

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACEUTICAS**

Felipe Martins Ferreira

**ATIVIDADE ACARICIDA DO EUGENOL, DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
HIDROLATO DE *Syzygium aromaticum* (MYRTACEAE) FRENTE A
ESPÉCIE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

Juiz de Fora

2016

Felipe Martins Ferreira

**Atividade acaricida do eugenol, do óleo essencial e do hidrolato de
Syzygium aromaticum (Myrtaceae) frente a espécie *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Penha Henriques do Amaral

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Pinto Vilela

Juiz de Fora

2016

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

Ferreira, Felipe Martins.

Atividade acaricida do eugenol, do óleo essencial e do hidrolato de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) frente a espécie *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) / Felipe Martins Ferreira. -- 2016.

73 f. : il.

Orientadora: Maria da Penha Henriques do Amaral

Coorientadora: Fernanda Maria Pinto Vilela

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. *Syzygium aromaticum*. 2. Óleo essencial. 3. Eugenol. 4. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. 5. Carrapato bovino. I. Amaral, Maria da Penha Henriques do, orient. II. Vilela, Fernanda Maria Pinto, coorient. III. Título.

Felipe Martins Ferreira

**Atividade acaricida do eugenol, do óleo essencial e do hidrolato de
Syzygium aromaticum (Myrtaceae), frente a espécie *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Aprovado em 20/07/2016

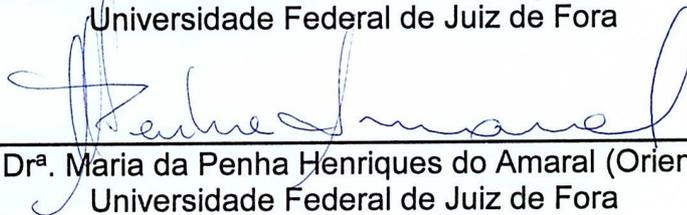
BANCA EXAMINADORA



Dr^a. Mariza Abreu Miranda (Titular externo)
Universidade de São Paulo



Prof^a. Dr^a. Erik Daemon de Souza Pinto (Titular Interno)
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof^a. Dr^a. Maria da Penha Henriques do Amaral (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Pinto Vilela (Coorientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico a minha mãe, pelo apoio, compreensão,
carinho e incentivo para vencer as dificuldades e
conquistar mais esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, pela oportunidade de continuar a trilhar os meus passos e pelo auxílio a fim de alcançar a força e coragem necessárias para superar os desafios.

À Coordenadora e a toda equipe do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de realização desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a Maria da Penha, por mais uma vez ter confiado em mim, e por sempre me orientar com carinho e paciência. Obrigado por ter me possibilitado mais essa conquista.

À Prof^a. Dr^a Fernanda Maria Pinto Vilela, pela dedicação, doação e paciência. Tudo que eu conquistar daqui para frente estará, de certa forma, relacionado a esse passo que só foi possível com a sua ajuda.

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

Ao Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro e à Prof^a. Dr^a. Josiane Mello da Silva pelas contribuições e direcionamentos que permitiram aprimorar o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Artrópodes Parasitos - UFJF, que foram essenciais para o desenvolvimento desse estudo e contribuíram para que esses dias fossem mais prazerosos. Em especial a Camila Delmonte, Natália Muniz, Paula Barroso, Tatiane Novato e Viviane Zeringóta pela parceria fundamental na execução dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, pela cessão dos carrapatos necessários para a realização deste estudo.

À Técnica Carolina Miranda Gasparetto e a CentralBio da Faculdade de Farmácia – UFJF, pela orientação na execução das análises cromatográficas.

Ao Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral e à doutoranda Lilian Henriques do Amaral, do laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela colaboração no desenvolvimento do método cromatográfico.

À todos os funcionários e professores da Faculdade de Farmácia que de alguma forma me permitiram vencer mais esta jornada.

Ao meu pai (*in memoriam*) por todos os ensinamentos, orientações e apoio, e por sempre ter-me incentivado na busca dos meus sonhos com sinceridade, perseverança, e acima de tudo humildade. À minha mãe Valéria pelo carinho, amor incondicional e apoio nos momentos mais difíceis, sempre mostrando alegria e garra frente às dificuldades.

À minha irmã Karine, exemplo de persistência e de dedicação, pela amizade durante toda a minha vida. À minha irmã Allana e a Cristina, que mesmo distante sempre torceram por mim.

À todos os meus amigos de caminhada, especialmente a Dalyara, e a todos que compreenderam minha ausência e nunca me abandonaram.

“Progress doesn't come overnight, long before you achieve your dream, you will have to make the decision to start the journey. You take a step and another, each day your journey will bring you closer to your dream. It will be difficult, but carry on and one day you will be there. Boundaries were made to be broken.”

