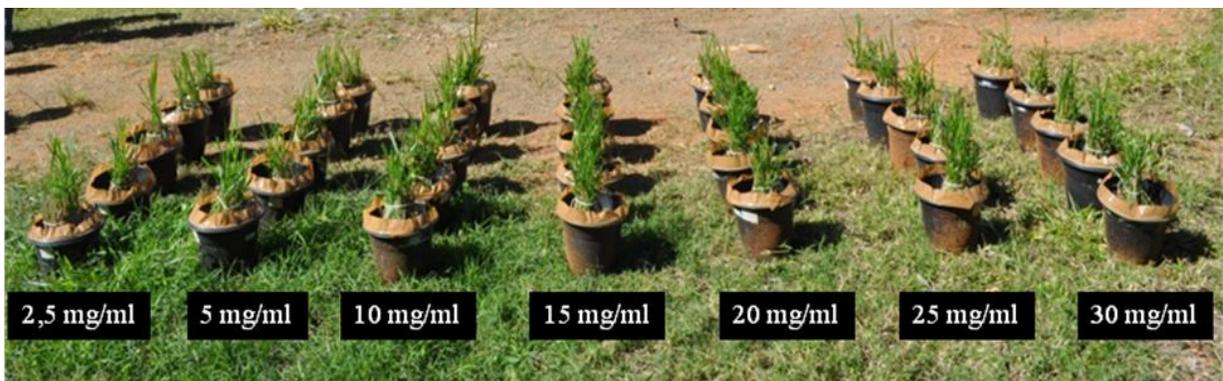


Figura 3. Vasos contendo larvas de *Rhipicephalus microplus* distribuídos em fileiras, cada uma correspondente a um tratamento com determinada concentração de timol. Os vasos foram mantidos em área aberta com incidência direta de sol e chuva.

A avaliação da sobrevivência das larvas foi feita 24 horas após a aplicação das soluções. Cada vaso foi analisado individualmente e os filetes de capim que continham larvas foram cortados com tesoura, acondicionados em placas de Petri (Figura 4A e B) e levados para o laboratório para a realização da contagem das larvas vivas. As larvas foram contabilizadas com utilização de bomba a vácuo acoplada em uma mangueira de borracha com uma ponteira adaptada na extremidade que foi utilizada para sucção de cada larva viva encontrada (Figura 4C). Foram consideradas mortas as larvas que permaneceram imóveis e não responderam a estímulos como exposição ao gás carbônico. Foi feita a comparação entre o número médio de larvas vivas encontrado no grupo controle com número de larvas encontrado em cada tratamento. A eficácia do tratamento foi obtida pela seguinte fórmula: $\% \text{ eficácia} = (A-B \times 100)/A$, segundo BITTENCOURT *et al.* (2003).

Sendo, A = média de larvas vivas no grupo controle e B = média de larvas vivas no grupo tratado.

