

Universidade Federal de Juiz de Fora
Faculdade de Ciências Biológicas
Mestrado Em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal

Lívia Senra de Souza Duque

Óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba* sobre *Rhipicephalus microplus*: atividade acaricida, influência dos solventes e busca por frações com maior bioatividade

Juiz de Fora

2021

Lívia Senra de Souza Duque

Óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba* sobre *Rhipicephalus microplus*: atividade acaricida, influência dos solventes e busca por frações com maior bioatividade

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

Orientador: Prof. Dr. Ralph Maturano Pinheiro

Coorientadora: Dra Paula Barroso Cruz Marchesini

Juiz de Fora

2021

Lívia Senra de Souza Duque

Óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba* sobre *Rhipicephalus microplus*: atividade acaricida, influência dos solventes e busca por frações com maior bioatividade

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 título de Mestre.

Aprovada em 30 de Julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Alexander Machado Auad
Emprese Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Gado de Leite/JF

Profª. Dra. Viviane Zeringóta Rodrigues Cotta
Universidade Federal do Mato Grosso

AGRADECIMENTOS

Em especial à Deus por toda força e sabedoria para percorrer meu caminho.

Todo meu carinho e agradecimento à minha mãe *Marly*, minha rainha, minha força, mulher lutadora e guerreira que nunca mediu esforços pelos filhos.

Minha filhota *Brenda*, pedaço de mim, que me completa, me alegra e me empurra para a vida e ao meu AMOR *Bruno*, sempre parceiro, amigo, companheiro e que juntos construímos nossa família e nossas vidas. Sempre acreditaram em mim sem me deixar desanimar. Vocês são incríveis. AMO VOCÊS!!!

Agradeço as minhas irmãs *Luciane* e *Luciana* pelo exemplo a seguir.

Aos meus grandes amigos *Eliane* e *Felipe*, que no decorrer dos anos se tornaram irmãos e insistiram para eu entrar nessa vida alucinante que é a pós graduação.

Agradeço imensamente a toda equipe do Laboratório de Artrópodes Parasito (LAP); *Rafael Nascimento*, por ter me levado para o laboratório, pelas dicas, ajuda e ensinamentos. *Tatiane Novato* pela recepção, ensino e amizade. *Mariana Oliveira* pela parceria, amizade, cumplicidade e as risadas que juntamente com o *Diego Melo* davam vida ao LAP, sem vocês o LAP é muito monótono. E principalmente a *Paula Barroso Marchesini* pelo acolhimento, paciência, grandes ensinamentos, amizade, dedicação e coorientação do meu trabalho. *Paulitinha*, serei eternamente grata a você. Obrigada por tudo!

Agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. *Ralph Maturano* pelo acolhimento, apoio, direcionamento e confiança. Ao Prof. Dr. *Alexander Machado Auad* que me acolheu ainda na graduação e desde então vem contribuindo sempre para meu crescimento acadêmico. Aos colaboradores Prof. Dr. *Caio Márcio de Oliveira Monteiro*, Prof. Dr. *Geovany Amorim Gomes* e a Dra. *Márcia Cristina de Azevedo Prata*, sem a parceria de vocês nada seria possível.

Aos membros presentes na banca, pelas contribuições e aprimoramento deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora – Comportamento e Biologia Animal, principalmente a *Marlú*, *Dayane* e *Priscila* pela atenção e paciência em todas as questões administrativas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Nada é absoluto. Tudo muda, tudo se move, tudo gira, tudo voa e desaparece.”

(Frida Kahlo)

RESUMO

A utilização de produtos naturais na pesquisa de carrapaticidas para o controle de *Rhipicephalus microplus* tem aumentado a cada ano e com resultados promissores. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização fitoquímica dos óleos essenciais (OEs) de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba*, assim como avaliar a atividade acaricida desses OEs em soluções preparadas com a utilização de etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80 sobre larvas e fêmeas de *R. microplus*. Além disso, objetivou-se também a realização do isolamento de três frações de *L. scoparium* e a avaliação da atividade carrapaticida dessas frações nos mesmos estágios já mencionados. Os resultados da cromatografia gasosa e espectrometria de massas evidenciaram que *cis*-calameneno (29,82%), carvacrol (64,85%) e geranial (42,44%) foram os compostos majoritário de *L. scoparium*, *O. vulgare* e *L. cubeba*, respectivamente. Já as frações isoladas de *L. scoparium* foram: A1, rica em hidrocarboneto sesquiterpênico, A2 e A3 ricas em β - tricetonas. Os bioensaios com as larvas não alimentadas foram realizados por meio do teste de imersão de larvas com todos os OEs nas concentrações de 2,5 a 10,0 mg/mL e nas concentrações 0,625 a 10 mg/mL para as três frações obtidas com o OE de *L. scoparium*. Foram observadas mortalidade de 100% das larvas em todas as concentrações tratadas com o OE de *L. scoparium* quando diluídos em DMSO e etanol, bem como nos tratamentos com OE de *O. vulgare* quando diluído em DMSO. Já o OE de *L. cubeba* obteve mortalidade acima de 99% somente nas concentrações de 10mg/mL utilizando os mesmos solventes. Para fêmeas ingurgitadas, foi realizado o teste de imersão nas concentrações de 2,5 a 10,0 mg/mL, sendo observado percentual de controle acima de 90% somente nas maiores concentrações dos OEs de *L. scoparium* e *O. vulgare* quando diluídos em DMSO e etanol. Já o OE de *L. cubeba* não alcançou 90% de controle em nenhum dos tratamentos. Nos testes com as frações de *L. Scoparium* a mortalidade das larvas nas frações rica em β -tricetonas (A2 e A3) foi acima de 97% a partir da concentração de 2,5 mg/mL, enquanto a fração A1, rica em hidrocarbonetos sesquiterpenos, na mesma concentração (2,5 mg/mL), não chegou a 22%. No teste de imersão de fêmeas o percentual de controle foi superior a 98% já na menor concentração (2,5 mg/mL) da fração A1, enquanto nos tratamentos com as frações A2 e A3, os controle foram de 16 e 50%, respectivamente. Sendo assim, podemos concluir que os OEs de *L. scoparium*, *O. vulgare* e *L. cubeba* apresentam atividade acaricida sobre *R. microplus*, bem como as as frações derivadas do OE de *L. scoparium*.

Palavras-chave: acaricida botânico, solventes, β -tricetonas, sesquiterpenos.

ABSTRACT

The use of natural products in the research of tick control for *Rhipicephalus microplus* has increased every year and with promising results. In this sense, the present study performed the phytochemical characterization of the essential oils (EOs) of *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* and *Litsea cubeba*, and evaluated the acaricidal activity of these EOs in solutions prepared using ethanol, dimethylsulfoxide (DMSO) and Tween 80 on larvae and females of *R. microplus*. In addition, the isolation of three *L. scoparium* fractions was also performed and their acaricidal activity was tested in the same stages already mentioned. The results of Gas Chromatography and Mass Spectrometry showed that *cis*-calamenene (29.82%), carvacrol (64.85%) and geranial (42.44%) were the majority compounds of *L. scoparium*, *O. vulgare* and *L. cubeba*, respectively. The isolated *L. scoparium* fractions were: A1, rich in sesquiterpene hydrocarbon, A2 and A3 rich in β -triketones. Bioassays with unfed larvae were performed by immersion test of larvae with all EOs at concentrations from 2.5 to 10.0 mg/mL and at concentrations from 0.625 to 10 mg/mL for the three fractions obtained from *L. scoparium* EO. We observed 100% mortality of larvae in all concentrations treated with *L. scoparium* EO when diluted in DMSO and ethanol, as well as in treatments with *O. vulgare* EO when diluted in DMSO, while *L. cubeba* EO obtained over 99% mortality only in concentrations of 10 mg/mL using the same solvents. For engorged females, the immersion test was performed in concentrations from 2.5 to 10.0 mg/mL. A control percentage above 90% was observed only in the highest concentrations of *L. scoparium* and *O. vulgare* EOs diluted in DMSO and ethanol, while *L. cubeba* EO did not reach 90% control in any of the treatments. In tests with *L. scoparium* fractions, larval mortality in the fractions rich in β -trichetones (A2 and A3) was above 97% at a concentration of 2.5 mg/mL, while in A1 fraction, rich in sesquiterpene hydrocarbons, at the same concentration (2.5 mg/mL), it did not reach 22%. In the Adult Immersion Test, the percentage of control was higher than 98% in the lowest concentration (2.5 mg/mL) of A1 fraction, while in the treatments with fractions A2 and A3, the controls were 16 and 50%, respectively. Thus, we can conclude that the EOs of *L. scoparium*, *O. vulgare* and *L. cubeba* have acaricidal activity on *R. microplus*, as well as the fractions derived from the *L. scoparium* EO.

Keywords: botanical acaricide, solvents, β -trichetones, sesquiterpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial do <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
Figura 3 - <i>Leptospermum scoparium</i>	18
Figura 4 - Fórmulas estruturais dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Leptospermum scoparium</i>	19
Figura 5 - Folhas e flores de <i>Origanum vulgare</i>	21
Figura 6 - Fórmulas estruturais dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	22
Figura 7 - Frutos e folhas de <i>Litsea cubeba</i>	22
Figura 8 - Fórmulas estruturais dos componentes majoritários do óleo essencial <i>Litsea cubeba</i>	23
Figura 9 - Comparação dos solventes no percentual de mortalidade larval dos OEs	33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Composição química, índice de Kovats calculado (IKC), índice de Kovats da literatura (IKLit) (Adams, 2009), percentagens dos componentes identificados e das classes químicas dos óleos de *Leptospermum scoparium* (LS), *Origanum vulgare* (OV) e *Litsea cubeba* (LC) 30
- Tabela 2** - Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba*, em diferentes diluentes (solventes ou surfactante), em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 85 \pm 5\%$) 32
- Tabela 3** - Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão de larvas e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba* em diferentes diluentes (solventes ou surfactante), em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 85 \pm 5\%$) 35
- Tabela 4** - Composição química, índice de Kovats calculado (IKC), índice de Kovats da literatura (IKLit) (Adams, 2009), percentagens dos componentes identificados e das classes químicas as quais eles pertencem (%) nas frações A1, A2 e A3, resultantes do fracionamento cromatográfico do óleo essencial de folhas de *Leptospermum scoparium* (LS) 37
- Tabela 5** - Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes frações do óleo essencial de *Leptospermum scoparium* em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 85 \pm 5\%$) 38
- Tabela 6** - Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes frações do óleo essencial de *Leptospermum scoparium*, em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 85 \pm 5\%$) 39

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

B.O.D -	Biological Oxygen Demand
CG/EM -	cromatógrafo a gás acoplado e a espectrômetro de massas
CCD -	cromatografia de camada delgada
C7-C30 -	n-alcanos
DMSO -	dimetilsulfóxido
EI -	ionização de elétrons
EV -	energia de elétrons
EVZ -	Escola de Veterinária e Zootecnia
GC-MS -	cromatografia a gás - espectrometria de massa
IKC -	índices Kovats calculados
IKLit -	índices Kovats da literatura
LC -	<i>Litsea cubeba</i>
LS -	<i>Leptospermum scoparium</i>
Mg/mL -	miligramas por mililitros
OE -	óleo essencial
OEs -	Óleos essenciais
OV -	<i>Origanum vulgare</i>
TIA -	Teste de Imersão de Adultas
TIL -	Teste de Imersão de Larvas
UR -	Umidade relativa
V/V-	Volume por volume
% -	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	14
2.2	Formas de controle	16
2.2.1	Carrapaticidas comerciais	16
2.2.2	Compostos vegetais	16
2.3	Óleos Essenciais	17
2.3.1	<i>Leptospermum scoparium</i>	18
2.3.1.1	β -tricetonas	20
2.3.2	<i>Origanum vulgare</i>	21
2.3.3	<i>Litsea cubeba</i>	22
2.4	Solventes e surfactantes na solubilização de OEs	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Origem dos carrapatos e obtenção dos óleos essenciais	25
3.2	Obtenção e diluição dos óleos essenciais	25
3.3	Análise dos compostos voláteis por cromatografia a gás - espectrometria de massa (GC-MS)	25
3.4	Fracionamento cromatográfico do óleo essencial de <i>Leptospermum scoparium</i>	26
3.5	Teste de Imersão de Larvas (TIL)	26
3.6	Teste de Imersão de Adultas (TIA)	27
3.7	Análises estatísticas	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Avaliação da atividade acaricida dos OEs de <i>Leptospermum scoparium</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Litsea cubeba</i>	29
4.1.1	Composição química dos óleos essenciais	29
4.1.2	Atividade carrapaticida dos óleos essenciais sobre larvas não alimentadas..	31
4.1.4	Atividade carrapaticida dos óleos essenciais sobre fêmeas ingurgitadas	33
4.2	Avaliação da atividade acaricida das frações do OE de <i>Leptospermum scoparium</i>	36
4.2.1	Composição química das frações do OE de <i>L. scoparium</i>	36

4.2.2	Atividade acaricida das frações do OE de <i>L. scoparium</i> sobre larvas não alimentadas	37
4.2.3	Atividade acaricida das frações do óleo essencial de <i>L. scoparium</i> sobre fêmeas ingurgitadas	38
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES GERAIS	45
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Entre os carrapatos presentes na região Neotropical, destaca-se o exótico carrapato-dos-bovinos, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), como a espécie de maior importância econômica. Somente no Brasil, estimativas apontam que os prejuízos relacionados ao parasitismo deste ixodídeo são de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2014). O controle desse ectoparasito é realizado com o uso de carrapaticidas sintéticos, que, quando utilizados sem critérios técnicos, podem provocar danos à saúde do animal, do ser humano e contaminação ambiental (FURLONG et al., 2004, 2007; AMARAL et al., 2011).

O uso constante e/ou inadequado de carrapaticidas tem resultando em grande pressão de seleção, propiciando o surgimento de populações de *R. microplus* resistentes a todas bases químicas disponíveis no mercado, incluindo a presença de populações multirresistentes (FURLONG et al., 2007; HIGA et al., 2015; KLAFKE et al., 2017; RECK et al., 2014). Pesquisas com óleos essenciais (OEs), extratos vegetais e seus constituintes isolados vêm sendo desenvolvidas no intuito de abordar novas tecnologias para controle desse artrópode (BENELLI; PAVELA, 2018; BORGES, 2011; ELLSE; WALL, 2014; NWANADE et al., 2020). Nesse sentido, os OEs apresentam potencial para o desenvolvimento de produtos com esta finalidade. Os OEs são compostos por uma mistura, que varia de 20 a 60 substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de plantas (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017) e apresentam funções ecológicas que variam desde atração de polinizadores a proteção contra herbívoros e patógenos (ALJAAFARI et al., 2021). Por serem compostos por vários tipos de moléculas, os OEs podem possuir sítios de ações diferentes, levando ao desenvolvimento mais lento de resistência; além disso, por serem compostos biossintetizados, possuem degradação mais rápida quando lançados do ambiente (BORGES, 2011; CATTO, 2013; ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Os produtos naturais extraídos de plantas são usados há milhares de anos para diversos fins, como aditivos para conservar e realçar o sabor dos alimentos, e em medicamentos, cosméticos e biopesticidas. Dentre as várias espécies produtoras de OEs com atividade biocidas, podemos destacar, *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae), arbusto nativo da Nova Zelândia com grande importância econômica, tanto pelo mel quanto pelo óleo essencial (OE) que produz. Sua utilização na indústria tem contemplado vários segmentos, desde suplementos alimentares a preparações farmacêuticas e medicinais (PORTER; WILKINS, 1998), com atividade antimicrobianas e antioxidantes (STEPHENS et al., 2005), atividade

inseticida (DAM et al., 2019; MUTURI et al., 2020) e acaricida (JEONG et al., 2009; FANG et al., 2016). Os OEs de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) e *Litsea cubeba* (Lauraceae) têm sido amplamente estudados e suas atividades vêm sendo demonstrada para diferentes organismos também, como fungos (NARDONI et al., 2019; BURGGRAF; RIENTH, 2020), bactérias (ZHANG et al., 2012; CATTELAN et al., 2013) e insetos (CHAKIRA et al., 2017; XIE et al., 2019).