(The Martian)

RESUMO

Os carrapatos são importantes vetores de doenças em animais e humanos. O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) é responsável por sérios prejuízos à pecuária brasileira considerando-se os custos do controle, perda de receita devido a menor produção de leite e carne, danos ao couro, além da transmissão de doenças. O uso de plantas medicinais e de seus derivados com ação carrapaticida é considerado um excelente recurso frente a formação de resistência aos produtos químicos. Diante da necessidade de alternativas mais eficazes e com menores impactos ambientais o objetivo desse estudo foi avaliar a ação carrapaticida *in vitro* do eugenol, do óleo essencial e do hidrolato de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia). Adicionalmente, também foi investigada a atividade carrapaticida do óleo essencial e do eugenol quando incorporados em uma formulação. O óleo essencial e o hidrolato de cravo-da-índia foram obtidos pelo processo de hidrodestilação dos botões florais secos da planta. A caracterização química do óleo essencial de cravo-da-índia por CG/EM revelou a presença dos componentes majoritários eugenol (83,97%), cariofileno (3,04%), humuleno (0,42%) e acetato de eugenol (12,58%). Os carrapatos provenientes de diversas regiões geográficas foram tratados com os compostos em estudo em diferentes etapas de seu ciclo. No teste de pacote de larvas foi avaliada a mortalidade com concentrações de eugenol, óleo essencial e hidrolato que variaram de 0,1 à 2,0%. O índice de produção de ovos, a eclosão larval e a eficácia carrapaticida foram avaliados através do teste de imersão de fêmeas ingurgitadas, em que foram utilizadas concentrações de eugenol e óleo essencial de 1,25 a 10%. O eugenol e o óleo essencial promoveram 100% de mortalidade em larvas a partir das concentrações de 0,25 e 0,5%, respectivamente. O hidrolato não apresentou atividade carrapaticida nas concentrações testadas. No teste de imersão de fêmeas o eugenol e o óleo essencial apresentaram resultado de eficácia superior a 95% a partir da concentração de 5,0%, inibindo completamente a eclosão larval na concentração de 10%. O uso do eugenol, substância purificada (99-100%) não proporcionou superioridade significativa nas eficácias de tratamento em relação ao óleo essencial de cravo, o que reforça o potencial do uso do óleo essencial de cravo como carrapaticida, uma vez que o mesmo é uma alternativa de fácil acesso, baixo custo e com alto rendimento no processo extrativo. A formulação desenvolvida não promoveu melhores eficácias de tratamento quando comparada a solução etanólica, o que sugere que novas pesquisas deverão ser realizadas sob a perspectiva de testar o óleo essencial de cravo em outras formulações que possam melhorar sua atividade. Além disso, testes *in vivo* são recomendados para validação da eficiência do ativo em condições de campo.

Palavras-chave: Carrapato bovino. *Syzygium aromaticum*. Óleo essencial. Eugenol. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

ABSTRACT

Ticks are important vectors of diseases in animals and humans. The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) has caused serious harm to livestock raising in Brazil, considering the costs of controlling it, revenue loss as a result of a smaller production of milk and meat, and leather damage, in addition to transmitting diseases. The use of medicinal plants and their derivatives with acaricide action is considered an alternative against the formation of chemicals resistance. Due to the need for more efficient alternatives with less environmental impact, this study aims to evaluate the acaricide action in vitro of eugenol, essential oil and hydrolate of *Syzygium aromaticum* (clove). Additionally, it has also investigated the acaricide activity of the essential oil and eugenol when incorporated into a formulation. The extraction of the essential oil and hydrolate was performed by steam distillation of dried flower buds of the plant. The chemical characterization of clove essential oil by GC/MS revealed the presence of the major components eugenol (83.97%), caryophyllene (3.04%), humulene (0.42%), and eugenol acetate (12.58%). The ticks from different geographical areas were treated with the test compounds in different stages of the tick cycle. In the larval packet test, mortality was assessed at concentrations of eugenol, essential oil and hydrolate ranging from 0.1 to 2.0%. The eggs production levels, the larvae hatching, and their efficiency on ticks were assessed using the adult immersion test, in which eugenol and essential oil were used at concentrations of 1.25 to 10%. The eugenol and the essential oil caused 100% mortality of larvae, starting at 0.25 and 0.5%, respectively. The test with hydrolate showed no activity at the concentrations tested. In the adult immersion test, the eugenol and the essential oil showed results greater than 95% efficacy at concentrations of 5.0%, completely inhibiting the larvae hatching at 10%. The use of eugenol, purified substance (99-100%), gave no significant superiority in efficacy of treatment with the clove essential oil, which strengthens the potential use of clove essential as an acaricide, being it a low cost and accessible alternative, with high yield in the extraction process. The formulation developed did not promote better efficacies of treatment when compared to ethanol solutions, which suggests that further research should be conducted from the perspective of testing the essential oil of cloves in other formulations that can improve their activity. Furthermore, in vivo tests are recommended for an active efficiency in field conditions validation.