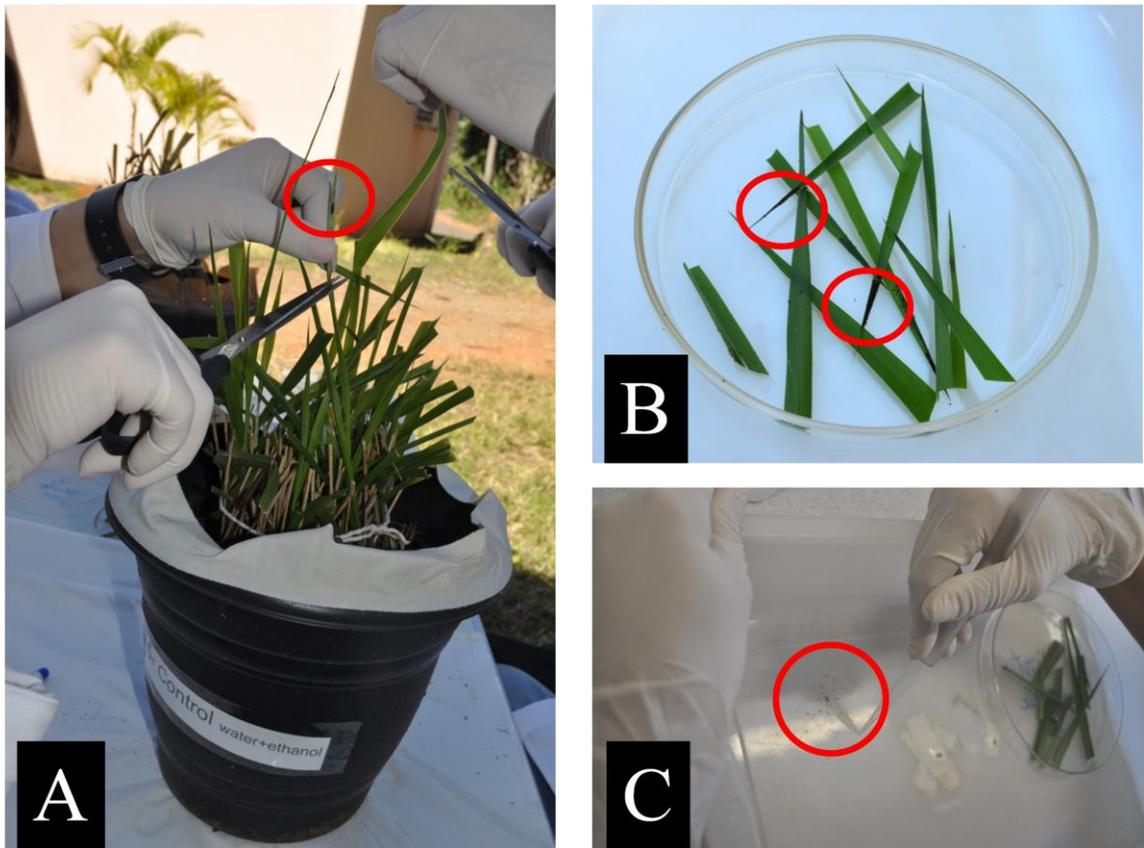


Figura 4. A: Corte dos filetes de capim contendo larvas de *Rhipicephalus microplus*. B: Filetes de capim contendo as larvas. C: Contagem das larvas vivas por meio de sucção

utilizando uma bomba a vácuo acoplada em uma mangueira de borracha com uma ponteira adaptada na extremidade.

2.6 Análise dos dados

Para realização da análise estatística do número médio de larvas vivas em cada tratamento foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis através do software Biostat versão 5.0.

As Concentrações Letais de 50 e 90% (CL50 e CL90) e seus respectivos Intervalos de Confiança (IC 95%) foram calculados pela análise de Probit (FINNEY, 1971), utilizando o programa POLOPC[®] (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA, USA).

3 RESULTADOS

Os resultados do estudo estão apresentados na Tabela 1. Nos tratamentos com as maiores concentrações de timol (10, 15, 20, 25 e 30,0 mg/mL) foi observado em média, menos de 50 larvas vivas por tratamento, diferindo significativamente ($p < 0,05$) no número de larvas vivas do grupo controle (em média 1.079) (Tabela 1) (Figura 5A e B). Nos tratamentos com as concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL, o número médio de larvas vivas foi de 631 e 483, sendo estatisticamente similar ao controle ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Número médio de larvas vivas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas de vasos tratados com timol em diferentes concentrações e percentual de eficácia dos tratamentos. (média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Número médio de larvas vivas \pm Desvio padrão	Eficácia dos tratamentos (%)
Controle (Etanol 50°GL)	1079,6 ^a \pm 514,35	
Timol 2,5 mg/mL	631,6 ^a \pm 229,36	41,49
Timol 5,0 mg/mL	483,4 ^a \pm 133,78	55,22
Timol 10,0 mg/mL	41,0 ^b \pm 15,06	96,20
Timol 15,0 mg/mL	49,6 ^b \pm 39,51	95,40
Timol 20,0 mg/mL	1,4 ^{bc} \pm 0,89	99,87
Timol 25,0 mg/mL	0,2 ^c \pm 0,44	99,98
Timol 30,0 mg/mL	0,2 ^c \pm 0,44	99,98

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si em nível de significância de 5%.