Na busca por OEs e compostos extraídos de plantas que possuam atividade acaricida, o primeiro passo é a realização de estudos de triagem para avaliar a atividade dos OEs juntamente com a caracterização da composição química da amostra, para identificar as substâncias majoritárias que possam estar relacionadas com a atividade biológica (BEADLES et al., 1973; SPARKS et al., 2017; ADENUBI et al., 2018). Para realização destes testes de triagem, é necessária a diluição desses óleos em solventes ou surfactantes específicos (RAVINDRAN et al., 2011), tais como álcoois, dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80, devido à natureza hidrofóbica das substâncias presentes nos OEs. Alguns estudos demonstraram que a escolha do solvente pode potencializar a atividade dessas substâncias sobre carrapatos (SCORALICK et al., 2012, MATOS et al., 2014).

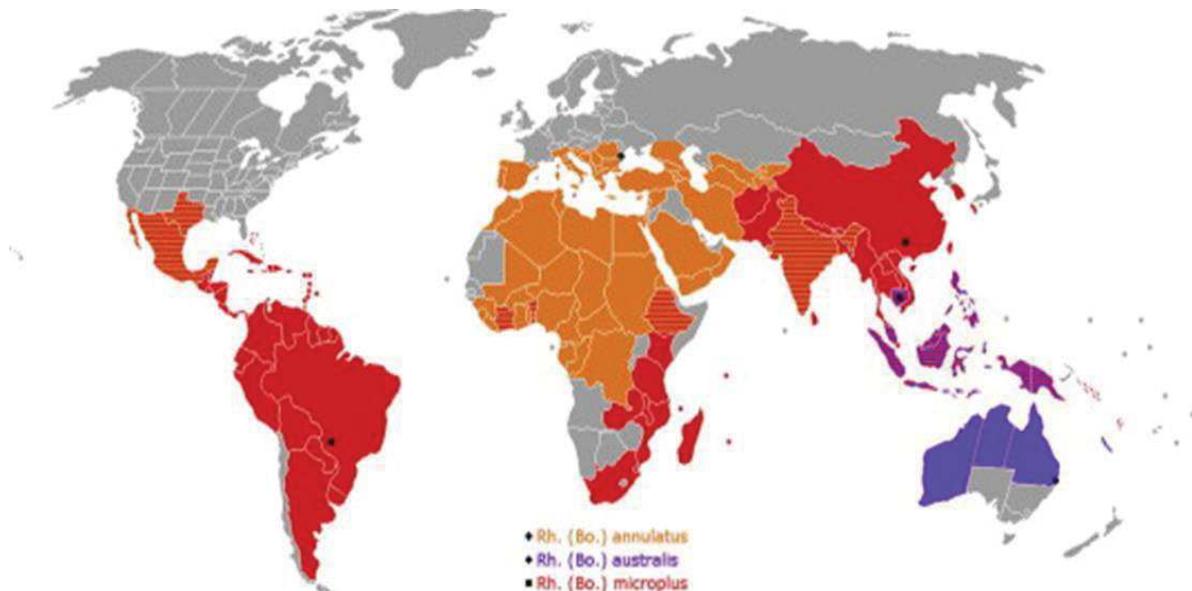
Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade carrapaticida dos OEs de *L. scoparium*, *O. vulgare* e *L. cubeba*, em soluções preparadas com a utilização dos solventes etanol, (DMSO) e Tween 80, além de avaliar a atividade carrapaticida de três frações do OE de *L. scoparium* sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - *Rhipicephalus microplus*

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, sub-classe Acari, aproximando-se a 900 espécies descritas dentro de três famílias com espécies atuais: Ixodidae, Argasidae e Nuttallielidae (SONENSHINE; ROE, 2013). Dentre as várias espécies existentes na família Ixodidae, podemos destacar *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), conhecida como carrapato-do-boi, originário da Ásia, embora atualmente apresente ampla distribuição geográfica (PEREIRA; LABRUNA, 2008; BURGER, 2014) (Figura 1). Essa espécie é registrada no Brasil desde o início do século XVIII e, atualmente, está presente em todas as regiões do país, com intensidade variando de acordo com o clima, a vegetação e a raça dos hospedeiros. Tem os bovinos como hospedeiros preferenciais e são considerados um dos mais importantes inimigos da bovinocultura (CORDOVES, 1997).

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial do *Rhipicephalus microplus*

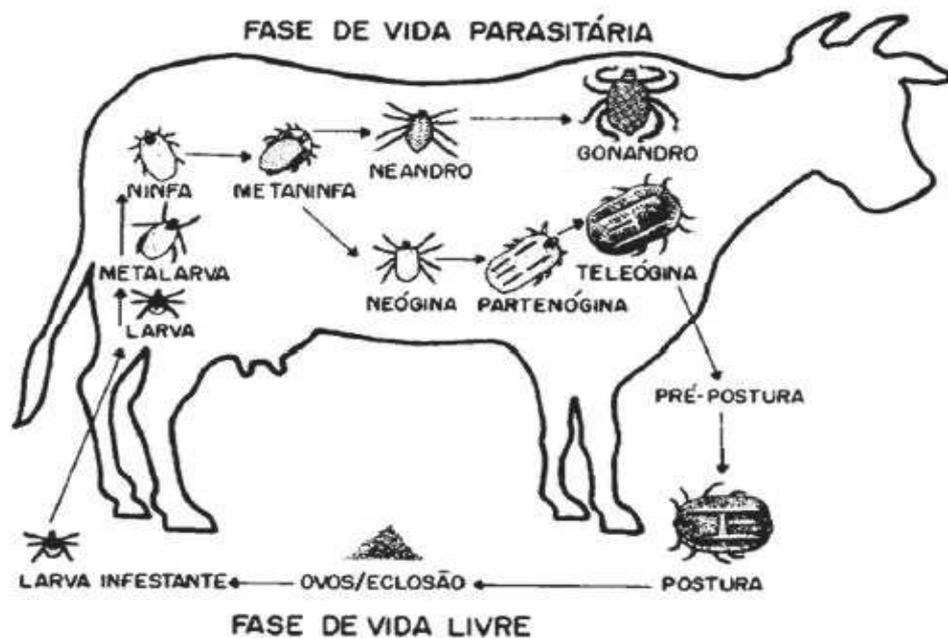


Fonte: BURGER, 2014.

O ciclo biológico de *R. microplus* é monoxênico, ou seja, todas as fases se alimentam em único hospedeiro. O ciclo deste ixodídeo divide-se em duas fases: fase parasitária e não

parasitária (Figura 2). O início da fase parasitária se dá com a fixação das larvas no hospedeiro, ingerindo inicialmente, exsudatos celulares e fluidos linfáticos (SUTHERST et al., 1978). Após 6 dias, aproximadamente, as larvas realizam muda e tornam-se ninfas, dando início a ingestão de sangue por aproximadamente 6 dias até se tornar adultos. Esta fase se encerra após 18 a 22 dias, com o desprendimento das fêmeas ingurgitadas e morte dos machos. A fase não parasitária inicia com a queda das fêmeas no ambiente, onde ocorre a ovipostura e incubação dos ovos e termina quando as larvas encontram um hospedeiro susceptível. Este período pode variar de 45 a mais de 120 dias, dependendo das condições abiótica as quais os carrapatos são expostos. Durante a fase de vida livre, as larvas podem sobreviver durante um período de 3 a 4 meses sem se alimentar, podendo alcançar até 6 meses em períodos de frio até que encontre o hospedeiro (GUGLIELMONE et al., 2006).

Figura 2 - Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*



Fonte: GONZALES, 1995.

Há décadas que as infestações por parasitos vêm causando grandes prejuízos na pecuária brasileira (GRISI et al., 2002, 2014), e *R. microplus*, tem sido considerado um dos ectoparasitos mais prejudiciais aos bovinos, causando perdas acima de 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2014). Durante a hematofagia, os ixodídeos podem ingerir até 3 mL de sangue, uma grande carga parasitária, podem levar o hospedeiro a anemia (PFAFFLE et al., 2009). Além dos danos diretos causados pelo parasitismo, os carrapatos atuam como vetores

de bactérias, protozoários e vírus, que podem causar diversas doenças nos animais (DE LA FUENTE et al., 2017; ISMAIL; MCBRIDE, 2017). Além disso, os prejuízos causados por *R. microplus* vão além do econômico, pois, a maneira mais usual de controle desta praga ainda é o uso de carrapaticidas sintéticos, aos quais podem provocar danos à saúde do animal, do ser humano e também a contaminação do ambiente (FURLONG et al., 2004, 2007; AMARAL et al., 2011; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018).

2. 2 - Formas de controle

2.2.1 - Carrapaticidas comerciais

Desde o século XIX, é persistente a procura por produtos que controle *R. microplus*. De acordo com Angus (1996), o uso dos acaricidas de forma sistemática, seja por contato, (pulverização, imersão ou *pour on*) ou sistêmico (injetáveis), vem ocorrendo desde de 1896, dando início ao processo de resistência a várias substâncias. Durante muitos anos, variados princípios ativos (avermectinas, formamidinas, organofosforados e piretroides) foram considerados como preponderantes no desenvolvimento da pecuária (DE CASTRO; NEWSON, 1993; MARTINS et al., 2006). Todavia, o uso exacerbado desses produtos e sem orientações técnicas tem provocado aumento da resistência de várias espécies (FURLONG et al., 2007; HIGA et al., 2015; KLAFKE, 2008; KLAFKE et al., 2017; LE GALL et al., 2018; RECK et al., 2014).

Nas últimas décadas, estudos vem evidenciando que várias bases químicas de carrapaticidas (piretroides, amidínicos, organofosforados, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas e benzofenilureas) disponíveis no mercado brasileiro tem apresentado baixa eficácia no controle das populações de *R. microplus* de diferentes regiões do país, além do aumento de registro de cepas multirresistentes, evidenciando assim um cenário preocupante (FURLONG et al., 2007; HIGA et al., 2015; KLAFKE et al., 2017; RECK et al., 2014).

A resistência às bases químicas pode ser um processo natural (resposta genética a evolução das populações) ou seleção artificial devido à perda de eficácia de um princípio ativo, sendo necessário uma dose superior à letal, para controle da maior parte da população de um organismo alvo (FURLONG et al., 2007; GEORGE et al., 2014).

2.2.2 - Compostos vegetais

Com o intuito de amenizar os prejuízos causados pelos carrapaticidas sintéticos e na expectativa de produtos que possam ajudar no controle de diversas pragas, muitos trabalhos com várias substâncias de origem vegetal, tais como óleos essenciais, extratos vegetais e substâncias isoladas, vêm sendo testados e apresentando resultados promissores (BENELLI; PAVELA, 2018; BORGES, 2011; ELLSE; WALL, 2014; NWANADE et al., 2020). A descoberta de moléculas de origem vegetal para o controle de pragas, apresenta como vantagens propriedades biocidas com mais de um princípio ativo, tornando assim, o desenvolvimento da resistência mais complexo e também a degradação mais rápida dos possíveis resíduos no ambiente, quando comparados com bases elaboradas em laboratório (BORGES, 2011; CATTO, 2013; ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Uma alternativa para o desenvolvimento de novos carrapaticidas é a utilização de substâncias encontradas nos OEs de plantas (ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Esses óleos são compostos pela mistura de 20 a 80 substâncias produzidas pelo metabolismo secundários de plantas (BAKKALI et al., 2008) e atuam na mediação de relações ecológicas, como atração de polinizadores e dispersores de sementes, bem como, no combate a herbívoros e patógenos (VERPOORTE, 2000).

O Brasil está entre os quatro maiores produtores de OEs do mundo (BIZZO, 2009). Este fato se deve à grande extensão territorial e vasta diversidade vegetal, que oferece grande variedade de plantas e, conseqüentemente, de metabólicos secundários que podem ser investigados para desenvolvimento de novos carrapaticidas (ELLSE; WALL, 2014).

2.3 - Óleos Essenciais

Os OEs apresentam propriedades aromáticas, flavorizantes e conservantes que vem sendo utilizados desde a antiguidade (BURT, 2004; SURBURG; PANTEN, 2006). Segundo Bakkali et al. (2008), existem aproximadamente 3000 OEs, dos quais pouco mais de 10 % são utilizados nos mais variados segmentos, sendo aqueles utilizados no mercado agrícola os que mais vem se destacando no quesito segurança e regulamentação (REGNAULT-ROGER et al., 2012).

No grupo das Angiospermas, várias famílias se destacam por apresentarem espécies produtoras de OEs, dentre elas Myrtaceae, Lauraceae e Lamiaceae. Os OEs podem ser extraídos de diversas partes da planta, podendo variar em quantidade, qualidade e composição, dependendo do local de extração. Apresentam como principal característica a volatilidade, seguida do aroma, sabor, cor e estabilidade (WATERMAN, 1993).

Dentre as famílias mencionadas, podemos destacar três espécies que vêm sendo estudadas a respeito da caracterização de atividade biocida; *Leptospermum scoparium* J.R. & G. Forst, *Origanum vulgare* L. e *Litsea cubeba* (Lour.). Várias pesquisas já evidenciaram que OEs obtidos a partir de amostras dessas plantas apresentam atividade antimicrobiana, antifúngica e inseticida (DAM et al., 2019; NARDONI et al., 2019; XIE et al., 2019).

2.3.1 - *Leptospermum scoparium*

Conhecida também por Manuka, Érica-japonesa e árvore-chá, *L. scoparium* é um arbusto semi-lenhoso de folhas verdes com fragrância forte e flores pequenas de cor rosa a branco, pertence à família Myrtaceae, nativa da Austrália e Nova Zelândia e introduzida na Grã-Bretanha e Havaí (GOVAERTS et al., 2008). *L. scoparium* tem grande importância econômica com a produção de arbustos ornamentais, óleos essenciais e mel (STEPHENS et al., 2005) (Figura 3).

Figura 3 - *Leptospermum scoparium*



Fonte: International Plant Name Index, IPNI (2021).