Keywords: Cattle tick. *Syzygium aromaticum*. Essential oil. Eugenol. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do carrapato dos bovinos.....	19
Figura 2	Biossíntese dos fenilpropanóides.....	30
Figura 3	Árvore (A), folhas (B), frutos (C) e botões florais secos (D) do cravo-da-índia.....	31
Figura 4	Estruturas do eugenol (A), do acetato de eugenol (B), do β -cariofileno (C), e do humuleno (D).....	32
Figura 5	Formulações desenvolvidas.....	40
Figura 6	Teste de pacote de larvas.....	43
Figura 7	Teste de imersão de fêmeas ingurgitadas.....	45
Figura 8	Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de cravo-da-índia, com destaque para os componentes majoritários.....	49

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E APÊNDICES

Tabela 1	Formulação base desenvolvida para incorporação dos componentes de estudo.....	40
Tabela 2	Peso médio (g) de planta utilizada por extração e rendimento do óleo essencial e do hidrolato de cravo-da-índia (mL) e (%).....	48
Tabela 3	Componentes do óleo essencial de cravo-da-índia (botões florais secos) e seus tempos de retenção, através da técnica de cromatografia gasosa.....	50
Tabela 4	Mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações do eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia diluídos em soluções hidroetanólicas (Etanol à 50%) sob condições de laboratório (27 ±1 °C e UR>80 ± 10%).....	52
Gráfico 1	Estudo comparativo da mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia em soluções hidroetanólicas.....	54
Tabela 5	Mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial incorporados em formulação e diluídos em soluções hidroetanólicas (etanol 50% v/v), sob condições de laboratório (27 ±1 °C e UR>80 ± 10%).....	55
Tabela 6	IPO, EL e %C de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia em soluções hidroetanólicas (etanol à 50%) sob condições de laboratório (27 ±1 °C e UR>80 ± 10%).....	56
Tabela 7	IPO, EL e %C de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia incorporados em formulação sob condições de laboratório (27 ±1 °C e UR>80 ± 10%).....	57
Apêndice A	Espectros de massa obtidos dos componentes majoritários presente no óleo essencial de cravo-da-índia.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%C	Eficiência do tratamento
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG/FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
EL	Eclosão Larval
FAO	Organização das nações unidas para agricultura e alimentação
GABA	Ácido gamaminobutírico
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPO	Índice de Produção de Ovos
MAO	Monoaminoxidase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PT	Pós-tratamento
TIA	Teste de imersão de adultos
TIL	Teste de imersão em larvas
TPL	Teste de pacote de larvas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	CARRAPATO <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	18
2.1.1	Ciclo de vida do carrapato	18
2.1.2	Controle do carrapato	20
2.1.3	Resistência aos carrapaticidas.....	21
2.2	PRINCIPAIS CLASSES DE CARRAPATICIDAS QUÍMICOS, MECANISMO DE RESISTÊNCIA E TOXICIDADE	23
2.2.1	Organofosforados	23
2.2.2	Piretróides	24
2.2.3	Formamidinas	25
2.2.4	Lactonas macrocíclicas	25
2.2.5	Fenilpirazóis	26
2.3	UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA AOS PRODUTOS CARRAPATICIDAS.....	27
2.4	ÓLEOS ESSENCIAIS	28
2.4.1	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry – CRAVO-DA-ÍNDIA.....	30
2.5	EUGENOL.....	32
2.6	MECANISMO DE AÇÃO DO EUGENOL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA.....	34
2.7	TOXICIDADE DO EUGENOL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO	38
4.1	LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DOS TRABALHOS	38
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
4.3	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	38
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	39

4.5	DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO	40
4.6	AVALIAÇÃO CARRAPATICIDA <i>IN VITRO</i>	42
4.6.1	Teste de pacote de larvas.....	42
4.6.2	Teste com fêmeas ingurgitadas	44
4.6.3	Análise estatística	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA	48
5.2	IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL	49
5.3	DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO	51
5.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE CARRAPATICIDA.....	52
5.4.1	Teste de pacote de larvas.....	52
5.4.2	Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas.....	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos capazes de transmitir uma grande variedade de patógenos aos vertebrados, incluindo vírus, bactérias, protozoários e helmintos. São os principais transmissores de patógenos em animais domésticos e selvagens, perdendo apenas para os mosquitos como vetores de doenças humanas (DE LA FUENTE *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2015).

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), é o ectoparasito mais importante em áreas de exploração pecuária, tanto em regiões tropicais quanto subtropicais, sendo responsável por severas perdas econômicas, representadas tanto pela ação direta do carrapato no bovino, como pelo custo dos sistemas de controle. (AMERICA, 1972; BROGLIO-MICHELETTI *et al.*, 2009; MICHELETTI *et al.*, 2010). Estudos sugerem que as perdas, apenas no Brasil, representem um total de 3,24 bilhões de dólares por ano (GRISI *et al.*, 2014).

Além de causar espoliação sanguínea por hematofagismo no animal, este parasito provoca lesões no couro sendo, também, o principal transmissor dos protozoários *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e da rickettsia *Anaplasma marginale*, causadores respectivamente da babesiose bovina e anaplasmose, conhecidas popularmente como “tristeza parasitária bovina” (CHAGAS *et al.* 2002; TRINDADE *et al.*, 2011).

Os carrapaticidas sintéticos ainda são os principais meios de controle deste parasito, entretanto sua utilização tem se tornando menos viável em termos práticos e econômicos devido a poluição ambiental, a contaminação da carne e leite dos animais, ao alto custo e ao fenômeno da resistência (PIVOTO *et al.*, 2010; PIMENTEL, 2005.; SANTOS *et al.*, 2012).