Nas menores concentrações testadas (2,5 e 5,0 mg/mL) a eficácia dos tratamentos foi de 41,49% e 55,22%, respectivamente. Nos demais tratamentos a eficácia foi superior a 90%, chegando a 99% nos tratamentos com as concentrações de 20,0, 25,0 e 30,0 mg/mL de timol (Tabela 1). As CL50 e CL90 da eficácia dos tratamentos foi de 3,45 e 9,25 mg/mL respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – CL50 e CL90 do timol sobre larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* mantidas em condições semi-naturais.

CL50 (mg/mL)	IC (95%)	CL90 (mg/mL)	IC (95%)
3,45	2,89-4,11	9,25	7,71 - 13,16

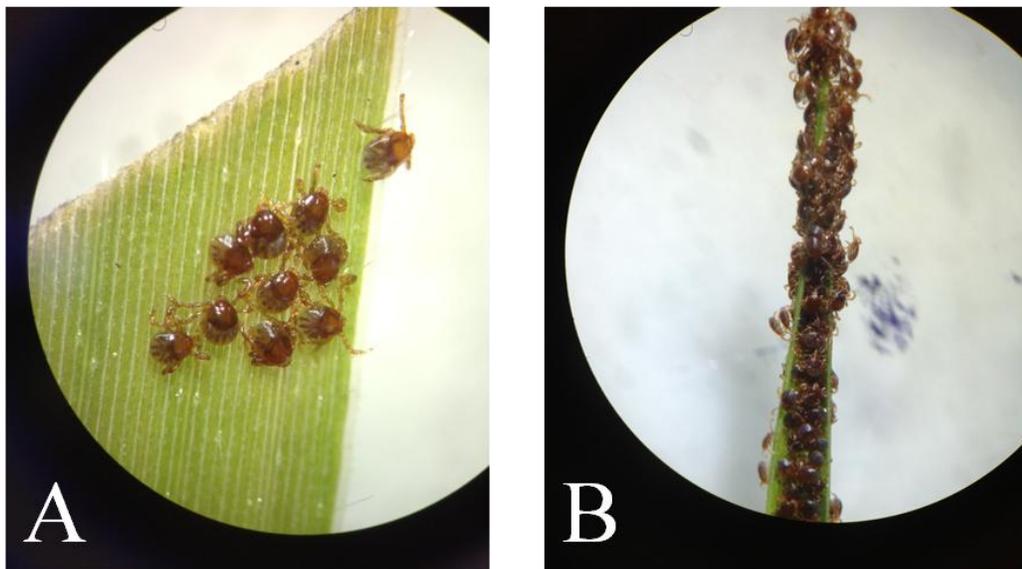


Figura 5. A: Larvas de *Rhipicephalus microplus* do grupo tratado, mortas e ainda aderidas à forrageira; B: Larvas de *R. microplus* do grupo controle, vivas, aglomeradas e caminhando sobre a forrageira.

4 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais e seus constituintes são alternativas promissoras ao uso de compostos químicos sintéticos no controle de pragas, visando diminuir os efeitos negativos dos pesticidas sintéticos (BAKKALI *et al.*, 2008). O timol, monoterpene encontrado no óleo essencial de plantas das famílias Lamiaceae e Verbenaceae (PENGELLY, 2004) já teve sua atividade carrapaticida comprovada em trabalhos *in vitro* sobre larvas (NOVELINO *et al.*, 2007; SCORALIK *et al.*, 2012) e fêmeas (MONTEIRO *et al.*, 2010) de *R. microplus*. Contudo, ainda não existem trabalhos sobre a aplicação do timol no ambiente para o controle de carrapatos, sendo o presente estudo o primeiro a avaliar a atividade do timol sobre larvas de *R. microplus* em condições semi-naturais.