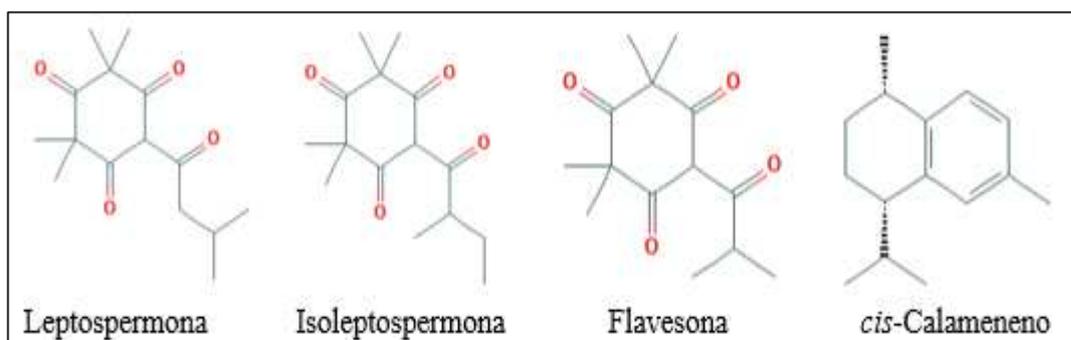
Há relatos na literatura do uso dessa planta pelos primeiros colonos de seu país de origem como suplementos alimentares e no preparo farmacêutico e medicinal (PORTER; WILKINS, 1998; CHEN et al., 2014). Atividades biocidas têm sido relatadas com frequência, tais como, antibacterianas (SONG et al., 2019) e inseticida (MUTURI et al., 2020). O mel de Manuka, um derivado de *L. scoparium*, tem sido extensivamente estudado, e devido aos numerosos compostos fenólicos, incluindo os flavonoides e ácidos fenólicos, vem apresentando atividades antibacteriana, antioxidante (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2014), cicatrizante (BISCHOFBERGER et al., 2016) e anticancerígenas (AFRIN et al., 2017).

O OE de *L. scoparium* pode ser obtido por destilação a vapor das folhas e ramos,

(MADDOCKS-JENNINGS et al., 2005) é bastante aromático e de cor amarelo claro. De acordo com a posição geográfica, estação do ano, idade do vegetal e características genéticas, a composição química do OE de *L. scoparium* pode apresentar grande variabilidade a sua caracterização e gera diferentes quimiotipos espontâneos (LIS-BALCHIN et al., 2000; MADDOCKS-JENNINGS et al., 2005). Segundo Porter e Wilkins (1998), só na Nova Zelândia foram identificados quatro quimiotipos diferentes devido aos compostos caracterizados nos diferentes exemplares analisados; I) rico em tricetonas; II) rico em linalool e eudesmol; III) rico em pineno e IV) ausência de tricetonas, linalool e eudesmol.

Os compostos mais encontrados no OE de *L. scoparium* são: as tricetonas leptospermona, flavesona, isoleptospermona, (Figura 4) cadina 3,5-dieno e o amorfeno; os terpenóides como os sesquiterpenos, um grupo importante em termos de concentração e atividade biológica (Porter and Wilkins 1998), bem como os terpenos e monoterpenos cuja concentração pode variar de 3 a 40% de acordo com o quimiotipo (MADDOCKS-JENNINGS et al., 2005).

Figura 4 - Fórmulas estruturais dos componentes majoritários do óleo essencial de *Leptospermum scoparium*



Fonte: PUBCHEM, 2020.

A ação antimicrobiana do OE de *L. scoparium* tem sido extensivamente investigada e tem sido atribuída, principalmente, às tricetonas; leptospermona, isoleptospermona e flavesona (Van VUUREN et al., 2014; CHEN et al., 2014). A leptospermona, além das características já mencionadas, se mostrou bastante eficiente como inseticida e com propriedades anti-helmínticas (LIS-BALCHIN, et al., 1996). Porém nos quimiotipos com pouca ou nenhuma tricetonas, os sesquiterpenos tem sido os responsáveis por desempenhar a atividade anti-séptica, antibacteriana, analgésica e anti-inflamatória (MADDOCKS-JENNINGS et al., 2005).

2.3.1.1 - β -tricetonas

Várias plantas da família Myrtaceae nativas da Austrália e Nova Zelândia apresentam na sua composição quantidades relativamente alta de β -tricetonas, tais como leptospermona, isoleptospermona e flavesona (DAYAN et al., 2007). O início da sintetização das tricetonas pode ter sido a partir da descoberta das propriedades herbicidas de leptospermona oriunda de *Callistemon spp*, desde então milhões de dólares tem sido investido no desenvolvimento e comercialização de análogos à leptospermona (DAYAN et al., 2007). Com a grande comercialização desses compostos como herbicidas, vários estudos já foram realizados para avaliar o impacto ecotoxicológico de β -tricetonas naturais e sintéticas na diversidade da comunidade bacteriana, sendo demonstrado que a dissipação da leptospermona e sulcotriona ocorre dentro de 45 dias no solo (CALVAYRAC et al., 2012; ROMDHANE et al., 2016; ROMDHANE et al., 2019). Nesse mesmo sentido, Romdhane et al. (2019) afirmam também que a leptospermona e sulcotriona apresentaram meia-vida semelhante quando usadas em dose agronômica, enquanto que ao usar uma dose mais alta, a leptospermona apresentou uma meia-vida mais curta que sulcotriona, confirmando que um composto natural é mais facilmente biodegradável do que um sintético (ROMDHANE et al., 2018).

A atividade antimicrobiana das β -tricetonas já foi comprovada contra várias bactérias, tais como, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* tendo sua atividade diretamente relacionada ao rompimento das membranas citoplasmáticas devido à sua natureza hidrofóbica (Van KLINK et al., 2005). A atividade antiviral das β -tricetonas, flavesona e leptospermona, já foi avaliada sobre o vírus simples do herpes tipo 1- HSV-1 e tipo 2- HSV-2, nesse estudo foi verificado que o pré-tratamento das células hospedeiras antes da infecção viral reduziu a replicação do HSV-1 em 41% (SCHNITZLER, 2019).

Uma série de β -tricetonas tem sido estudada e vem apresentando uma alta bioatividade também contra artrópodes (SPOONER-HART, 2013; PARK et al., 2017; MUTURI et al., 2020). No estudo realizado por Spooner-Hart, (2013) avaliando a atividade de várias β -tricetonas sobre o ácaro *Tetranychus urticae* Koch 1836, concluiu-se que as β -tricetonas, flavesona, leptospermona e isoleptospermona, mostraram alta atividade para o organismo testado. Dentre os trabalhos avaliando a ação das β -tricetonas em artrópodes, Spooner-Hart, (2013) observou que a inibição de ATP está diretamente relacionada com a quantidade de β -tricetonas existente na planta, ou seja, quanto maior as concentrações de β -tricetonas maior a percentagem de inibição de ATP (SPOONER-HART, 2013).

2.3.2 - *Origanum vulgare*

Origanum vulgare é conhecido como Orégano (Figura 5), pertencente à família Lamiaceae, é nativa da Europa mediterrânea com referências no uso culinário e medicinal desde os povos pré-históricos (RODRIGUES, 2002; LORENZI; MATOS, 2008). O termo “Origanum” vem de duas palavras gregas: ouro (montanha) e ganos (enfeite). Atualmente tem sido bastante cultivado na região sul e sudeste do Brasil. É uma planta com uma enorme versatilidade, apresentando dentre elas, propriedades terapêuticas, tais como; analgésico, anti reumática, anti séptica, desinfetante, parasiticida, (CATTELAN et al., 2013; BHAT et al., 2018; BENEDEC et al., 2018).

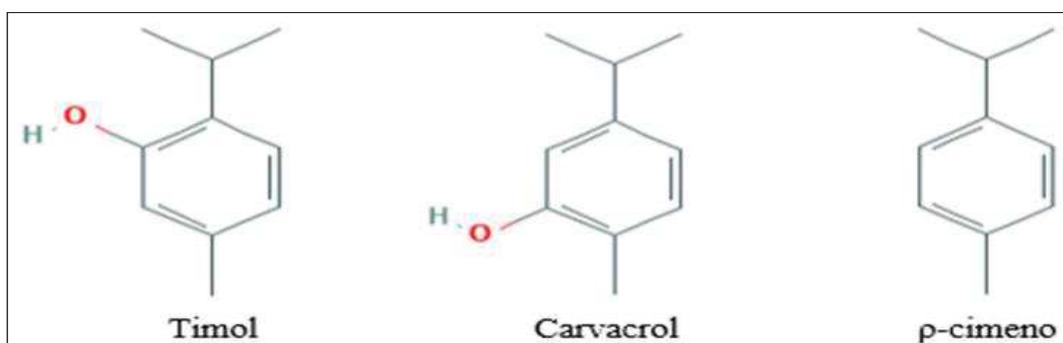
Figura 5 - Folhas e flores de *Origanum vulgare*



Fonte: International Plant Name Index, IPNI (2021).

Fatores bióticos e abióticos podem influenciar na composição química, qualidade e quantidade de óleo essencial presente nos vegetais (SIMÕES et al., 2003). Estudos comprovam que os principais componentes responsáveis pelo potencial biocida desta planta são os compostos fenólicos carvacrol e timol, além dos hidrocarbonetos monoterpenos ρ -cimeno (Figura 6) e terpineno (GOULAS; KONTOMINAS, 2007), sendo o carvacrol, geralmente, o principal componente do OE de *O. vulgare*. O carvacrol é um composto fenólico hidrofóbico, com atividade antibacteriana (BURT, 2004), antifúngica (GUARDA et al., 2011), inseticida (MUDRONČEKOVÁ et al., 2019) e acaricida (NOVATO et al., 2018).

Figura 6 - Fórmulas estruturais dos componentes majoritários do óleo essencial de *Origanum vulgare*



Fonte: PUBCHEM, 2020.

2.3.3 - *Litsea cubeba*

Litsea cubeba é uma planta nativa do continente asiático com propriedades medicinais, cultivada principalmente na China, Malásia, Indonésia, Taiwan e outras partes do sul da Ásia (SI et al., 2012, ZHANG et al., 2012) (Figura 7). Pertencente à família Lauraceae, também conhecida como pimenta-chinesa e May Chang, é uma árvore de pequeno porte e possui folhas, flores, caule e raiz bem aromatizada de onde pode-se extrair o óleo essencial que possui inúmeros benefícios na indústria química, alimentícia e medicinal, com bioatividades antibacterianas (LU et al., 2019), antifúngicas (NARDONI et al., 2019) acaricidas (PUMNUAN et al., 2010) e inseticidas (NOOSIDUM et al., 2008).

Figura 7 - Frutos e folhas de *Litsea cubeba*

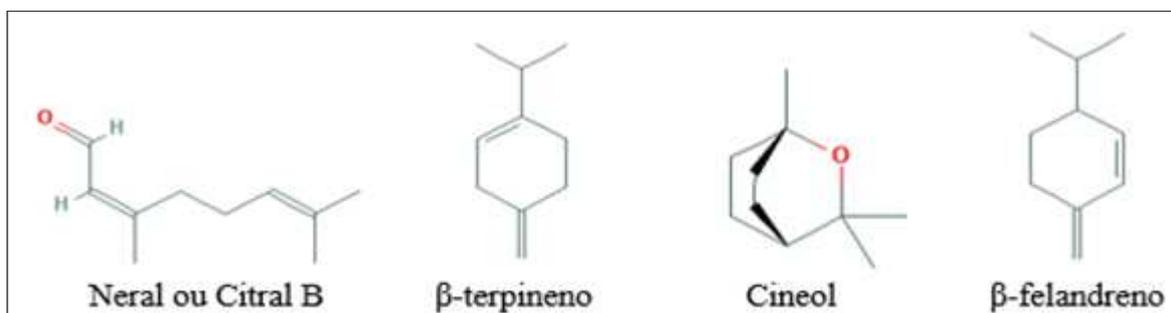


Fonte: International Plant Name Index, IPNI (2021).

A composição do OE *L. cubeba* pode variar de acordo com a estrutura da planta utilizada e também a forma de extração do óleo, sendo o neral (63,75%) o principal constituinte do fruto; as flores têm em maior quantidade (33%) e as folhas com cineol

(14%). Nas raízes e caule foram encontrados, respectivamente, neral (22%) e β -felandreno (19%) (WANG; LIU, 2010) (Figura 8).

Figura 8 - Fórmulas estruturais dos componentes majoritários do óleo essencial *Litsea cubeba*



Fonte: PUBCHEM, 2020.

2. 4 - Solventes e surfactantes na solubilização de OEs

Estudos com OEs tem demonstrado que esses compostos apresentam atividade acaricida, porém, para identificar a atividade dos OEs e dos compostos extraídos de plantas, é fundamental realizar a triagem da amostra para conhecer a composição química, possibilitando a identificação da substância majoritária e o potencial envolvimento na atividade biológica do composto. Para a execução do teste de triagem os OEs precisam ser diluídos em solventes ou surfactantes, devido à natureza hidrofóbica das substâncias presentes nos OEs, solventes como etanol, DMSO e Tween 80 tem sido amplamente utilizado (CRUZ et al., 2013; De SOUZA CHAGAS et al., 2016; NWANADE et al., 2020). Alguns estudos demonstraram que a atividade dos compostos sobre os carrapatos pode ser potencializada de acordo com a escolha do diluente (SCORALIK et al., 2012, MATOS et al., 2014).

Solventes são compostos líquidos ou mistura de compostos orgânicos ou aquosos, que possuem a propriedade de dissolver outras substâncias. Como exemplos de solventes podemos destacar o etanol e o DMSO (RUSSEL, 1981).

O etanol é um solvente polar prótico de fórmula molecular C_2H_5OH . Em seu estado puro e na temperatura normal apresenta-se sob a forma líquida incolor, inflamável, volátil, tóxico e de odor característico (RUSSEL, 1981). O etanol tem sido considerado o representante economicamente mais importante dos álcoois alifáticos e como solvente perde apenas para a água, de modo que sua utilização encontra-se em quase todas as indústrias

(SHREVE, 1997).

O DMSO, de fórmula molecular C_2H_6SO , é um solvente com características importantes para a química, pois além de ser utilizado como solvente e reagente, apresenta diversas atividades biológicas (SANTOS et al., 2003). Entre 1866 e 1867, foi descrito pelo químico russo Alexander Zaytsev a notável capacidade como solvente do DMSO, sendo que sua primeira aplicação industrial para este fim se deu somente a partir da década de 1940. Uma das mais importantes atividades biológicas observadas no DMSO é a sua capacidade de atravessar as membranas celulares (KOLB et al., 1967).

Vários fármacos são transportados através da membrana com a ajuda desse solvente (EVANS et al., 1993). Essas características importantes do DMSO podem ser explicadas pela natureza de sua estrutura química. Sendo um solvente aprótico altamente polar, apresenta alta afinidade por hidrogênios em ligações polares, de modo que essas ligações são mais forte que as formadas pelas moléculas de água (ALSUP; DEBOWES, 1984).

Os surfactantes são produtos capazes de promover a solubilidade de substâncias hidrofóbicas em água. Essa característica se deve às longas cadeias carbônicas (hidrofóbicas) com um grupo hidrofílico em uma de suas extremidades. O Tween 80, fórmula $C_{64}H_{124}O_{26}$, é um surfactante não-iônico utilizado para emulsificar óleo em água (FENG et al., 2006). Sua utilização abrange vários setores da economia, sendo utilizado na indústria dos cosméticos (MORENO, 2000), farmacêutica (HU et al., 2003), agrícola (JIN et al., 2007) e laboratoriais (KAREKAR et al., 2000; GRIPPA et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Origem dos carrapatos

Foram utilizadas larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Cepa GYN), obtidas por meio de infestações artificiais em bezerros, mantidos no Galpão de Experimentação de Grandes Animais da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (CEUA – 032.17).

3.2 - Obtenção e diluição dos óleos essenciais

Os OEs das folhas de *L. scoparium* (Lote 1754 / Local de origem: Austrália), *O. vulgare* (Lote 0824 / Local de origem: Turquia) e dos frutos de *L. cubeba* (Lote 0653 / Local de origem: China), foram adquiridos comercialmente da empresa - Laszlo@ (Belo Horizonte/MG).