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

O uso de produtos naturais pode ser benéfico não só por reduzir os problemas enfrentados pelos acaricidas comerciais, tais como o desenvolvimento de resistência e a contaminação ambiental, mas também por prolongar a vida útil dos produtos químicos comerciais aplicados para controle de parasitos através da associação de substâncias vegetais bioativas com os produtos sintéticos (CHAGAS, 2004).

Segundo Singh *et al.* (2015) a atividade dos produtos naturais pode ser devido aos efeitos de um único composto ou a combinação de um ou mais compostos ativos presentes na planta. Como o efeito acaricida dos constituintes químicos de plantas é normalmente exercido por meios diferentes, incluindo sinergismo, o desenvolvimento de resistência contra acaricidas botânicos se torna mais difícil.

O cravo-da-índia - *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry representa uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos, como o eugenol, o acetato de eugenol e o ácido gálico. Possui propriedades acaricida, antioxidante, antiagregante plaquetária, antimicrobiana e antifúngica, o que demonstra grande potencial para produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentícios e aplicações agrícolas (AFFONSO *et al.*, 2012; CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014; DE MELLO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Diferentes tipos de extratos podem ser obtidos de folhas e outras partes da planta. De acordo com a técnica de extração, cada extrato contém uma complexa mistura de diferentes metabólitos secundários (ONG, 2004). Óleos essenciais são frações voláteis obtidas principalmente por hidrodestilação ou destilação a vapor de plantas medicinais aromáticas. Os maiores constituintes dos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos (MOHAMED; EL-EMARY; ALI, 2010). As soluções aquosas obtidas como sub-produtos da destilação, usando um aparato do tipo Clevenger, são conhecidas como hidrolato. Como são obtidos em quantidades superiores aos óleos e contém em sua maioria componentes hidrofílicos bioativos, os hidrolatos representam uma viável alternativa para investigação científica e uso em futuras aplicações farmacêuticas (DE LIMA *et al.*, 2006; DAMIANI *et al.*, 2014).

Estudos fitoquímicos do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* revelam a presença do eugenol como componente majoritário, acompanhado por acetato de eugenila, isoeugenol e β -carofileno. Muitos efeitos biológicos do eugenol em

invertebrados tem sido investigados, sendo já relatadas suas atividades como inseticida, acaricida e de repelência contra insetos (WALIWITIYA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2003; ISMAN, 2000).

Embora já existam estudos relatando a ação carrapaticida do eugenol e do óleo essencial de *S. aromaticum* frente a espécie *R. microplus*, não foram encontrados em pesquisas bibliográficas e em bases de dados estudos comparando a atividade desses compostos utilizando a mesma metodologia, população e fase biológica deste parasito. Além disso, não há relatos da ação do eugenol quando incorporado em uma forma farmacêutica que garanta sua estabilidade e facilite a aplicação e permanência do produto por um tempo maior no animal. Outras inovações deste trabalho foram a avaliação da atividade do óleo essencial de cravo-da-índia na fase larval deste parasito e a investigação da atividade carrapaticida do hidrolato de cravo-da-índia.

Diante do exposto o presente estudo teve como proposta investigar as propriedades carrapaticidas *in vitro* do hidrolato, do óleo essencial e do principal constituinte de *Syzygium aromaticum*, o eugenol, em larvas e fêmeas de *R. microplus*. Adicionalmente, foi realizada a avaliação da atividade carrapaticida do óleo essencial e do eugenol incorporados em uma formulação farmacêutica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), é conhecido popularmente como carrapato bovino ou carrapato do boi, porém pode esporadicamente parasitar outros animais, como equinos e ovinos (CHAGAS *et al.*, 2003). É um parasito extremamente bem adaptado às condições de clima de grande parte do país, o que aliado à presença de seus hospedeiros distribuídos por mais de 80% do território nacional, se torna um problema de grandes proporções para a bovinocultura brasileira (POTARROYO; SOSSAI, 2004).

Segundo Brito *et al.* (2010), cada fêmea ingere durante sua fase parasitária 0,5mL a 1,0mL de sangue e determina uma perda média, no bovino, estimada em 1,0g de peso vivo/carrapato e 8,9mL de leite, resultando em anemia e perdas na produção de leite e carne. Nos pontos de fixação, as lesões e as reações inflamatórias causam danos ao couro do animal facilitando a penetração de larvas e moscas causadoras das bicheiras e do berne (FURLONG *et al.*, 2005).