No presente estudo foi observado mortalidade acima de 90% das larvas de *R. microplus* a partir da concentração de 10 mg/mL de timol, enquanto no trabalho desenvolvido por SCORALIK *et al.* (2012) *in vitro*, foi observado o mesmo percentual de mortalidade a partir da concentração de 2,5 mg/mL. Diferenças também foram observadas com relação aos valores de CL50, uma vez que no estudo *in vitro* realizado por ARAÚJO *et al.* (2014) a CL50 observada foi de 1,53 mg/mL, enquanto no presente estudo foi observado valor de 3,45 mg/mL. Tais diferenças podem estar relacionadas ao tipo de metodologia e à maior dissipação do timol em ambientes abertos. Nos trabalhos de SCORALIK *et al.* (2012) e ARAÚJO *et al.* (2014) os experimentos foram desenvolvidos em condições controladas em laboratório utilizando o método de pacote de larvas adaptado por MONTEIRO *et al.* (2012), metodologia que garante o contato contínuo de todas as larvas com o princípio ativo testado e os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada, diferindo das condições do presente estudo.

Apesar de ainda não existirem estudos sobre a aplicação do timol no ambiente para o controle de carrapatos, estudos com essa abordagem já foram feitos com o carvacrol, monoterpene isômero do timol que também é muito comum em óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* (BOTELHO *et al.*, 2007; CAVALCANTI *et al.*, 2010), sendo obtidos resultados satisfatórios. DOLAN *et al.* (2009) verificaram percentual de controle de 100% para ninfas de *Ixodes scapularis* Say, 1821 (Acari: Ixodidae) e *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758) (Acari: Ixodidae) um dia após a aplicação do carvacrol na concentração de 5,0% com utilização

de um pulverizador costal em camada de serapilheira infestada por esses carrapatos. Sete dias após o tratamento, os valores para o percentual de controle para *I. scapularis* e *A. americanum* decaíram para 82,7 e 65,6%, respectivamente. Em outro estudo, JORDAN *et al.* (2011) observaram uma rápida diminuição da população de ninfas de *Ixodes scapularis* e *Amblyomma americanum* quando utilizaram o carvacrol na concentração de 2% em ambiente natural de pastagem, ocorrendo mortalidade acima de 90% das ninfas um dia após o tratamento. No entanto, quatorze dias após o tratamento, a taxa de mortalidade decaiu para 76,7%, sendo necessária uma nova aplicação do produto.

Embora não se tenha estudos com carrapatos, cabe ressaltar que a aplicação do timol no ambiente para o controle de pragas já foi investigada sobre outros organismos. Em pesquisa desenvolvida por JI *et al.* (2005) visando controlar a bactéria *Ralstonia solanacearum* em plantações de tomate, os autores relataram que o timol, na concentração de 0,7% reduziu o percentual de plantas infectadas por essa bactéria (12%), enquanto no grupo controle (tratado com o solvente, etanol 70%) esse percentual foi de 65,5%. Além disso, foi observado maior produtividade de tomates nas parcelas tratadas, uma vez que ocorreu aumento do número e tamanho dos frutos produzidos. Produtos à base de timol também são utilizados com alto percentual de eficácia para o controle do ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000, parasito de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (BAGGIO *et al.*, 2004) e praga de apiários. CASTAGNINO & ORSI (2012) ao avaliar os efeitos do timol isolado sobre *V. destructor* em colônias de abelhas *A. mellifera* africanizadas, observaram que essa substância foi capaz de reduzir a infestação em 67,1%.