Nos testes com diferentes solventes, foram utilizados o etanol a 50%, DMSO a 3% e Tween 80 a 3% (em água destilada v/v) para preparação nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg/mL dos OEs. Nos testes com as frações obtidas do OE de *L. scoparium* (descritas no item 3.4) foram utilizadas as mesmas concentrações (2,5, 5 e 10 mg/mL) diluídas em etanol a 50%, para o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas, enquanto nos testes de imersão de larvas, também foram utilizadas as concentrações de 0,625 e 1,25 mg/mL. Além dos tratamentos com os OEs, também foram formados grupos controle de água e com os respectivos solventes, sem a presença do OEs.

3.3 - Análise dos compostos voláteis por cromatografia a gás - espectrometria de massa (GC-MS)

Os OEs e as frações foram analisadas qualitativa e quantitativamente no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sínteses da Universidade Estadual Vale do Acaraú -CE, em equipamento Shimadzu modelo GCMS-QP2010 (quadrupolo) equipado com uma coluna RTX-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek), modo de injeção com divisão de fluxo 1:100, gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da linha de transferência de 250 °C e fonte de íons a 230 °C. O forno cromatográfico foi programado para temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento

de 4 °C min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). Os espectros de massa foram registrados no modo de ionização de elétrons (EI), com uma energia de ionização de 70 eV.

Para calcular a porcentagem dos constituintes, foi usada a área integral e seus respectivos picos, relacionando com a área total dos constituintes da amostra. Os diversos constituintes dos OEs foram identificados através da comparação visual de seus espectros de massas com aqueles existentes na literatura (ADAMS, 2009) e no banco de dados (NIST08) do equipamento, além da comparação dos índices de retenção disponíveis na literatura (ADAMS, 2009; EL-SAYED, 2018). Uma solução padrão de n-alcenos (C7-C30) foi injetada nas mesmas condições cromatográficas da amostra para obter os índices de retenção conforme descrito por Van Den Dool e Kratz (1963).

3. 4 - Fracionamento cromatográfico do óleo essencial de *Leptospermum scoparium*

Para essa etapa, cerca de 25g do referido OE foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica (70 - 230 mesh, Vetec) empregando a série eluotrópica constando de hexano e acetato de etila puros, e em misturas binárias com polaridades crescentes. Esse processo resultou em um total de 45 frações, que foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD). Com isso, as frações com o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas, gerando, assim, três novas frações. Em seguida, as frações foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado e a espectrômetro de massas (CG/EM). Essa análise possibilitou identificar os constituintes de cada fração o que favoreceu a seleção das seguintes frações: A1 (fração 1), rica em compostos apolares e resultante da eluição com hexano puro; A2 (frações 24 a 26) e A3 (frações 27 a 33), ambas ricas em β -tricetonas e resultantes da eluição com hexano/acetato de etila nas proporções de 199:1 e 49:1.

3. 5 - Teste de Imersão de Larvas (TIL)

Foi utilizado teste de imersão de larvas proposto por Shaw et al. (1966), em que aproximadamente 50 larvas foram imersas por cinco minutos em 2,0 mL das soluções testadas, dentro de Eppendorf (2,0 mL), sob constante agitação. Após cinco minutos, as larvas foram colocadas sobre duas folhas de papel toalha para retirada do excesso da solução, e posteriormente transferidas para envelopes de papel filtro (6 x 6 cm), vedadas com clips do

tipo binder. Em seguida, os grupos experimentais foram acondicionados em estufa do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) em temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80\pm 5\%$. Após 24 horas, foi realizada a contagem de larvas vivas e mortas para determinação do percentual de mortalidade.

Para esses experimentos foram testados os OEs de *L. scoparium*, *O. vulgare*, *L. cubeba* e as frações do OE de *L. scoparium*. Ao todo, foram formados 46 grupos (42 tratamentos, e 04 controles). Cada tratamento foi composto por 10 réplicas por grupo experimental, e o experimento foi repetido duas vezes no tempo.

3. 6 - Teste de Imersão de Adultas (TIA)

Para esse experimento foi utilizada a metodologia proposta por Drummond et al. (1973). As fêmeas ingurgitadas foram divididas em 40 grupos (36 tratamentos e 04 controles), contendo 10 carrapatos (cada carrapato uma repetição) com pesos previamente homogeneizados ($p > 0,05$). O experimento também foi repetido duas vezes no tempo. Cada grupo foi imerso por cinco minutos nas soluções testadas e, após esse tempo, as fêmeas foram colocadas sobre folhas de papel filtro para retirada do excesso da solução e individualizadas em placas de cultivo celular.

Os grupos experimentais foram acondicionados em estufa do tipo B.O.D em temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80\pm 5\%$ para realização de oviposição por 15 dias. Ao término desta etapa, a massa de ovos de cada fêmea foi pesada em balança analítica e transferida para seringa de plástico (10 mL), com extremidade distal cortada, vedada com algodão hidrófilo. Essas seringas foram mantidas em B.O.D nas mesmas condições anteriores para incubação dos ovos e, após cerca de 20 dias, foi feita a avaliação do percentual de eclosão larval utilizando o método proposto por (FIGUEIREDO et al., 2018).

3. 7 - Análises estatísticas

Os parâmetros, peso da fêmea antes da oviposição (mg), peso da massa de ovos (mg) e percentual de eclosão de larvas (%) foram avaliados durante o experimento e, a partir desses resultados, foi feito o cálculo do percentual de controle (%) de acordo com as fórmulas propostas por Drummond et al. (1973).

Para comparação do percentual de controle das fêmeas e mortalidade das larvas foi

utilizado o software Biostat ver. 5.3 (AYRES et al. 2007). Primeiramente foi realizado o teste de normalidade para avaliar a distribuição dos dados. Para dados que apresentaram distribuição normal, os valores médios dos tratamentos foram comparados por teste Anova seguido do teste de Tukey. Para os dados que apresentaram distribuição não normal foi utilizado o teste de Kruskal-Walis seguido do teste de Student-Newman-Keul.

4 RESULTADOS

4.1 - Avaliação da atividade acaricida dos OEs de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba*

4.1.1 - Composição química dos óleos essenciais

A análise em GC/MS dos EOs investigados neste trabalho, possibilitou a identificação de 57 compostos diferentes. Suas porcentagens, índices Kovats calculados (IKC) em uma coluna RTX-5MS e índices Kovats da literatura (IKLit) estão sumarizados na tabela 1. Dessa forma, no OE das folhas de *L. scoparium* foram observados quatro grupos de constituintes; hidrocarbonetos sesquiterpênicos (61,75%), sendo o cis-calameneno (29,82%) o composto majoritário desse grupo; β -tricetonas (33,53%) com destaque para leptospermona (22,05%); sesquiterpenos oxigenados (3,70%); e hidrocarbonetos monoterpênicos (1,01%). O óleo essencial de folhas de *O. vulgare* apresentou em sua constituição monoterpênicos oxigenados (71,11%), sendo o carvacrol o composto majoritário (64,85%); hidrocarbonetos monoterpênicos (27,27%); hidrocarboneto sesquiterpênico (1,38%) e sesquiterpeno oxigenado (0,24%). Para o OE dos frutos de *L. cubeba* foram encontrados monoterpênicos oxigenados (80,69%), sendo os componentes predominantes o geranial (42,44%) e neral (32,00%); hidrocarbonetos monoterpênicos (17,11%); cetona alifática insaturada e hidrocarboneto sesquiterpênico, totalizando pouco mais de 2,0% (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química, índice de Kovats calculado (IKC), índice de Kovats da literatura (IK_{Lit}) (Adams, 2009), percentagens dos componentes identificados e das classes químicas dos óleos de *Leptospermum scoparium* (LS), *Origanum vulgare* (OV) e *Litsea cubeba* (LC)

Constituintes	IKC	IK _{Lit}	% LS	% OV	% LC
<i>Hidrocarbonetos monoterpênicos</i>			1,01	27,27	17,11
α -tujeno	933	930	-	0,60	-
α -pineno	940/942 ^a	939	1,01	1,66	1,21
Canfeno	957 ^b /958	954	-	0,28	0,27
Sabineno	978	975	-	-	1,48
β -pineno	983 ^b /985	979	-	0,39	1,01
Mirceno	990 ^b /993	990	-	1,65	0,97
α -terpineno	1023	1017	-	0,94	-
<i>p</i> -cimeno	1031	1024	-	13,70	-
Limoneno	1036	1029	-	-	12,17
γ -terpinene	1065	1059	-	8,05	-
<i>Cetona alifática insaturada</i>			-	-	1,09
6-metil-5-hepten-2-ona	986	985	-	-	1,09
<i>Monoterpenos oxigenados</i>			-	71,11	80,69
1,8-cineol	1040	1031	-	-	1,25
Linalol	1102	1096	-	2,34	1,18
Citronelal	1157	1153	-	-	0,64
(<i>Z</i>)-isocitral	1168	1164	-	-	0,42
4-terpinenol	1183	1177	-	-	0,24
(<i>E</i>)-isocitral	1184	1180	-	-	0,80
α -terpineol	1194	1188	-	-	0,43
Nerol	1234	1229	-	-	0,42
Neral	1248	1239	-	-	32,00
Geraniol	1259	1252	-	-	0,87
Geranial	1276	1267	-	-	42,44
Timol	1295	1290	-	3,92	-
Carvacrol	1307	1299	-	64,85	-
<i>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</i>			61,75	1,38	1,09
α -cubebeno	1354	1351	2,27	-	-
α -copaeno	1381/1384 ^a	1376	6,73	-	-
α -gurjuneno	1415/1418 ^a	1409	0,79	-	-
(<i>E</i>)-cariofileno	1425 ^a /1429/1430 ^b	1419	1,26	1,38	1,09
β -gurjuneno	1442	1433	-	-	-
Aromadendreno	1446	1441	2,40	-	-
<i>trans</i> -muurolo-3,5-dieno	1456	1453	0,86	-	-
α -himachaleno	1459	1451	-	-	-
9-epi-(<i>E</i>)-cariofileno	1467	1466	0,70	-	-
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1479	1476	1,69	-	-
γ -muurolo	1481	1479	1,59	-	-
α -amorfenol	1487	1484	-	-	-
β -selineno	1492	1490	4,95	-	-
α -selineno	1505	1498	4,51	-	-
α -muurolo	1509	1500	0,61	-	-
β -himachaleno	1509	1500	-	-	-
<i>cis</i> -calameneno	1533	1529	29,82	-	-
<i>trans</i> -cadina-1,4-dieno	1542	1534	3,57	-	-
α -corocaleno	1632	1623	-	-	-

Constituintes	IK _C	IK _{Lit}	% LS	% OV	% LC
<i>β- Tricetonas</i>			33,53	-	-
Flavesona	1551	1547	5,90	-	-
iso-leptospermona	1623	1622	5,58	-	-
Leptospermona	1633	1630	22,05	-	-
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>			3,70	0,24	-
Elemol	1557	1549	-	-	-
(<i>E</i>)-nerolidol	1571	1463	-	-	-
Gleenol	1591 ^a	1587	1,27	-	-
óxido de cariofileno	1593	1583	-	0,24	-
Globulol	1600	1590	-	-	-
Guaiol	1606	1600	-	-	-
1-epi-cubenol	1636	1628	1,69	-	-
Cubenol	1650	1646	0,74	-	-
Bulnesol	1677	1671	-	-	-
<i>Ester aromático</i>			-	-	-
benzoato de benzila	1776	1760	-	-	-
Total identificado			99,99	100,00	99,98

^a Valor de IK_C obtido apenas para componente de LS. ^b Valor de IK_C obtido apenas para componente de LC.

Leptospermum scoparium (LS), *Origanum vulgare* (OV) – obtido das folhas por hidrodestilação
Litsea cubeba (LC) – obtido dos frutos por hidrodestilação

4.1.2 - Atividade carrapaticida dos óleos essenciais sobre larvas não alimentadas

Não ocorreu diferenças ($p > 0,05$) em relação a mortalidade dos carrapatos nos grupos controles de água e controle solventes (DMSO, etanol e Tween 80), sendo observados valores inferiores a 3% em todos os grupos. Todos os tratamentos com o OE de *L. scoparium* diluídos em DMSO e etanol resultaram em 100% de mortalidade. Já nos tratamentos com o surfactante Tween 80, a mortalidade variou entre 82,7% e 99,2%. Todos os tratamentos com o OE de *L. scoparium*, independente do solvente ou da concentração, resultaram em mortalidade superiores ($p < 0,05$) ao percentual de mortalidade encontrado nos grupos controle (Tabela 02).

Nos tratamentos com OE de *O. vulgare*, a mortalidade foi de 100% em todas as concentrações quando o OE foi diluído com DMSO, resultando em diferenças ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle (água e solvente), enquanto nos tratamentos contendo o solvente etanol, somente a maior concentração (10 mg/mL) resultou em 100% de mortalidade ($p < 0,05$). Nos grupos com o OE diluído em Tween 80, a taxa de mortalidade variou de 7,4 a 45,5%, com diferença ($p < 0,05$) para os grupos controle, apenas na concentração de 10 mg/mL.

Nos testes com OE de *L. cubeba*, o percentual de mortalidade da concentração de 10 mg/mL foi superior a 99%, quando o OE foi diluído em DMSO e em etanol ($p < 0,05$); no entanto, a mesma concentração do OE de *L. cubeba*, diluída no surfactante Tween 80,

resultou em mortalidade inferior a 7% (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba*, em diferentes diluentes (solventes ou surfactante), em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 85 \pm 5\%$)

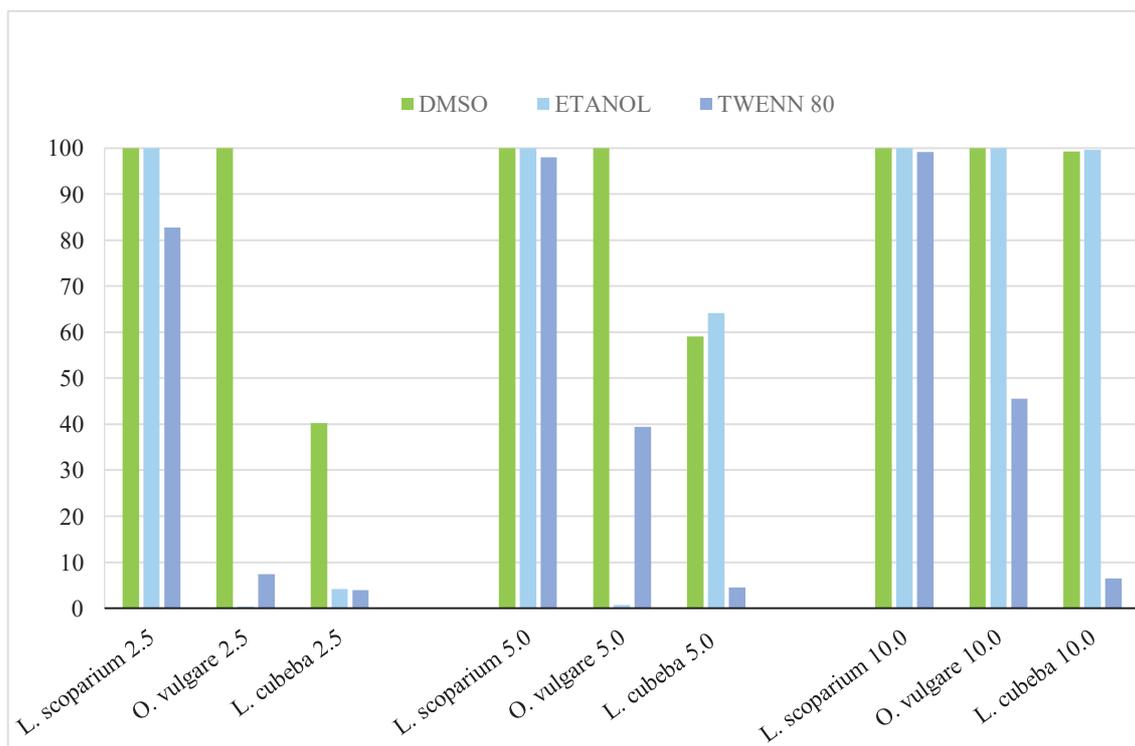
Óleo essencial	Tratamentos	Solventes		
		DMSO (3%)	Etanol (50%)	Tween 80 (3%)
	Controle H ₂ O	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0
	Controle solvente	1,4 ^a ±3,0	0,0 ^a ±0,0	2,6 ^a ±1,9
<i>Leptospermum scoparium</i>	2,5 mg/mL	100,0 ^b ±0,0	100,0 ^b ±0,0	82,7 ^{ab} ±14,6
	5,0 mg/mL	100,0 ^b ±0,0	100,0 ^b ±0,0	98,7 ^{bc} ±1,2
	10 mg/mL	100,0 ^b ±0,0	100,0 ^b ±0,0	99,2 ^c ±1,6
<i>Origanum vulgare</i>	2,5 mg/mL	100,0 ^b ±0,0	0,4 ^a ±1,0	7,4 ^{ab} ±2,2
	5,0 mg/mL	100,0 ^b ±0,0	0,7 ^a ±1,0	39,4 ^{ab} ±53,0
	10 mg/mL	100,0 ^b ±0,0	100,0 ^b ±0,0	45,5 ^b ±22,5
<i>Litsea cubeba</i>	2,5 mg/mL	40,2 ^{ab} ±4,0	4,2 ^{ab} ±4,0	3,9 ^{ab} ±2,9
	5,0 mg/mL	59,1 ^{bc} ±9,0	64,2 ^{bc} ±30,0	4,5 ^b ±1,9
	10 mg/mL	99,3 ^c ±3,0	99,6 ^c ±0,8	6,5 ^b ±3,8