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

2.1.1 Ciclo de vida do carrapato

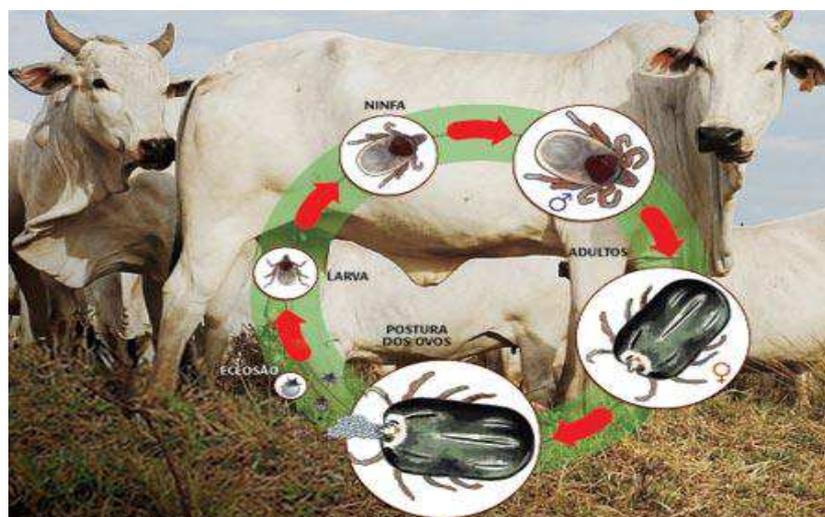
O ciclo de vida do carrapato dos bovinos é monoxeno, ou seja, necessita de um hospedeiro em seu ciclo de vida (Figura 1). É dividido em duas fases distintas: uma nos bovinos, denominada de fase de vida parasitária, e a outra, no solo, denominada fase de vida livre (ROCHA, 2011; SONENSHINE, 1991).

Na fase de vida parasitária, a larva, fixada no bovino, se desenvolve respectivamente em metalarva, ninfa e metaninfa, que podem sair como machos

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

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

Figura 1 – Ciclo de vida do carrapato dos bovinos



Fonte: Barreto, 2008.

Com o conhecimento do ciclo de vida dos carrapatos, nos diversos meses do ano, é possível melhorar a eficiência no seu controle, utilizando-se o chamado sistema estratégico de controle, que consiste na intensificação do tratamento carrapaticida na época em que o carrapato está mais susceptível. Este controle, integrado com outras

práticas de manejo relacionadas aos animais e à pastagem possibilitam a diminuição da população de carrapatos (MICHELETTI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2009).

2.1.2 Controle do carrapato

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e conseqüentemente da economia nacional, sendo a pecuária leiteira uma das atividades mais tradicionais do meio rural brasileiro, além da pecuária de corte que é considerada um dos pilares do agronegócio no Brasil (BRASIL, 2014). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, que totalizou em 2014, 212.34 milhões de cabeças (BRASIL, 2014).

A rentabilidade da atividade pecuária pode ser diminuída significativamente pelos efeitos dos parasitos que afetam o gado. Em 2014 as perdas econômicas no país, relacionadas ao carrapato dos bovinos, foram estimadas em 3,24 bilhões de dólares, perdas estas representadas tanto pela ação direta do parasito no bovino, bem como pelo custo dos sistemas de controle (RAYNAL; JOSÉ TADEU; SILVA, 2013; DE MELLO *et al.*, 2014; GRISI *et al.*, 2014).

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

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

de controle da malária em áreas endêmicas continuaram utilizando este produto e houve proibição de uso em diversos países (LARINI, 1999).

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

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

Embora sejam considerados uma possível estratégia frente aos parasitos, o uso de vacinas e controles biológicos ainda estão em fase experimental e somente no futuro serão capazes de competir, em nível de mercado, com métodos convencionais. Isso mostra que mesmo com o eventual surgimento de estirpes resistentes, o desenvolvimento de novos produtos químicos, constitui o instrumento mais eficaz para o controle do carrapato atualmente (SAKAMOTO *et al.*, 2013).

2.1.3 Resistência aos carrapaticidas

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

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

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

O problema da resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas vem aumentando consideravelmente em todas as regiões onde ele está presente e que utilizam produtos químicos como principal recurso para o seu controle. Este fato pode ser observado *in vivo*, verificando-se o efeito dos compostos acaricidas sobre os carrapatos no hospedeiro, ou em laboratório, por meio da imersão *in vitro* de fêmeas ingurgitadas e larvas não alimentadas (SOUZA *et al.*, 2008).

Sabatini *et al.* (2001) citaram o teste de imersão de larvas (TIL) (Larval Immersion Test - LIT) (SHAW, 1966) e o teste do pacote de larvas (TPL) (Larval Packet Test - LPT) (STONE; HAYDOCK, 1962) como métodos utilizados para detecção da resistência. A análise das respostas relacionadas a um questionário aplicado pelo Grupo de Trabalho da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) sobre a resistência em parasitas (Working Group on Parasite Resistance/WGPR) demonstra que o método mais amplamente utilizado nos laboratórios envolvidos com o diagnóstico de resistência a pesticidas, em populações de carrapatos, é o Teste de Imersão de Adultos – TIA (Adult Immersion Test - AIT) (FAO, 2004).

Diversos são os protocolos disponíveis para a identificação de cepas resistentes de carrapatos. No entanto, para facilitar o monitoramento global da resistência e fornecer uma base histórica para a comparação dos resultados dos testes, devem ser adotados métodos diagnósticos padronizados. Em vista disso e seguindo o conselho de especialistas, desde 1975, a FAO tem recomendado a realização do Teste do Pacote de Larvas – TPL para investigação da resistência em cepas de campo do carrapato dos

bovinos, especialmente para acaricidas organofosforados e piretróides sintéticos (KEMP *et al.*, 1999).