Em outros países foram observados bons resultados em estudos que realizaram a aplicação de carrapaticidas sintéticos no ambiente visando controlar a infestação por diferentes espécies de carrapatos (LABRUNA, 2008). MOUNT *et al.* (1999) avaliaram a aplicação de agroquímicos em ambientes não agrícolas para o controle do carrapato *Amblyomma americanum* (Linnaeus). Esse método resultou na redução de 81, 76 e 68% da população de larvas, ninfas e adultos, respectivamente. Quando empregado de maneira integrada com a capina da vegetação, a redução foi de 95, 92 e 87% para larvas, ninfas e adultos. No entanto, a aplicação de agroquímicos no ambiente tem como aspecto desfavorável o risco de contaminação ambiental, fato que pode ser minimizado com a utilização do timol.

MIÑAMBRES *et al.* (2010) avaliaram “*in vitro*” o impacto de diferentes dosagens de timol sobre comunidades microbianas que ocorrem no solo, quando aplicado isoladamente ou em combinação com um fungicida e observaram que a aplicação de timol não alterou significativamente a atividade microbiana e a biomassa de fungos presentes no solo, podendo apenas representar um risco para diminuição das bactérias gram-negativas. Contudo, a aplicação do fungicida no solo causou a diminuição na atividade microbiana e na biomassa de fungos de forma mais acentuadamente que o timol. E ainda nesse estudo, foi possível observar que quando foi feita a aplicação do fungicida em mistura com o timol, esses efeitos negativos foram minimizados.

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) reconhece o timol como um composto seguro devido à sua origem vegetal, considerando que sua utilização em pesticidas registrados não resultará em efeitos adversos para o meio ambiente e para a saúde humana (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- UNITED STATES, 1993). HU & COATS (2008) demonstraram que o timol é rapidamente dissipado tanto na água quanto no solo em condições aeróbicas. Esses autores avaliaram o tempo de dissipação de 50% (TD50) do timol nesses dois ambientes e observaram que na água, a TD50 foi de 16 dias e no solo, de apenas 5 dias, sendo a volatilização a principal via de dissipação.

Segundo ISMAN *et al.* (2011), com raras exceções, os óleos essenciais e seus principais constituintes são relativamente não tóxicos para mamíferos, apresentando valores de DL50 oral aguda em roedores entre 800 a 3.000 mg kg⁻¹ para compostos puros e 5.000 mg kg⁻¹ para produtos formulados. Além disso, devido à sua volatilidade, em geral os óleos e os seus constituintes são ambientalmente não persistentes.

No presente estudo, a aplicação do timol foi feita apenas na parte distal das folhas da forrageira. A aplicação do timol apenas na camada mais elevada da vegetação também pode representar uma alternativa para minimizar ainda mais a possibilidade de impactos ambientais. Nesse contexto, a aplicação nessa camada da vegetação seria direcionada ao combate de larvas infestantes que devido ao comportamento de subir até o ápice do capim, acabariam entrando em contato com a substância. Com relação aos impactos ambientais, esse tipo de aplicação apresenta como aspecto favorável a possibilidade de utilização de menores concentrações, uma vez que as larvas são o estágio mais sensível ao timol (MONTEIRO *et al.*, 2010; SCORALICK *et al.*, 2012), além de evitar que essa substância entre em contato e ocasione algum tipo de interferência em

organismos benéficos que se encontram na base da vegetação e no solo. Esse tipo de aplicação também pode causar diminuição da infestação dos bovinos devido à alteração no comportamento das larvas, uma vez que teste *in vitro* demonstrou que timol também apresenta atividade repelente sobre esse estágio de *R. microplus* (NOVELINO *et al.*, 2007). Assim, a aplicação no ápice da vegetação pode matar as larvas que estão no ápice (fato reproduzido no presente estudo) e repelir as que estão na base da vegetação (possibilidade que merece ser investigada em condições naturais), evitando que essas se desloquem até a parte superior do capim e entrem em contato com o hospedeiro.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que o timol quando aplicado em pastagem de *B. decumbens* sob condições semi-naturais, em concentrações a partir 10 mg/mL é eficaz sobre larvas de *R. microplus*, reduzindo significativamente o número de larvas infestantes. Esses resultados ainda reforçam o potencial da utilização do timol como alternativa aos carrapaticidas químicos sintéticos no controle desse ixodídeo. Entretanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento de estudos em ambientes naturais, além da avaliação do efeito dessa substância sobre organismos não-alvo, inseridos dentro do ambiente de pastagem.