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Leptospermum scoparium (LS), *Origanum vulgare* (OV) e *Litsea cubeba* (LC)

Comparando os percentuais de mortalidade larval entre os solventes, nas mesmas concentrações, foi observado que os OEs têm ação diferente dependendo do solvente utilizado. Ao utilizar DMSO, ou Etanol, como solventes, a ação dos OEs apresentou maior atividade. O OE de *L. scoparium* foi o que apresentou menor variação nos resultados entre os solventes no percentual de mortalidade larval, de modo que todos os tratamentos diferiram do grupo controle ($p < 0,05$). Já nos tratamentos com os OEs de *O. vulgare* e *L. cubeba*, foi observado diferença ao utilizar Tween 80 em relação aos tratamentos com o DMSO e etanol ($p < 0,05$); Quando foi utilizado o solvente Tween 80 o percentual de mortalidade variou entre 6 e 45,5 %, entretanto, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle ($p > 0,05$), diferente dos tratamentos do DMSO e etanol que apresentaram diferença para o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 9).

Figura 9 - Comparação dos solventes no percentual de mortalidade larval dos Óleos Essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba*



4.1.4 - Atividade carrapaticida dos óleos essenciais sobre fêmeas ingurgitadas

Não houve diferenças ($p > 0,05$) quanto a quantidade e a viabilidade de ovos produzidos pelas fêmeas dos grupos controle (água e solventes – Tabela 3). Fêmeas tratadas com o OE de *L. scoparium* diluído em DMSO e em etanol, produziram menos ovos ($p < 0,05$) a partir das concentrações de 5,0 e 10 mg/mL, respectivamente, em relação ao grupo controle, enquanto nos grupos em que o OE foi diluído em Tween 80, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos com o OE (nas diferentes concentrações) e grupos controle. Em relação à viabilidade dos ovos, todos os grupos tratados com o OE de *L. scoparium*, diluído em etanol, resultaram em percentual de eclosão larval inferior ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle (água e solvente), enquanto nos grupos em que o OE foi diluído em Tween 80 e DMSO, somente os tratamentos com a maior concentração resultaram em redução ($p < 0,05$) na eclosão larval. O percentual de controle nos tratamentos com os solventes, etanol e DMSO chegou a 99 e 100%, na maior concentração (10 mg/mL), enquanto no tratamento com Tween 80, o percentual de controle na maior concentração foi de 17%.

Nos tratamentos com OE de *O. vulgare*, utilizando DMSO e etanol como solventes, foram observadas as menores médias de peso de postura, apresentando diferenças ($p < 0,05$)

em comparação aos grupos controle (água e solvente), nas duas maiores concentrações (5,0 e 10 mg/mL). Já nos grupos utilizando o Tween 80 para diluir o OE, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos e os grupos controle (água e solvente). Ao analisar a viabilidade dos ovos, foi observado um menor percentual de eclosão ($p<0,05$) nas maiores concentrações dos grupos tratados com OE de *O. vulgare* diluídos com etanol e DMSO, respectivamente, em comparação com o grupo controle. Em contrapartida, todos os tratamentos utilizando Tween 80 não diferiram significativamente ($p>0,05$) dos grupos controle. Os maiores percentuais de controle foram observados nas concentrações de 5,0 e 10 mg/mL (87,7 e 99,4%), utilizando o etanol como solvente, e na concentração de 10 mg/mL, utilizando DMSO (92%). Entretanto, os percentuais de controle observado nos tratamentos com Tween 80 não foram superiores a 25% (Tabela 3).

Nos testes do OE de *L. cubeba*, com relação ao peso da massa de ovos, nos tratamentos com etanol, foram observadas diferenças ($p<0,05$), em comparação com os grupos controle, em todos os tratamentos. Nos grupos tratados com o OE diluído em DMSO, essas diferenças foram observadas somente nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg/mL. Já nos tratamentos com Tween 80, não foram observadas diferenças ($p>0,05$). Com relação ao percentual de eclosão das larvas, nos tratamentos que utilizaram o etanol como solvente, foram observadas diferença ($p<0,05$) em relação aos grupos controle nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg/mL, resultando em percentual de controle de 62 e 87%, respectivamente. Nos tratamentos com DMSO como solvente, o percentual de eclosão das larvas diferiu ($p<0,05$) dos controles nos tratamentos com as concentrações de 5,0 e 10,0 mg/mL, e o maior percentual de controle foi na concentração de 5,0 mg/mL (38,1%). Para os tratamentos que utilizaram o Tween 80 como solvente, não foi observada diferenças ($p>0,05$) do percentual de eclosão das larvas entre nenhum dos tratamentos e o maior percentual de controle observado foi de 30% (10 mg/mL).

Tabela 3 - Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão de larvas e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare* e *Litsea cubeba* em diferentes diluentes (solventes ou surfactante), em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 85 \pm 5\%$)

	Solventes	Concentrações	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão de larvas (%)	Percentual de controle (%)*
Grupos controle	H ₂ O		267,6 ^a ±29,8	157,1 ^a ±16,0	95,5 ^a ±2,9	
	DMSO 3%		267,4 ^a ±47,2	149,5 ^a ±21,7	92,8 ^a ±8,3	7,3
	Etanol 50%		268,0 ^a ±31,2	152,9 ^a ±20,8	94,9 ^a ±5,5	3,3
	Tween 80 3%		266,2 ^a ±41,9	152,2 ^a ±22,6	93,8 ^a ±9,0	4,2
<i>Leptospermum scoparium</i>	DMSO 3%	2,5 mg/mL	267,5 ^a ±35,1	146,3 ^a ±42,7	85,5 ^a ±30,6	16,5
		5,0 mg/mL	267,3 ^a ±31,5	139,9 ^a ±21,1	56,5 ^a ±37,8	47,2
		10,0 mg/mL	267,0 ^a ±47,7	6,1 ^b ±8,8	0,0 ^b ±0,0	100,0
	Etanol 50%	2,5 mg/mL	266,9 ^a ±28,3	131,4 ^{ab} ±29,4	48,1 ^b ±29,1	57,7
		5,0 mg/mL	267,8 ^a ±38,9	141,6 ^{ab} ±24,5	36,9 ^b ±33,7	65,2
		10,0 mg/mL	265,7 ^a ±43,8	77,4 ^b ±63,0	1,8 ^c ±4,7	99,0
	Tween 80 3%	2,5 mg/mL	266,7 ^a ±47,6	146,0 ^a ±26,9	93,8 ^a ±7,4	8,4
		5,0 mg/mL	267,3 ^a ±17,3	142,5 ^a ±22,2	89,0 ^{ab} ±9,8	15,3
		10,0 mg/mL	266,9 ^a ±23,5	142,9 ^a ±18,0	86,2 ^b ±12,7	17,6
<i>Origanum vulgare</i>	DMSO 3%	2,5 mg/mL	266,4 ^a ±32,7	140,4 ^{ab} ±16,2	84,5 ^{ab} ±13,3	20,5
		5,0 mg/mL	266,9 ^a ±60,4	126,3 ^{bc} ±37,4	70,5 ^b ±24,4	40,4
		10,0 mg/mL	266,0 ^a ±42,2	52,8 ^c ±68,3	22,4 ^c ±30,8	92,0
	Etanol 50%	2,5 mg/mL	266,3 ^a ±36,8	148,6 ^a ±25,9	77,7 ^a ±34,5	22,6
		5,0 mg/mL	266,4 ^a ±21,0	56,2 ^b ±53,2	32,6 ^b ±33,8	87,7
		10,0 mg/mL	267,7 ^a ±29,5	34,4 ^b ±39,6	2,3 ^b ±3,7	99,4
	Tween 80 3%	2,5 mg/mL	267,3 ^a ±51,7	135,8 ^a ±34,5	93,0 ^a ±9,2	15,6
		5,0 mg/mL	267,7 ^a ±46,9	123,6 ^a ±37,8	92,0 ^a ±6,6	24,2
		10,0 mg/mL	267,5 ^a ±50,1	138,8 ^a ±30,3	89,3 ^a ±18,1	17,2
<i>Litsea cubeba</i>	DMSO 3%	2,5 mg/mL	266,2 ^a ±57,5	144,4 ^{ab} ±32,5	94,7 ^a ±5,4	8,3
		5,0 mg/mL	266,5 ^a ±74,4	114,0 ^b ±36,5	81,0 ^b ±21,6	38,1
		10,0 mg/mL	277,5 ^a ±57,8	124,7 ^b ±17,8	79,6 ^b ±21,6	36,1
	Etanol 50%	2,5 mg/mL	256,1 ^a ±55,4	126,4 ^b ±18,6	82,8 ^a ±15,0	27,0
		5,0 mg/mL	266,2 ^a ±51,7	127,9 ^b ±22,1	43,5 ^b ±35,8	62,7
		10,0 mg/mL	267,0 ^a ±47,6	86,1 ^b ±64,7	22,5 ^b ±27,3	87,0
	Tween 80 3%	2,5 mg/mL	266,9 ^a ±53,6	138,0 ^{ab} ±26,9	86,1 ^a ±15,0	20,5
		5,0 mg/mL	267,2 ^a ±48,9	141,6 ^{ab} ±26,6	93,6 ^a ±4,1	11,5
		10,0 mg/mL	266,8 ^a ±45,5	126,2 ^b ±19,9	82,9 ^a ±30,4	30,0

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna, apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

* Percentual analisado em cima do controle água

Percentual de controle calculado de acordo com Drummond et al. (1973).

Leptospermum scoparium (LS), *Origanum vulgare* (OV) e *Litsea cubeba* (LC)

4. 2 - Avaliação da atividade acaricida das frações do OE de *Leptospermum scoparium*

4.2.1 - Composição química das frações do OE de *L. scoparium*

As frações A1, A2 e A3, resultantes do fracionamento cromatográfico do OE de *L. scoparium*, foram analisadas em CG/EM conduzindo a identificação de 22 constituintes que são listados na Tabela 4, juntamente com suas porcentagens, índices Kovats calculados (IK_C) em uma coluna RTX-5MS e índices Kovats da literatura (IK_{Lit})

A análise da composição química das frações revelou que em nenhuma delas houve isolamento das três β -tricetonas, no entanto, verificou-se que mais de 95% da composição das frações A2 e A3 é formada por substâncias dessa classe química, com predomínio da leptospermona nas duas frações (Tabela 4). Além disso, constatou-se que a fração A1 é formada apenas por constituintes apolares, com predominância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sendo o *cis*-calameneno (46,94%) o composto majoritário. Nessa fração não foram encontradas β -tricetonas.

Tabela 4 – Composição química, índice de Kovats calculado (IKC), índice de Kovats da literatura (IK_{Lit}) (Adams, 2009), percentagens dos componentes identificados e das classes químicas as quais eles pertencem (%) nas frações A1, A2 e A3, resultantes do fracionamento cromatográfico do óleo essencial de folhas de *Leptospermum scoparium* (LS)

Constituintes	IK _C	IK _{Lit}	Frações		
			A1	A2	A3
<i>Hidrocarboneto monoterpênico</i>			1,22	-	-
α -pineno	940	939	1,22	-	-
<i>Monoterpeno oxigenado</i>			-	0,49	-
1,8-cineol	1037	1031	-	0,49	-
<i>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</i>			98,78	-	-
α -cubebeno	1354	1351	3,94	-	-
α -copaeno	1381	1376	10,52	-	-
α -gurjuneno	1414	1409	1,18	-	-
(<i>E</i>)-cariofileno	1425	1419	2,24	-	-
Aromadendreno	1445	1441	4,09	-	-
9-epi-(<i>E</i>)-cariofileno	1467	1466	1,26	-	-
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1478	1476	2,09	-	-
γ -muuroleno	1481	1479	2,81	-	-
β -selineno	1491	1490	8,15	-	-
α -selineno	1500	1498	6,97	-	-
α -muuroleno	1504	1500	1,13	-	-
γ -cadineno	1519	1513	0,83	-	-
<i>cis</i> -calameneno	1529	1529	46,94	-	-
<i>trans</i> -cadina-1,4-dieno	1538	1534	5,08	-	-
α -calacoreno	1549	1545	1,54	-	-
<i>β- tricetonas</i>			-	97,44	96,01
Flavesona	1448	1547	-	17,56	21,81
iso-leptospermona	1623/1624 ^a	1622	-	22,50	6,13
Leptospermona	1634	1630	-	57,38	68,07
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>			-	2,06	3,99
Gleenol	1589	1587	-	-	3,99
Cubenol	1650	1646	-	2,06	-
Total identificado			100,00	99,99	100,00

^aValor de IK_C obtido apenas para componente de A2

4.2.2 - Atividade acaricida das frações do OE de *L. scoparium* sobre larvas não alimentadas

Os tratamentos com as frações A2 e A3, ricas em β -tricetonas, resultaram em um percentual de mortalidade superior a 46% desde a menor concentração (0,625 mg/mL) e superior a 97% a partir da concentração de 2,5 mg/mL. A fração A1, composta majoritariamente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, resultou em mortalidade de 10 e 98%

na menor (0,625 mg/mL) e maior (10,0 mg/mL) concentração, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes frações do óleo essencial de *Leptospermum scoparium* em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 85 \pm 5\%$)

Tratamentos	A1	A2	A3
Controle H ₂ O	5,4 ^a ± 3,0	5,4 ^a ± 3,0	5,4 ^a ± 3,0
Controle Etanol	6,4 ^a ± 6,0	6,4 ^a ± 6,0	6,4 ^a ± 6,0
0,625 mg/mL	10,2 ^{ab} ± 3,4	53,2 ^a ± 22,6	46,4 ^{ab} ± 2,1
1,25 mg/mL	5,5 ^a ± 2,1	50,5 ^a ± 20,8	86,8 ^{bc} ± 11,4
2,5 mg/mL	21,9 ^{bc} ± 6,6	99,2 ^b ± 1,0	97,9 ^{cd} ± 2,0
5,0 mg/mL	89,7 ^{cd} ± 9,6	100,0 ^b ± 0,0	100,0 ^d ± 0,0
10 mg/mL	98,9 ^d ± 1,5	100,0 ^b ± 0,0	100,0 ^d ± 0,0

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

4.2.3 - Atividade acaricida das frações do óleo essencial de *L. scoparium* sobre fêmeas ingurgitadas

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de todos os grupos tratados com a fração A1 produziram menos ovos ($p < 0,05$) do que as fêmeas dos grupos controle, enquanto nos tratamentos com as frações A2 e A3, somente a maior concentração (10 mg/mL) resultou na diminuição ($p < 0,05$) de ovos produzidos. Em relação à viabilidade dos ovos, foi observado que todos os grupos tratados apresentaram percentual de eclosão larval inferior ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle, com exceção do grupo tratado com a fração A2, na menor concentração (Tabela 6). Nos tratamentos com a fração A1, todos os tratamentos resultaram em percentual de controle superior a 95%, enquanto nos tratamentos com as frações A2 e A3, resultado semelhante foi observado somente na maior concentração (Tabela 6).