2.2 PRINCIPAIS CLASSES DE CARRAPATICIDAS QUÍMICOS, MECANISMO DE RESISTÊNCIA E TOXICIDADE.

2.2.1 Organofosforados

Os organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico (SARTOR; BICUDO, 1999) e compreendem um grupo grande e diverso de substâncias químicas com propriedades inseticidas, acaricidas e helminticidas. Alguns compostos organofosforados também possuem propriedades herbicidas ou fungicidas (BLAGBURN; LINDSAY, 2003).

Estes compostos atuam principalmente ligando-se e inibindo a acetilcolinesterase (AChE), enzima amplamente distribuída nos nervos, músculos e no fluido e elementos do sangue. Sua função é regular a neurotransmissão nas sinapses destruindo o neurotransmissor acetilcolina (ACh). A AChE termina a atividade da ACh hidrolisando-a na fenda sináptica. A inibição ocorre porque o composto organofosforado mimetiza a estrutura da ACh. A ligação da AChE e organofosforados resulta na transfosforilação da enzima (BLAGBURN; LINDSAY, 2003). Este processo resulta no acúmulo de ACh nos locais onde este neurotransmissor é liberado, promovendo hiperexcitabilidade e hiperatividade no parasita, seguindo-se de incoordenação muscular e morte (SARTOR; BICUDO, 1999).

No Brasil a resistência a organofosforados foi notada inicialmente em 1963, no Rio Grande do Sul (RS), sendo este o primeiro caso de resistência a esses compostos relatado na América do Sul (WHARTON; ROULSTON, 1977).

Os mecanismos da resistência aos organofosforados ainda precisam ser melhores elucidados, mas sabe-se que existe relação com insensibilidade à acetilcolinesterase (FOIL *et al.*, 2004), através do aumento do metabolismo das esterases localizadas no intertegumento de teleóginas resistentes e com a superexpressão dessas enzimas em larvas (VILLARINO *et al.*, 2001).

Os organofosforados surgiram por volta de 1950, e tinham como proposta substituir os organoclorados que possuíam um efeito residual longo, e com isso uma grande contaminação ambiental consequente (WALL & SHEARER, 2001). Essa classe não gera uma contaminação ambiental tão grande quanto os organoclorados, porém apresenta risco de intoxicações severas dos animais. Apesar disso, ainda é uma classe amplamente utilizada no mercado veterinário brasileiro (MAGALHÃES *et al.*, 1985).

2.2.2 Piretróides

Os piretróides exercem seus efeitos primariamente modulando a cinética de abertura dos canais de sódio nos nervos. Esta ação resulta em descargas repetitivas ou na despolarização da membrana e subsequente morte do artrópode-alvo. Pesquisas recentes também indicam que os inseticidas piretróides suprimem os complexos ácido γ -aminobutírico (GABA), receptores de glutamato e canais de Ca^{2+} ativados por voltagem (BLAGBURN; LINDSAY, 2003).

Foram identificados dois padrões de resistência para este grupo: o primeiro por insensibilidade do sítio de ação da droga, através de uma alteração do sítio de ação das esterases, tornando-os insensíveis por mutações do gene relacionados aos canais de sódio. A proteína codificada por esse gene altera sua estrutura, o que o torna resistente ao piretróide (HE *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). O segundo mecanismo, menos entendido, envolve a resistência metabólica, através da desativação da droga mediada pela ação de esterases e de citocromo P450 (MILLER *et al.*, 1999).

De um modo geral os piretróides são caracterizados por possuírem baixa toxicidade. Contudo Chauhan *et al.* (2007) concluíram em seu trabalho com linfócitos humanos e células de medula óssea de camundongos que a exposição *in vitro* e *in vivo* a uma formulação comercial de deltametrina, o mais importante piretróide inseticida usado no Brasil (LORINI; FILHO, 2007), pode causar efeitos genotóxicos em mamíferos. A deltametrina também induziu aberrações cromossômicas e micronúcleos em células de medula óssea de ratos (GARRIDO FRENICH, A. *et al.*, 2005).

2.2.3 Formamidinas

O amitraz é a única formamidina ectoparasiticida atualmente utilizada na medicina veterinária (BLAGBURN; LINDSAY, 2003). O mecanismo de ação deste fármaco ainda não foi totalmente esclarecido, mas foi observado que este fármaco penetra rapidamente em larvas de carrapato, inibindo a monoaminoxidase (MAO). Esta enzima mitocondrial possui ação catalisadora no processo de desaminação de catecolaminas, resultando em aumento dos níveis de noradrenalina e serotonina no sistema nervoso central do parasito. Há evidências da atuação deste produto nos canais de sódio da membrana nervosa do carrapato, inibindo a síntese de prostaglandinas, além de ser um agonista em receptores β -adrenérgicos (SARTOR; BICUDO, 2006).