5 CONCLUSÕES GERAIS

1. O timol apresenta atividade sobre larvas de *R. microplus* em condições semi-naturais.
2. Em condições semi-naturais, o timol a partir da concentração a partir da concentração de 10 mg/mL reduz de forma acentuada o número de larvas de *R. microplus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, p. 36, 2010. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/871264>>. Acesso em: Dezembro de 2014.
- ARAUJO, L. X.; NOVATO, T.; MONTEIRO, C. M. O.; FRANCO, C. T.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; SILVA, B. C.; FAZZA, A. P.; DAEMON, E. Avaliação da atividade acaricida do timol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari, Ixodidae) em condições semi-naturais. In: XXXVI Semana de Biologia e XIX mostra de produção científica da UFJF, 2013, Juiz de fora. Anais da XXXVI Semana de Biologia e XIX mostra de produção científica da UFJF, 2013.
- BAGGIO, A.; ARCULEO, P.; NANETTI, A.; MARINELLI E.; MUTINELLI, F. Field trials with different thymol-based products for the control of Varroosis. **American Bee Journal**, 395–400, 2004.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 446–475, 2008.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; SOUZA, E. J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 12(1): 38-42, 2003.
- BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A. MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40: 349-356, 2007.
- CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, 101: 829–832, 2010.
- CASTAGNINO, G. L. B. & ORSI, R. O. Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, 47(6): 738-744, 2012.
- CHAGAS, A. C. S.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; PRATES, H. T.; PASSOS, W. M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, 33(1): 109-114, 2003.

CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R.; MARTINS, J. R.; RIBEIRO, A. C. C. L.; DOMNGUES, L. N.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; WANDERLEY, R. P. B.; ROSA, R. C. D. Efeito da adubação com ureia em pastagem, sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 17(1): 64-68, 2008.

DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. M. O.; GOLDNER, M. S.; MASSONIC, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, 186: 542– 545, 2012.

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**, 102(6): 2316-24, 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. 1993. **Office of Prevention, Pesticides And Toxic Substances**. Disponível em:< <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/3143fact.pdf>>. Acesso em: Dezembro de 2014.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**, 3rd ed.; Cambridge University Press: London, U.K., 333 pp, 1971.

FURLONG J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, 159: 26-32, 2007.

GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; ASCOLI, B.; POSER, G. V.; RIBEIRO, V. L. S. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, 100: 1267–1270, 2007.

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

HU, D.; COATS, J. Evaluation of the environmental fate of thymol and phenethyl propionate in the laboratory. **Pest Management Science**, 64: 775–779, 2008.

ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S. & MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, 10: 197–204, 2011.

JI, P.; MOMOL, M. T.; OLSON, S. M.; PRADHANANG, P. M. Evaluation of Thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. **Plant Disease**, 89(5): 497-500, 2005.

- JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, 137: 1–10, 2006.
- JORDAN, R. A.; DOLAN, M. C.; PIESMAN, J.; SCHULZE, T. L. Suppression of host-seeking *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) nymphs after dual applications of plant-derived acaricides in New Jersey. **Journal of Economic Entomology**, 104(2): 659-664, 2011.
- LABRUNA, M. B. Capítulo 5: Combate contra *R. (B.) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. P. J.; Klafke, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, controle e resistência. **MedVet Livros**, São Paulo, 65-80, 2008.
- MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; PEREIRA, J. R. Práticas de manejo para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) em propriedades localizadas na região de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba, São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, 75(3): 371-373, 2008.
- 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**, 183: 136–139, 2011.
- MIÑAMBRES, G. G.; CONLES, M. Y.; LUCINI, E. I.; VERDENELLI, R. A.; MERILES, J. M.; ZYGADLO, J. A. Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial Communities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26: 161–170, 2010.
- 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**, 106: 615-619, 2010.
- MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. S.; FAZA, A.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, 111(3): 1295-1300, 2012.
- MOUNT, G.A.; HAILE, D.G.; BARNARD,D.R.; DANIELS, E. Integrated management strategies for *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in non-agricultural areas. **Experimental and Applied Acarology**, 23: 827-839, 1999.
- 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**, 101:809–811, 2007.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal

activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, 67: 341–351, 2011.

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

PEREIRA, M.C. & LABRUNA, M.B. Capítulo 3: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M.B.; Szabó, M. P. J.; Klafke, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, controle e resistência (2008). **MedVet Livros**, São Paulo, 15-56, 2008.

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**, 112(4): 1461-1466, 2013.

SCORALIK, 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**, 110: 645–648, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle dos carrapatos em todo o mundo é feito principalmente com a aplicação de produtos carrapaticidas sintéticos sobre os hospedeiros. Embora esses produtos apresentem significativa contribuição para o controle de carrapatos, a utilização indiscriminada cada vez mais recorrente tem sido responsável por ocasionar uma série de problemas como a seleção de indivíduos resistentes, poluição ambiental e malefícios à saúde de animais e humanos. Os custos envolvendo os prejuízos causados devido ao parasitismo por esses ectoparasitos e os gastos na tentativa de controlar essas infestações aumentam a cada ano e o desenvolvimento de novas bases eficazes para esse controle é um processo demorado e que necessita de grandes investimentos.

Devido à dificuldade e os custos para o desenvolvimento de novas drogas carrapaticidas, a busca por moléculas para esses fins a partir da investigação da atividade de óleos essenciais e seus constituintes representa uma alternativa promissora, uma vez que as plantas representam uma grande fonte de moléculas orgânicas com variadas formas de ação. A utilização dessas substâncias de forma associada pode potencializar sua atividade sobre carrapatos, aumentando a chance do desenvolvimento de um produto eficaz. Entre essas substâncias destacam-se o timol, carvacrol e o eugenol, moléculas que já tiveram sua atividade evidenciada sobre larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. No primeiro capítulo foram observadas interações sinérgicas nas combinações binárias de timol, carvacrol e eugenol, em todas as concentrações testadas sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l, evidenciando que tais associações são promissoras para o controle dessas espécies. Embora os resultados sejam animadores, deve-se salientar que são necessários estudos dessas associações sobre outras fases de desenvolvimento dessas espécies de carrapatos.

O potencial carrapaticida de várias substâncias naturais extraídas de plantas foi comprovado em diversos estudos *in vitro*. No entanto, ainda são escassos estudos *in vivo* para comprovar o real potencial de moléculas apontadas como promissoras por meio de testes laboratoriais. Além disso, por serem, em geral, ecologicamente mais seguras do que os produtos químicos, as substâncias de origem vegetal também podem representar uma alternativa para aplicação no ambiente, exercendo o controle sobre a fase não parasitária. Esse método permite o controle dos carrapatos que se encontram no ambiente e que serão responsáveis por uma nova infestação. Sendo assim, a aplicação de carrapaticidas no ambiente pode ser um método

complementar de controle. No segundo capítulo deste estudo foi demonstrado que a aplicação do timol em condições semi-naturais é capaz de reduzir em até 99% o número de larvas não ingurgitadas de *R. microplus* presentes em vegetação de *B. decumbens*. Esses resultados servem de subsídio para futuros testes em condições de campo, a fim de validar novas alternativas no manejo integrado de carrapatos, reduzindo a utilização de produtos químicos e, conseqüentemente, os problemas ocasionados por estes. Entretanto, também devem ser realizados estudos sobre os possíveis impactos ambientais que essa forma de aplicação possa ocasionar.