Tabela 6 - Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes frações dos óleos essenciais de *Leptospermum scoparium*, em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $> 85 \pm 5\%$)

Frações	Concentrações	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão de larvas (%)	Percentual de controle (%)
	Etanol 50%	195,3 ^a ±53,8	99 ^a ±41,66	87,7 ^a ±9,2	
A1	2,5 mg/mL	197,3 ^a ±38,5	27,6 ^b ±40,3	5,8 ^b ±11,5	98,3
	5,0 mg/mL	198,6 ^a ±38,6	19,4 ^b ±41,5	4,8 ^b ±6,4	99,0
	10,0 mg/mL	198,7 ^a ±29,8	2,6 ^b ±8,2	0,0 ^b ±0,0	100
A2	2,5 mg/mL	197,7 ^a ±32,1	107 ^a ±19,8	72,8 ^a ±29,9	16,4
	5,0 mg/mL	197,2 ^a ±40,1	85,2 ^a ±48,2	37,7 ^b ±28,6	65,5
	10,0 mg/mL	195,3 ^a ±49,3	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	100
A3	2,5 mg/mL	195,2 ^a ±35,1	90,4 ^a ±38,1	50,2 ^b ±30,5	50,7
	5,0 mg/mL	197,8 ^a ±32,2	89,6 ^a ±44,7	52,9 ^b ±31,8	48,7
	10,0 mg/mL	196,4 ^a ±47,8	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^c ±0,0	100

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

5 DISCUSSÃO

A busca por produtos naturais extraídos de plantas para serem utilizadas no controle de carrapatos tem se intensificado nas últimas décadas (BORGES et al., 2011; BENELLI et al., 2016; PAVELA et al., 2016; ROSADO-AGUILAR et al., 2017; BENELLI; PAVELA, 2018; KONIG et al., 2019). Caracterizar substâncias encontradas em OEs é de grande importância para identificação dos compostos responsáveis pela atividade no organismo alvo (KIM et al., 2015), assim como a triagem de solventes que visem a potencialização desses compostos. No presente estudo, evidenciamos as diferenças nas atividades dos OEs de *L. scoparium*, *O. vulgare* e *L. cubeba* de acordo com o solvente utilizado, mostrando que a escolha do solvente pode influenciar na atividade carrapaticida dos OEs. Também apresentamos o primeiro relato da atividade do OE de *L. scoparium* e frações de seu OE dessa planta sobre carrapatos.

A caracterização fitoquímica do OE da folha de *L. scoparium* já foi evidenciada em diferentes estudos (PORTER; WILKINS, 1998; DOUGLAS, 2004; FANG et al., 2016; MUTURI, 2020), porém, diferenças quantitativas e/ou qualitativas da composição química foram observadas nos resultados desses estudos. No presente trabalho, foi evidenciado o hidrocarboneto sesquiterpênico, *cis*-calameneno, em maior proporção, seguido da β -tricetona, leptospermona; sendo estes resultados semelhantes aos dados encontrados por Muturi et al. (2020). Entretanto, nos estudos de Porter e Wilkins (1998), Douglas et al. (2004) e Fang et al. (2016), as análises químicas revelaram que a leptospermona foi o composto majoritário. Essas diferenças podem estar relacionadas ao local de origem da planta, genótipo/linhagem, a época de colheita ou até mesmo a parte da planta utilizada para obtenção do OE (PAVELA; BENELLI, 2016).

A análise fitoquímica do OE de *O. vulgare* revelou que o carvacrol, monoterpene oxigenado, foi o composto majoritário, assim como observado em outros estudos disponíveis na literatura (BHAT et al., 2018; XIE et al., 2019; BURGGRAF; RIENTH, 2020).

Na composição do OE de frutos *L. cubeba* do presente estudo, os monoterpenos oxigenados, totalizaram mais de 80% dos compostos, sendo o geranial e neral os compostos majoritários. O limoneno, hidrocarboneto monoterpênico, foi o terceiro constituinte mais abundante detectado nesse óleo. Esses também foram os compostos majoritários encontrados em estudo com *L. cubeba* coletadas de oito localidades na China (SI et al., 2012). Essas variações observadas são descritas por Nardoni et al. (2019), no qual foi relatado grandes variações percentuais entre estes três compostos majoritários. Essas diferenças observadas no OE *L. cubeba* podem, em última análise, ser resultado de diferentes métodos de extração ou

purificação, ou até mesmo da interação gene e ambiente (SI et al., 2012).

Em relação às atividades dos OEs, pode-se afirmar que o potencial do OE de *L. scoparium* tem sido evidenciado para diversos organismos como bactérias (PORTER; WILKINS, 1998; JEONG et al., 2018; SONG et al., 2019;), fungos (CHEN et al., 2014), insetos (PARK et al., 2017; MUTURI et al., 2020) e ácaros (JEONG et al., 2009); porém, sua ação biocida nunca foi relatada em carrapatos. Este estudo demonstrou que o OE de *L. scoparium* apresentou 100% de eficácia contra larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, dependendo da concentração e solvente. Esse OE apresentou em sua composição química, mais de 60% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Outros estudos com OEs ricos em sesquiterpenos tais como, biciclogermacreno (LEBOUVIER et al., 2013) nerolidol (LAGE et al., 2015) e o α -bisabolol (MARCHESINI et al., 2020) também evidenciaram a atividade carrapaticida desses OEs. Por serem compostos lipofílicos, os terpenos (incluindo os sesquiterpenos) apresentam grande potencial citotóxico, podendo causar alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais em artrópodes (PRATES; SANTOS, 2002). Kim et al. (2003) relataram que quanto maior a característica lipossolúvel de um composto químico, maior é capacidade de penetração no tegumento de insetos.

O presente trabalho demonstrou que OE de *O. vulgare* apresenta atividade sobre *R. microplus*. Os óleos essenciais do gênero *Origanum* tem sido largamente estudado e sua atividade já foi documentada para diversos organismos, tais como: bactérias (CATTELAN et al., 2013), fungos (BURGGRAF; RIENTH, 2020), insetos (MUDRONČEKOVÁ et al., 2019; XIE et al., 2019), ácaros (SHANG et al., 2016; MAHMOUD et al., 2019) e também carrapatos (COSKUN et al., 2008; CORRÊA, 2017). De acordo com López et al. (2018), o mecanismo de toxicidade do gênero *Origanum* está relacionado ao carvacrol, monoterpene que geralmente é o composto majoritário do OE de plantas desse gênero. Cruz et al. (2013), ao avaliarem a atividade carrapaticida de *Lippia gracillis* sobre *R. microplus*, atribuíram a atividade carrapaticida desse OE a presença carvacrol. Senra et al., (2013 a, b) demonstraram que o carvacrol apresenta atividade para *R. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 e *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888). O carvacrol, composto majoritário do OE de *O. vulgare* provoca forte inibição da AChE (PARK et al., 2016) e ação na ligação dos receptores GABA (Ácido gama-aminobutírico) de insetos (TONG; COATS, 2010; TONG et al., 2013), bem como alterações morfológicas nos ovários e inibição na produção dos oócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* (SOUZA et al., 2019). Porém, Corrêa (2017) ao analisar a atividade do OE de *O. vulgare* sobre *R. microplus* concluiu que o óleo não apresentou atividade para larvas. Essas diferenças encontradas, entre

os resultados, podem ser oriundas da cepa do carrapato utilizada, do composto majoritário presente no OE (4 terpineol) e o solvente utilizado para diluição do OE (Tween 80 3%).

A atividade do OE de *L. cubeba* é documentada para diversas espécies, incluindo microrganismos (PUMNUAN et al., 2010; ZHANG et al., 2012; LU et al., 2019; WANG et al., 2019) e artrópodes (NOOSIDUM et al., 2008; YANG et al., 2014; CHAKIRA et al., 2017; ZHANG et al., 2017; XIAO et al., 2020). No entanto, ao avaliar a atividade do OE de *L. cubeba*, na concentração de 100%, sobre *R. microplus*, Dutta et al. (2018) observaram atividade parcial do OE no teste de imersão de adultos, no entanto no teste de campo não foi observado atividade do óleo para ninfas. Esses resultados diferem do presente estudo, visto que a atividade do OE foi observada para ambos os estágios. Essas diferenças podem estar relacionadas a metodologia utilizada, local de origem da planta (PAVELA; BENELLI, 2016), cepa do carrapato (SINGH et al., 2016), bem como os constituintes químicos presentes na planta. Estudos evidenciam que os compostos majoritários presentes em *L. cubeba*, tais como geraniol e neral, tem atividade para *Cladosporium oxysporum* (CALDAS et al., 2016), *Dermatophagoides farinae* e *Tyrophagus putrescentiae* (JEON; LEE, 2016), *Cronobacter sakazakii* (SHI et al., 2016) e também para *R. microplus* (PEIXOTO et al., 2015; De SOUZA CHAGAS et al., 2016).

Nos testes com os três OEs, tanto para larvas quanto para fêmeas, os OEs apresentaram maior atividade quando diluídos em etanol e DMSO. Vale ressaltar que tanto o etanol como o DMSO são solventes de moléculas polares e/ou apolares e tem sido utilizados, em baixas concentrações, em vários experimentos *in vitro* ou *in vivo* e apresentam baixa toxicidade quando usado em concentrações adequadas (CHAGAS et al., 2003; GALVÃO et al., 2017; GONÇALVES et al., 2007; RESENDE et al., 2012). Por serem solventes orgânicos hidrofílicos, o etanol e DMSO apresentam a importante característica de atravessar as membranas e carrear o agente tóxico às células alvo. A interação dos agentes tóxicos com a água ao redor da molécula enzimática pode comprometer suas funções, modificar sua estrutura espacial e resultar na desidratação da molécula (GORMAN et al., 1992; DU et al., 2004). Nesse sentido, se a solubilidade do OE não estiver adequada, a passagem dos ativos pelas membranas celulares pode ficar comprometida ou até mesmo impedida de chegar ao local de ação (NASCIMENTO et al., 2007).

Surfactantes, ou tensoativos, como o Tween 80, tem como característica a atividade detergente devido às suas extremidades, sendo uma polar e outra apolar. Essas substâncias atuam envolvendo outras substâncias em aglomerados micelares, facilitando sua dispersão em meios diferentes de polaridades (COX et al., 2000; TAKARADA et al., 2004). Os

Surfactantes, ou tensoativos, podem formar microemulsões do tipo água/óleo ou óleo/água e podem afetar as propriedades interfaciais de ambos os sistemas, agindo como um espaçador entre a membrana e o ativo (KALAITZAKI et al., 2015). Os OEs possuem características singulares que podem ser alteradas facilmente e interferir na sua eficácia (NASCIMENTO et al., 2007), de modo que a dissolução insuficiente dos componentes testados é um dos fatores que pode interferir em sua atividade. Se a solubilidade da formulação não for adequada, pode haver comprometimento da passagem dos ativos pelas membranas celulares (KOGAN et al., 2009), conforme descrito por Nascimento et al. (2007) quanto a atividade microbiana de OEs.

No presente trabalho, nos testes com as frações do OE de *L. scoparium*, ficou evidenciado que as frações ricas em β -tricetonas (A2 e A3) apresentaram maior atividade sobre larvas não alimentadas, enquanto a fração A1, rica no sesquiterpeno *cis*-calameneno apresentou maior atividade sobre as fêmeas ingurgitadas. Resultados semelhantes aos encontrados por Muturi et al. (2020) ao analisar a atividade do OE e quatro frações de *L. scoparium* sobre larvas de *Aedes aegypti* (L.), onde a fração rica em leptospermona foi a que apresentou maior atividade, enquanto a fração rica em *cis*-calameneno não apresentou atividade para as larvas desse inseto. Park et al., (2017) ao avaliarem a ação inseticida do OE e das frações de *L. scoparium* sobre *Drosophila suzukii*, concluíram que a fração apolar do EO de *L. scoparium* não apresentou atividade inseticida, enquanto a fração polar e a fração de tricetonas exibiram atividade maior do que o OE. As ceras presentes na epicutícula dos carrapatos têm função de proteção contra o dessecamento, e a produção desta cera é mais evidente em ninfas e fêmeas (LEES, 1947; SONENSHINE, 1991). Nas fêmeas, esta cera pode ter sido um fator de proteção, dificultando a permeabilidade dos compostos através das membranas. Assim, a maior atividade carrapaticida, sobre o estágio imaturo, das frações ricas em β -tricetonas pode estar relacionada a maior lipossolubilidade desses compostos na cutícula das larvas não alimentadas. Uma vez que os ativos ultrapassem a cutícula, certas tricetonas podem atuar rompendo o citoplasma das membranas devido à sua natureza hidrofóbica sendo tóxicas para as células animais e bacterianas (Van KLINK et al., 2005; SONG et al., 2019).

Como relatado anteriormente, a fração A1, composta majoritariamente por sesquiterpenos, tendo o *cis*-calameneno como composto majoritário, teve maior atividade sobre as fêmeas ingurgitadas. Por possuírem estruturas químicas diversas, os sesquiterpenos possuem um amplo espectro de bioatividade (BENELLI et al. 2018), o que pode ter comprometido as funções reprodutivas das fêmeas de *R. microplus*, reduzindo a quantidade e qualidade dos ovos produzidos, com conseqüente percentual de controle elevado já na menor concentração. Vários estudos já correlacionaram a ação de terpenos às funções reprodutivas

do ovário e órgão de Gené de carrapatos, com alterações na forma e/ou desenvolvimento dos oócitos (ARNOSTI et al., 2011; MATOS et al, 2014; KONIG et al., 2019; SOUZA et al., 2019; MATOS et al., 2020). Nesse sentido, os sesquiterpenos presentes na fração A1, como o composto majoritário *cis*-calameneno, podem ter atuado de maneira mais acentuada no sistema reprodutivo das fêmeas de *R. microplus*, interferindo na ovipostura e viabilidade dos ovos. Essa hipótese merece ser futuramente investigada.

Comparando a atividade do OE de *L. scoparium*, diluído em etanol, com as frações, podemos concluir que o OE apresentou melhor atividade para larvas não alimentadas, enquanto a fração A1, rica em hidrocarbonetos sesquiterpenos, apresentou atividade inferior. Esses resultados sugerem que os constituintes presentes no OE podem estar agindo de forma aditiva ou sinérgica, contribuindo igualmente para os efeitos tóxicos observados. Outros estudos já relataram que os óleos essenciais podem apresentar maior atividade do que seus compostos isolados (MIRESMAILLI et al., 2006; SINGH et al., 2009) devido à mistura de moléculas presentes nos OEs, que pode resultar em um efeito sinérgico. Em contra partida, as frações A2 e A3 (ricas em β -tricetonas) apresentaram maior atividade em larvas não alimentadas em comparação com o OE *L. scoparium*.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos foi concluído que:

1 - Os OEs de *L. scoparium*, *O. vulgare* e *L. cubeba* apresentam atividade acaricida sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo o OE de *L. scoparium* o mais ativo e o OE de *L. cubeba* o menos ativo.

2 - A fração A1 do OE *L. scoparium*, rica em hidrocarbonetos sesquiterpênicos, apresenta maior atividade sobre fêmeas ingurgitadas, enquanto as frações A2 e A3, ricas em β -tricetonas, mostraram maior atividade sobre larvas não alimentadas de *R. microplus*.

3 - A atividade de cada OE está diretamente relacionada com o tipo de solvente utilizado, quando os OEs foram diluídos em DMSO e etanol mostraram maior atividade acaricida em comparação com o surfactante Tween 80 .

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunidade científica está cada vez mais interessada em possibilidades para potencializar o controle de carrapatos. Substâncias naturais apresentam consideráveis vantagens econômicas, assim como redução nos impactos ambientais e diminuição da repercussão em organismos não alvos. Os OEs de *L. scoparium*, *O. vulgare* e *L. cubeba* e as frações do OE *L. scoparium* demonstraram atividade *in vitro* sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Embora as frações tenham resultados diferenciados para cada estágio de desenvolvimento, os compostos estabeleceram elevado nível de controle dos carrapatos.

A redução na eficácia dos carrapaticidas sintéticos promovem uma reflexão a respeito dos desenvolvimentos de resistências a fármacos e o quanto essa modificação influencia na suscetibilidade dos carrapatos a compostos de origem vegetal. Assim sendo, é fundamental que estudos *in vitro* sejam realizados para identificar variados compostos de origem vegetal com potencial atividade carrapaticida para diferentes estágios de desenvolvimento, assim como futuras investigações devem ser realizadas para verificar, por meio de testes de campo, a toxicidade desses OEs e frações sobre mamíferos e outros organismos não alvos, além da condução de estudos histológicos/histoquímicos em carrapatos, de forma a elucidar os mecanismos de ação desses compostos para tornar o controle de *R. microplus* mais seguro para as pessoas que aplicam os carrapaticidas, hospedeiros e ambiente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, IL, USA, 2009.
- ADENUBI, O.T.; AHMED, A.S.; FASINA, F.O.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: a systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 779-806, 2018.
- AFRIN, S.; FORBES-HERNANDEZ, T.Y.; GASPARRINI, M.; BOMPADRE, S.; QUILES, J.L.; SANNA, G.; SPANO, N.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. Strawberry-tree honey induces growth inhibition of human colon cancer cells and increases ROS generation: A comparison with Manuka honey. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 613, 2017.
- ALJAAFARI, M. N.; ALALI, A.O.; BAQAIS, L.; ALQUBAISY, M.; ALALI, M.; MOLOUKI, A.; ONG-ABDULLAH, J.; ABUSHELAIABI, A.; LAI, K-S.; LIM, S-HE An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. **Molecules**, v. 26, p. 628–655, 2021.
- ALSUP, E.M.; DeBOWES, R.M. Dimethyl sulfoxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 9, p. 1011-1014, 1984.
- ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; GASPARRINI, M.; FORBES-HERNÁNDEZ, T.Y.; MAZZONI, L.; GIAMPIERI, F. The composition and biological activity of honey: a focus on Manuka honey. **Foods**, v. 3, n. 3, p. 420-432, 2014.
- AMARAL, M.A.Z.D.; ROCHA, C.M.B.M.D.; FACCINI, J.L.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C.M.D.O.; PRATA, M.C.D.A. Perceptions and attitudes among milk producers in Minas Gerais regarding cattle tick biology and control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 194-201, 2011.
- ANGUS, B.M. The history of the cattle tick *Boophilus microptus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1341-1355, 1996.
- ARNOSTI, A.; BRIENZA, P.D.; FURQUIM, K.C.S.; CHIERICE, G.O.; CLARONETO, S.; BECHARA, G.H.; SAMPIERI, B.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I., 2011. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 569-574, 2011.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. D. A. D. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamirauá. Belém, PA, 2007.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BEADLES, M.L.; DRUMMOND, R.O.; WHETSTONE, T.M. Tropical horse tick: effects of solvents on oviposition. **Journal Economic Entomology**, v. 66, p. 125-127, 1973.

BENEDEC, D.; ONIGA, I.; CUIBUS, F.; SEVASTRE, B.; STIUFIUC, G.; DUMA, M.; HANGANU, D.; IACOVITA, C.; STIUFIUC, R.; LUCACIU, C. M. *Origanum vulgare* mediated green synthesis of biocompatible gold nanoparticles simultaneously possessing plasmonic, antioxidant and antimicrobial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1041, 2018.

BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks - a systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47-54, 2018.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, v. 115, p. 2545-2560, 2016.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; GIORDANI, C.; CASETTARI, L.; CURZI, G.; CAPPELLACCI, L.; MAGGI, F. Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 668-680, 2018.

BHAT, V.; SHARMA, S.M.; SHETTY, V.; SHASTRY, C.S.; VAMAN RAO, C.; SHENOY, S.; SAHA, S.; BALAJI, S. Characterization of herbal antifungal agent, *Origanum vulgare* against oral *Candida* spp. isolated from patients with Candida-Associated denture stomatitis: An In vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 9, n. 5, 2018.

BISCHOFBERGER, A.S.; DART, C.M.; HORADAGODA, N.; PERKINS, N.R.; JEFFCOTT, L.B.; LITTLE, C.B.; DART, A.J. Effect of Manuka honey gel on the transforming growth factor β 1 and β 3 concentrations, bacterial counts and histomorphology of contaminated full-thickness skin wounds in equine distal limbs. **Australian Veterinary Journal**, v. 94(1-2), p. 27-34, 2016.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32(3), p. 588-594, 2009.

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 de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.89-96, 2011.

BURGER, T.D.; SHAO, R.; BARKER, S.C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, in press, 2014.

BURGGRAF, A.; RIENTH, M. *Origanum vulgare* essential oil vapour impedes *Botrytis cinerea* development on grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 59, n. 2, p. 331-344, 2020.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALDAS, C.P.M.; SOUSA, J.P.; PÉREZ, A.L.L.; SANTOS, J.M.C.G.; OLIVEIRA, H.M.B.F.; OLIVEIRA FILHO, A.A.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica in silico e in vitro do monoterpeno Citral. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.14, n.2,

p.905-912, 2016.

CALVAYRAC, C.; MARTIN-LAURENT, F.; FAVEAUX, A.; PICAULT, N.; PANAUD, O.; COSTE, C. M.; CHAABANE, H.; COOPER, J.F. Isolation and characterisation of a bacterial strain degrading the herbicide sulcotrione from an agricultural soil. **Pest Management Science**, v. 68(3), p. 340-347, 2012.

CATTELAN, M.G.; DE CASTILHOS, M.B.M.; SALES, P.J.P.; HOFFMANN, F.L. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition & Food Science**, v. 43, n. 2, p. 169-174, 2013.

CATTO, J.B. Potencial acaricida de plantas como componente de sistema integrado para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Andreotti, R., Koller, W.W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas**. Campo Grande: Embrapa. p. 119-135, 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**, v.33, n.1, p. 109-114, 2003.

CHAKIRA, H.; LONG, M.; LIU, S.; ZHAO, J.; HE, Y.; WAGAN, T. A.; HUA, H. Repellency of essential oils against *Nephotettix cincticeps*: Laboratory and glasshouse assays. **Journal of Applied Entomology**, v. 141, n. 9, p. 708-720, 2017.

CHEN, C.C.; YAN, S.H.; YEN, M.Y.; WU, P.F.; LIAO, W.T.; HUANG, T.S.; WEN, Z. H.; WANG, H.M.D. Investigations of kanuka and manuka essential oils for in vitro treatment of disease and cellular inflammation caused by infectious microorganisms. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v 20, p. 1 e 8, 2014.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines**, v.4, n.58, p.1-22, 2017.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 1ª ed. Guaíba: Agropecuária, p. 176, 1997.

CORRÊA, R.D.S. **Caracterização dos constituintes químicos e avaliação in vitro dos óleos essenciais de *Laurus nobilis*, *Illicium verum* e *Origanum vulgare* sobre *Rhipicephalus microplus***. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal). 52p. Universidade de Cuiabá, Mato Grosso, 2017.

COSKUN, S.; GIRISGIN, O.; KÜRKCÜOĞLU, M.; MALYER, H.; GIRISGIN, A.O.; KIRIMER, N.; BASER, K.H. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 259-261, 2008.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

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**, v. 195, n. 1-2, p. 198-202, 2013.

DAM, D.; MOLITOR, D.; BEYER, M. Natural compounds for controlling *Drosophila suzukii*. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 39, n. 6, p. 53, 2019.

DAYAN, F.E.; DUKE, S.O.; SAULDUBOIS, A.; SINGH, N.; MCCURDY, C.; CANTRELL, C. *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for β -triketones from *Leptospermum scoparium*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2004-2014, 2007.

DE CASTRO, J.J.; NEWSON, R.M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology Today**, v. 9, n. 1, p. 13-17, 1993.

DE LA FUENTE, J.; ANTUNES, S.; BONNET, S.; CABEZAS-CRUZ, A.; DOMINGOS, A.G.; ESTRADA-PENA, A.; JOHNSON, N.; KOCAN, K.M.; MANSFIELD, K.L.; NIJHOF, A.M.; PAPA, A.; RUDENKO, N.; VILLAR, M.; ALBERDI, P.; TORINA, A.; AYLLON, N.; VANCOVA, M.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; CARACAPPA, S.; FOOKS, A.R.; GORTAZAR, C.; REGO, R.O.M. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 114, 2017.

DE SOUZA CHAGAS, A.C.; OLIVEIRA, M.C.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R.C.; BIZZO, H. R.; GAMA, P.E.; CHAVES, F.C. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.3, p.427-432, 2016.

DOUGLAS, M.H.; VAN KLINK, J.W.; SMALLFIELD, B.M.; PERRY, N. B.; ANDERSON, R.E.; JOHNSTONE, P.; WEAVERS, R.T. Essential oils from New Zealand manuka: triketone and other chemotypes of *Leptospermum scoparium*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 9, p. 1255-1264, 2004.

DRUMMOND, R.O.; ERNST, S.E.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, p. 130-133, 1973.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 125-129, 2004.

DUTTA, P.; CHAMUAH, J.; KUMAR, A.; DOWARAH, R.; KHAN, M. Comparative Efficacy of Herbal (Lemon Grass Oil and Litsea Grass oil) and Synthetic (Deltamethrin, Fipronil, Amitraz) Agents against *Rhipicephalus microplus* Infestation in Mithun (*Bos frontalis*). **International Journal of Livestock Research**, v. 8, n. 11, p. 221-228, 2018.

ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, p. 233-243, 2014.

EL-SAYED, A.M., 2018. **The Pherobase**: Database of Insect Pheromones and

Semiochemicals. <http://www.pherobase.com/>, acesso em 07 Julho de 2020.

EVANS, M.S.; REID, K.H.; SHARP JR, J.B. Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. **Neuroscience Letters**, v. 150, n. 2, p. 145-148, 1993.

FANG, F.; CANDY, K.; MELLOUL, E.; BERNIGAUD, C.; CHAI, L.; DARMON, C.; HUANG, W. In vitro activity of ten essential oils against *Sarcoptes scabiei*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 594, 2016.

FENG, J.; ZENG, Y.; MA, C.; CAI, X.; ZHANG, Q.; TONG, M.; YU, B.; XU, P. The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7390, 2006.

FIGUEIREDO, A.; AGNOLON, I.C.; LOPES, L.G.; GIGLIOTI, R.; CHAGAS, A.C.S. Comparative study of hatching estimation methods of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 264, p. 35-38, 2018.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 23, p. 53-56, 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 1-7, 2007.

GALVÃO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E.; DUCHEN, M. R.; CORDEIRO, F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317- 1330, 2017.

GEORGE, D.R.; FINN, R.D.; GRAHAM, K.M.; OLIVIER, S.A.E.O. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. **Parasites Vectors**, v.7, p.1-28, 2014.

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**, v.100, p.1267–1270, 2007.

GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995.

GORMAN, L.A.S.; DORDICK, J.S. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 392, 1992.

GOULAS, A.E.; KONTOMINAS, M.G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 100, p. 287-296, 2007.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; LUGHADHA, E.N.; PROENÇA, C.; SILVA, L.H.S.; WILSON, P.; LUCAS, E. **World Checklist of Myrtaceae**. Royal Botanic Gardens, 2008.

GRIPPA, G.A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.

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

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.; BARROS, A.T.; CANCADO, P.H.D. Reassessment of economic impact by cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GUARDA, A.; RUBILAR, J.F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M.J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144-150, 2011.

GUGLIELMONE, A.A.; SZABÓ, M.P.J.; 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, p. 115-138, 2006.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, R. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 326-333, 2015.

HU, M.; NICULESCU, M.; ZHANG, X.M.; HUI, A. High-performance liquid chromatographic determination of polysorbate 80 in pharmaceutical suspensions. **Journal of Chromatography A**, v. 984, n. 2, p. 233-236, 2003.

IPNI (2021). International Plant Names Index. Published on the Internet <http://www.ipni.org>, The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens. [Retrieved 24 May 2021].

ISMAIL, N.; MCBRIDE, J.W. Tick-Borne Emerging Infections: Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 317-340, 2017.

JEON, Y.J.; LEE, H.S. Chemical composition and acaricidal activities of essential oils of *Litsea cubeba* fruits and *Mentha arvensis* leaves against house dust and stored food mites. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.19, n.7, p.1721-1728, 2016.

JEONG, E.Y.; KIM, M.G.; LEE, H.S. Acaricidal activity of triketone analogues derived from *Leptospermum scoparium* oil against house-dust and stored-food mites. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 65, n. 3, p. 327-331, 2009.

JEONG, E.Y.; LEE, M.J.; LEE, H.S. Antimicrobial activities of leptospermone isolated from *Leptospermum scoparium* seeds and structure–activity relationships of its derivatives against foodborne bacteria. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1541-1547, 2018.

JETTER, K.; PAINE, T.D. Consumer preferences and willingness to pay for biological control in the urban landscape. **Biological Control**, v. 30, p. 312–322, 2004.

- JIN, D.; JIANG, X.; JING, X.; OU, Z. Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, n. 1-2, p. 215-221, 2007.
- KAHLO, F. **O diário de Frida Kahlo: um autorretrato íntimo**. Tradução de Mário Pontes. Introdução de Frederico Morais. 3. ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 2015. 280 p.
- KALAITZAKI, A.; PAPANIKOLAOU, N.E.; KARAMAOUNA, F.; DOURTOGLOU, V.; XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V. Biocompatible colloidal dispersions as potential formulations of natural pyrethrins: a structural and efficacy study. **Langmuir**, v. 31, n. 21, p. 5722-5730, 2015.
- KAREKAR, V.; JOSHI, S.; SHINDE, S.L. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 468, n. 2, p. 183-194, 2000.
- KIM, E.; MOORE, B.S.; YOON, Y.J. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. **Nature Chemical Biology**, v. 11, p. 649-659, 2015.
- KIM, E.H.; KIM, H.K.; CHOI, D.H.; AHN, Y.J. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari:Acariidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 38, n. 2, p. 261-266, 2003.
- KLAFKE, G.M. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M.C. et al. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, controle e resistência***. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-105, 2008.
- KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B.D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L.H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M.F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.8, n.1, p.73-80, 2017.
- KOGAN, A.; ROZNER, S.; MEHTA, S.; ASERIN, A.; GARTI, N.; OTTAVIANI, M. F. Characterization of the nonionic microemulsions by EPR. I. Effect of solubilized drug on nanostructure. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 3, p. 691-699, 2009.
- KOLB, K.H.; JAENICKE, G.; KRAMER, M.; SCHULZE, P.E. Absorption, distribution and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in man and animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 141, n. 1, p. 85-95, 1967.
- KONIG, I.F.M.; GONÇALVES, R.R.P.; OLIVEIRA, M.V.S.; SILVA, C.M.; THOMASI, S.S.; PECONICK, A.P.; REMEDIO, R.N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 766-774, 2019.
- 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**, v. 148, p. 24-29, 2015.

LE GALL, V.L.; KLAFKE, G.M.; TORRES, T.T. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Scientific Reports**, v.8, p.12401, 2018.

LEBOUVIER, N.; HUE, T.; HNAWIA, E.; LESAFFRE, L.; MENUT, C.; NOUR, M. Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1379-1384, 2013.

LEES, A.D. Transpiration and the structure of the epicuticle in ticks. **The Journal of Experimental Biology**, v. 23, n. 3-4, p. 379-410, 1947.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.; HART, S. Bioactivity of New Zealand medicinal plant essential oils. In **International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 426, p. 13-30, 1996.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S.L.; DEANS, S.G. Pharmacological and Antimicrobial Studies on Different Tea Tree Oils (*M. alternifolia*, *L. scoparium* or Manuka and *K. ericioides* or Kanuka), Originating in Australia and New Zealand. **Phytother Research**, v. 14, p. 623-629, 2000.

LÓPEZ, V.; CASCELLA, M.; BENELLI, G.; MAGGI, F.; GÓMEZ-RINCÓN, C. Green drugs in the fight against *Anisakis simplex*-larvicidal activity and acetylcholinesterase inhibition of *Origanum compactum* essential oil. **Parasitology Research**, v. 117, p. 861-867, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 544p, 2008.

LU, Q.; LIU, J.; TU, C.; LI, J.; LEI, C.; GUO, Q.; QIN, W. In vitro antibacterial activity of 34 plant essential oils against *Alternaria alternata*. In: E3S Web of Conferences. **EDP Sciences**, 2019.

MADDOCKS-JENNINGS, W.; WILKINSON, J.M.; SHILLINGTON, D.; CAVANAGH, H. A fresh look at manuka and kanuka essential oils from New Zealand. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 141-146, 2005.

MAHMOUD, N.F.; BADAWY, M.E.; MAREI, A.E.S.M.; ABDELGALEIL, S.A. Acaricidal and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from six plants growing in Egypt. **International Journal of Acarology**, v. 45, n. 4, p. 245-251, 2019.

MARCHESINI, P.B.C; NOVATO, T.P.; CARDOSO, S.J.; PRATA, M.C.A; NASCIMENTO, R.M.; KLAFKE, G.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; MATURANO, R.; LOPES, W.D.Z.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; MONTEIRO, C.M.O. Acaricidal activity of (E)-cinnamaldehyde and α -bisabolol on populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) with different resistance profiles. **Veterinary Parasitology**, v. X, p. 109226, 2020.

MARTINS, J.R.; DOYLE, R.L.; GONZALES, J. C. Principais resultados de testes carrapaticidas in vitro empregando-se o teste de imersão de adultos no IPVDF, Eldorado do Sul, RS. In: **Anais do 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 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**, v. 113, p. 4555-4565, 2014.

MATOS, R.S.; ROSA, P.; BRITO, L.C.M.; PAULA, L.G.F.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol: effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, 101308, 2020.

MIRESMAILLI, S.; BRADBURY, R.; ISMAN, M.B. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 62, p. 366–371, 2006.

MORENO, J.J. Liberação de ácido araquidônico e síntese de prostaglandina E2 como índice irritante de surfactantes em culturas de fibroblastos 3T6. **Toxicologia**, v. 143, n. 3, p. 275-282, 2000.

MUDRONČEKOVÁ, S.; FERENČÍK, J.; GRUĽOVÁ, D.; BARTA, M. Insecticidal and repellent effects of plant essential oils against *Ips typographus*. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 2, p. 595-608, 2019.

MUTURI, E.J.; VENDA, G.W.; BONECA, K.M.; FENO, W.T.; RAMIREZ, J.L. *Leptospermum scoparium* essential oil is a promising source of mosquito larvicide and its toxicity is enhanced by a biobased emulsifier. **PLoS One**, v. 15, n. 2, p. e0229076, 2020.

NARDONI, S.; NAJAR, B.; FRONTE, B.; PISTELLI, L.; MANCIANTI, F. In vitro activity of essential oils against *Saprolegnia parasitica*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1270, 2019.

NASCIMENTO, P.F.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, Â.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NOOSIDUM, A.; PRABARIPAI, A.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; CHANDRAPATYA, A. Excito-repellency properties of essential oils from *Melaleuca leucadendron* L., *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon, and *Litsea salicifolia* (Nees) on *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 33, p. 305-312, 2008.

NOVATO, T.; GOMES, G.A.; ZERINGÓTA, V.; FRANCO, C.T.; DE OLIVEIRA, D.R.; MELO, D.; DE CARVALHO, M.G.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C.M. In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated

derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 260, p. 1-4, 2018.

NWANADE, C. F.; WANG, M.; WANG, T.; YU, Z.; LIU, J. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, n. 1, p. 1-35, 2020.

PARK, C.G.; JANG, M.; SHIN, E.; KIM, J. Myrtaceae plant essential oils and their β -triketone components as insecticides against *Drosophila suzukii*. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1050, 2017.

PARK, C.G.; JANG, M.; YOON, K.A.; KIM, J. Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 507-513, 2016.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as eco-friendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Science**, v. 21, p. 1000-1007, 2016.

PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H.; BENELLI, G. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: a review. **Research in Veterinary Science**, v. 109, p. 1-9, 2016.

PEIXOTO, M.G.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; BLANK, A.F.; DA SILVA LIMA, A.; MENEZES, T.S.A.; SANTOS, D.A.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BACCI, L.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 118-122, 2015.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET. p.15–56, 2008.

PFAFFLE, M.; PETNEY, T.; ELGAS, M.; SKUBALLA, J.; TARASCHEWSKI, H. Tick-induced blood loss leads to regenerative anaemia in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). **Parasitology**, v. 136, n. 4, p. 443-452, 2009.

PORTER, N. G.; WILKINS, A. L. Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 3, p. 407-415, 1998.

PRATES, H. T.; SANTOS, J. D. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. **Armazenagem de grãos. Campinas: Instituto Bio Geneziz**, p. 443-461, 2002.

PUBCHEM, 2020. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>

PUMNUAN, J.; CHANDRAPATYA, A.; INSUNG, A. Acaricidal activities of plant essential oils from three plants on the mushroom mite, *Luciaphorus perniciosus* Rack (Acari: Pygmephoridae). **Pakistan Journal Zoology**, v. 42, p. 247-252, 2010.

- RAVINDRAN, R.; JULIET, S.; KUMAR, K. A.; SUNIL, A. R.; NAIR, S. N.; AMITHAMOL, K. K.; GHOSH, S. Toxic effects of various solvents against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 3, p. 160-162, 2011.
- RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J.S.; MARTINS, J.R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014.
- REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.
- RESENDE, J.D.D.S.A.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C.M.; MATURANO, R.; DE AZEVEDO PRATA, M.C.; RODRIGUES, A.F.S.F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, v. 2, p. 139-142, 2012.
- RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 163p. 2002. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2002.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I., JONSSON, N. N. e BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 3-29, 2018.
- ROMDHANE, S.; DEVERS-LAMRANI, M.; BARTHELMEBS, L.; CALVAYRAC, C.; BERTRAND, C.; COOPER, J.F.; DAYAN, F.E.; MARTIN-LAURENT, F. Ecotoxicological impact of the bioherbicide leptospermone on the microbial community of two arable soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 775, 2016.
- ROMDHANE, S.; DEVERS-LAMRANI, M.; MARTIN-LAURENT, F.; JRAD, A.B.; RAVIGLIONE, D.; SALVIA, M.V.; BESSE-HOGGAN, P.; DAYAN, F.E.; BERTRAND, C.; BARTHELMEBS, L. Evidence for photolytic and microbial degradation processes in the dissipation of leptospermone, a natural β -triketone herbicide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 29848-29859, 2018.
- ROMDHANE, S.; DEVERS-LAMRANI, M.; BEGUET, J.; BERTRAND, C.; CALVAYRAC, C.; SALVIA, M. V.; JRAD, A.B.; DAYAN, F.E.; SPOR, A.; BARTHELMEBS, L.; MARTIN-LAURENT, F. Assessment of the ecotoxicological impact of natural and synthetic β -triketone herbicides on the diversity and activity of the soil bacterial community using omic approaches. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 241-249, 2019.
- ROSADO-AGUILAR, J.A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; ORTEGA-PACHECO, A., ALZINA-LÓPEZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILARCABALLERO, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66-76, 2017.

RUSSEL, J.B. **Química Geral**, 2º ed., Makron Books: São Paulo, 1994.

SANTOS, N.C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035-1041, 2003.

SCHNITZLER, P. Essential oils for the treatment of herpes simplex virus infections. **Chemotherapy**, v. 64. N. 1, p. 1-7, 2019.

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**, v.110, n. 2, p. 645-648, 2012.

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**, v. 112, n. 10, p. 3471-3476, 2013a.

SENRA, T.O.S.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F., MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (*E*)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 1461-1466, 2013b.

SHANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, X.; GUO, X.; DONG, S.; WANG, D.; ZHANG, J.; PAN, H.; ZHANG, Y.; MIAO, X. Acaricidal activity of oregano oil and its major component, carvacrol, thymol and p-cymene against *Psoroptes cuniculi* *in vitro* and *in vivo*. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 93-96, 2016.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 389-405, 1966.

SHI, C.; SONG, K.; ZHANG, X.; SUN, Y.; SUI, Y.; CHEN, Y.; JIA, Z.; SUN, H.; SUN, Z.; XIA, X. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. **PLoS One**, v.11, n.7, 2016.

SHREVE, R.N.; BRINK JR., J.A. **Indústrias de Processos Químicos**, 4a. ed., Guanabara: Rio de Janeiro, 1997.

SI, L.; CHEN, Y.; HAN, X.; ZHAN, Z.; TIAN, S.; CUI, Q.; WANG, Y. Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 7057-7066, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, p. 403-498, 2003.

SINGH, N.K.; MILLER, R.J.; KLAFKE, G.M.; GOOLSBY, J.A.; THOMAS, D.B.; PEREZ DE LEON, A.A. In-vitro efficacy of a botanical acaricide and its active ingredients against larvae of susceptible and acaricide-resistant strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, p. 201-206, 2018.

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**, v. 29, p. 93–101, 2009.

SONENSHINE, D.E. **The Biology of Ticks**. 1. Ed. Oxford University Press, New York, USA, 1991.

SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M. **Biology of Ticks**, New York, 2013.

SONG, S.Y.; HYUN, J.E.; KANG, J.H.; HWANG, C.Y. In vitro antibacterial activity of the manuka essential oil from *Leptospermum scoparium* combined with Tris- EDTA against Gram-negative bacterial isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, 2019.

SOUZA, J.R.L.; OLIVEIRA, P.R.; ANHOLETO, L.A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R.N.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66-72, 2019.

SPARKS, T.C.; HAHN, D.R.; GARIZI, N.V. Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. **Pest Management Science**, v. 73, n. 4, p. 700-715, 2017.

SPOONER-HART, R. **Investigations on essential oils of selected Australian flora, in particular those containing β -triketones, for activity against arthropods**. 2013. Thesis (Doctor of Philosophy). 329p. School of Science and Health University of Western Sydney, Australia, 2013.

STEPHENS, J.M.C.; MOLAN, P.C.; CLARKSON, B.D. A review of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v. 43, n. 2, p. 431-449, 2005.

SURBURG, H.; PANTEN, J. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses**. John Wiley & Sons, 2016.

SUTHERST, R.W.; WAGLAND, B.M.; ROBERTS, J.A. The effect of density on the survival of *Boophilus microplus* on previously unexposed cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 4, p. 321-324, 1978.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 1, p. 61-64, 2004.

TONG, F.; COASTS, J.R. Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and $^{36}\text{Cl}^-$ uptake in American cockroach ventral nerve cord.

Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 98, p. 317–324, 2010.

TONG, F.; GROSS, A.D.; DOLAN, M.C.; COATS, J. R. The phenolic monoterpenoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. **Pest Management Science**, v. 69, n. 7, p. 775-780, 2013.

Van DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

Van KLINK, J.W.; LARSEN, L.; PERRY, N.B.; WEAVERS, R.T.; COOK, G.M.; BREMER, P.J.; KIRIKAE, T. Triketones active against antibiotic-resistant bacteria: synthesis, structure–activity relationships, and mode of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 6651-6662, 2005.

Van VUUREN, S.F.; DOCRAT, Y.; KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. Essential oil composition and antimicrobial interactions of understudied tea tree species. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 7-14, 2014.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. (Eds.). **Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism**. Springer Science & Business Media, 2000.

WANG, H.; LIU, Y. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Litsea cubeba*. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 229-235, 2010.

WANG, L.; HU, W.; DENG, J.; LIU, X.; ZHOU, J.; LI, X. Antibacterial activity of *Litsea cubeba* essential oil and its mechanism against *Botrytis cinerea*. **RSC advances**, v. 9, n. 50, p. 28987-28995, 2019.

WATERMAN, P.G. The chemistry of volatile oils. In: Hay, R.K.M. & Waterman, P.G. (eds.). **Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production**. Avon: Iorigman Group, p. 47-61, 1993.

XIAO, C.X.; TAN, Y.T.; WANG, F.F.; WU, Q.H.; ZHANG, Z.X. The Fumigating Activity of *Litsea cubeba* oil and Citral on *Solenopsis invicta*. **Sociobiology**, v.67, n. 1, p. 41-47, 2020.

XIE, Y.; HUANG, Q.; RAO, Y.; HONG, L.; ZHANG, D. Efficacy of *Origanum vulgare* essential oil and carvacrol against the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 23, p. 23824-23831, 2019.

YANG, K.; WANG, C.F.; YOU, C.X.; GENG, Z.F.; SUN, R.Q.; GUO, S.S.; DU, S.S.; LIU, Z.L.; DENG, Z.W. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 459-466, 2014.

ZHANG, H.J.; ZHENG, L.H.; ZHAO, K.; CHEN, Y.; YI, Z. Insecticidal activities of constituents of *Litsea cubeba* fruit extracts effective against the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Insect Science**, v. 17, n. 5, p. 103, 2017.

ZHANG, W.; HU, J.F.; LV, W.W.; ZHAO, Q.C.; SHI, G.B. Antibacterial, antifungal and cytotoxic isoquinoline alkaloids from *Litsea cubeba*. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12950, 2012.