Nas teleógenas as formamidinas inibem o processo de liberação de ovos, impedindo a contração da musculatura responsável pela oviposição (SARTOR; BICUDO, 2006). Assim como seu mecanismo de ação, o mecanismo de resistência ao amitraz ainda não está completamente elucidado. Sabe-se apenas que algumas populações de *R. microplus* resistentes apresentam aumento de atividade enzimática de esterases e glutathione-S-transferases (LI *et al.*, 2004). Ainda segundo esses autores, sugere-se que o provável mecanismo de resistência ao amitraz seja a insensibilidade do sítio de ligação, presumivelmente o receptor de octopamina.

Essa classe de ectoparasiticidas possui baixa toxicidade para mamíferos, porém tem comprovado potencial carcinogênico, o que reduziu sua utilização (TAYLOR *et al.*, 2007).

2.2.4 Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas são um grupo de drogas com ação endo e ectoparasiticida, especificamente para nematóides e artrópodes. São produtos de fermentação ou derivados de fungos habitantes do solo, do gênero *Streptomyces*. Além de possuírem atividade de amplo espectro, são eficazes em concentrações muito baixas (BLAGBURN; LINDSAY, 2003).

O mecanismo de ação das lactonas macrocíclicas é potencializar a ação inibidora neuronal mediada pelo GABA, promovendo hiperpolarização neuronal do parasito e, portanto, inibindo a transmissão nervosa. Em insetos demonstrou-se também a ação desses compostos em canais de cloro GABA independentes onde há aumento na condutância da membrana do músculo, pelo bloqueio para a resposta do ácido ibotênico, que é um ativador específico do portão-glutamato, comumente encontrado no inseto. Como consequência, há um aumento da permeabilidade da membrana aos íons cloro, resultando em redução da resistência da membrana celular. Desta forma, essas moléculas provocam ataxia e paralisia nos insetos e nematódeos (SARTOR; BICUDO, 2006).

Marques et. al. (1995), trabalhando na avaliação do efeito da ivermectina a 1%, solução injetável, no tratamento de bovinos naturalmente infestados pelo *R. microplus*, observaram que no dia 8 PT (pós-tratamento) a eficiência foi de 100%, até o dia 29 PT a eficácia foi aproximadamente 99%, e no dia 36 PT foi de 80,1%.

A maior parte da eliminação da ivermectina ocorre na forma inalterada nas fezes (TAYLOR *et al.*, 2007). Estes resíduos no ambiente podem alterar o micro habitat de uma diversificada fauna de artrópodes, afetando também peixes e outros organismos aquáticos (MARCHIORI *et al.*, 2000). Os animais atingidos por esta lactona macrocíclica fazem parte de uma cadeia ecológica e isto pode causar danos aos ecossistemas de uma forma geral (WALL & SHEARER, 2001).

2.2.5 Fenilpirazóis

O principal representante dessa classe de acaricidas é o Fipronil (COLLINS; CALLCOTT, 1998). O mecanismo de ação deste fármaco ocorre de duas maneiras: pela inibição dos canais de cloro ativados por GABA (ácido gama-aminobutírico) (COLE *et al.*, 1993), ligando-se aos canais de cloro e, conseqüentemente, inibindo o fluxo de íons para dentro da célula nervosa o que resulta em hiperexcitação do sistema nervoso (RAUH *et al.*, 1990); outra forma de ação ocorre sobre os canais ativados por glutamato, que existem especificamente em invertebrados, mas não em mamíferos (ZHAO *et al.*, 2004).

Guerreiro et. al. (2012), relatam que a atividade em dois sítios de ação desempenha um papel fundamental em retardar ou prevenir a formação de altos níveis de resistência a esta droga. São escassos os relatos da resistência ao fipronil em amostras de campo, ocorrendo descrição de casos apenas no Uruguai e Brasil. Estudos sobre os mecanismos de resistência ainda não foram relatados.

Um dos grandes problemas observados é a ocorrência de risco de exposição ocupacional para seres humanos quando o fipronil é utilizado, por exemplo, pelo operador de pulverização. O fipronil é pouco penetrante em pele humana e quando ocorre é improvável ser maior que 1% - 3% da dose aplicada. Apesar disto, neste tipo de ocupação, podem ser observados sintomas como reações ocular, respiratória, gastrointestinal e outras reações sistêmicas, de forma reversível. (TINGLE *et al.*, 2003).

2.3 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA AOS PRODUTOS CARRAPATICIDAS

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de medicamentos, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998).

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

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

A utilização de produtos naturais minimiza o desequilíbrio ecológico e a contaminação ambiental causada pelo uso intensivo de produtos químicos sintéticos. No entanto, pesquisas na área veterinária utilizando plantas medicinais, apesar de crescente, ainda são incipientes (AGNOLIN *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2012).

Segundo Singh *et al.* (2015) a atividade dos produtos naturais pode ser devida aos efeitos de um único composto ou através de um grupo de substâncias que podem agir sinergicamente dificultando a seleção de carrapatos resistentes.

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

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

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

A evolução da interface química das plantas devido a interação com organismos circundantes tornou-as fontes de inseticidas naturais e compostos antimicrobianos químicos que são produzidos com o objetivo de se defender contra esses agentes. Estes compostos são tipicamente lipofílicos, com potencial tóxico em processos bioquímicos básicos e com consequências fisiológicas e comportamentais para os organismos (PRATES; SANTOS, 2002).

Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, éster, éteres, cetonas,

fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanóides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (BAJPAI *et al.*, 2008).

A composição dos óleos essenciais não está condicionada somente à espécie da planta. A origem da planta, a parte utilizada, o estágio de desenvolvimento, a interação com insetos e predadores, as condições climáticas e de crescimento, como temperatura, solo e fertilizantes e as condições de destilação e estocagem são capazes de exercer influência sobre o conteúdo de metabólitos voláteis. Além disso, o método de extração usado para obter o óleo essencial pode afetar a sua composição química (BESTEN *et al.*, 2012; OLADIMEJI *et al.*, 2001; OZCAN; ERKMEN, 2001).

Os óleos essenciais são considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra microrganismos (OLIVEIRA, *et al.*, 2011). A aplicação de óleos essenciais como ingredientes funcionais em formulações alimentícias, cosméticas ou ainda em formulações sanitizantes, tem despertado grande interesse no setor industrial devido à tendência dos consumidores em utilizarem, preferencialmente, produtos farmacêuticos ou alimentícios de origem natural (MARTINAZZO *et al.*, 2007; SCHERER, 2009).

Os óleos essenciais possuem várias funções nas plantas, entre elas a de defendê-las contra o ataque de insetos, ácaros e patógenos, ao exercer efeito tóxico nesses organismos (CASTAGNINO, 2012). Para uso humano os estudos têm apontado algumas propriedades farmacológicas dos óleos, entre as quais se destacam atividades antivirais, antiespasmódica, analgésica, antioxidante, antimicrobiana, acaricida, antifúngica, cicatrizante, expectorante, antiinflamatória, vermífuga e relaxante. (LIMA *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2007; PACKER; LUZ, 2006; TEPE *et al.*, 2004).

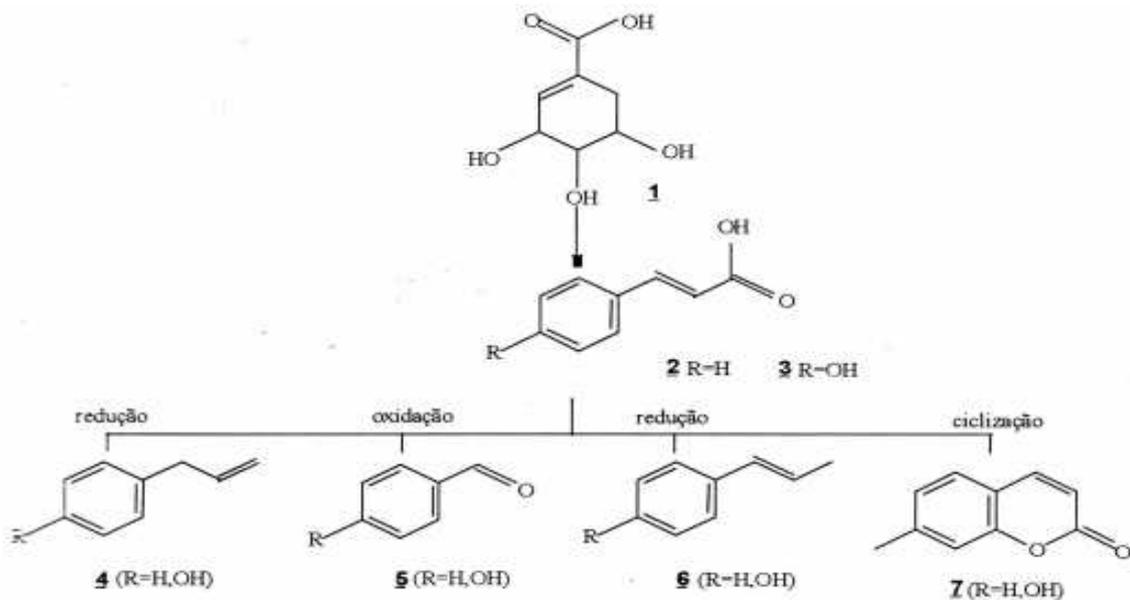
A estrutura química dos óleos essenciais é composta por elementos básicos como o carbono, oxigênio e hidrogênio, uma vez que são formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e outras (CASTRO *et al.*, 2004). A grande maioria, no entanto, é constituída de derivados arilpropanóides ou de terpenos, preponderando os últimos (STRAPAZZON, 2004).

Apesar de aproximadamente 90% da composição dos óleos essenciais serem compostos de terpenos, no óleo essencial do cravo-da-índia, o eugenol (Figura 4), um

fenilpropanoide, é o composto mais abundante, com teores maiores que 70% (ANDRADE, 2010).

Os fenilpropanoides se formam a partir do ácido chiquímico (1), que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmicos (2) e p-cumárico (3), onde esses últimos, por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos (4) e/ou alilbenzenos (6) e, por meio de oxidação com degradação das cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos (5); ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem cumarinas (7) (Figura 2) (SIMÕES *et al.*, 2004).

Figura 2: Biossíntese dos fenilpropanoides.

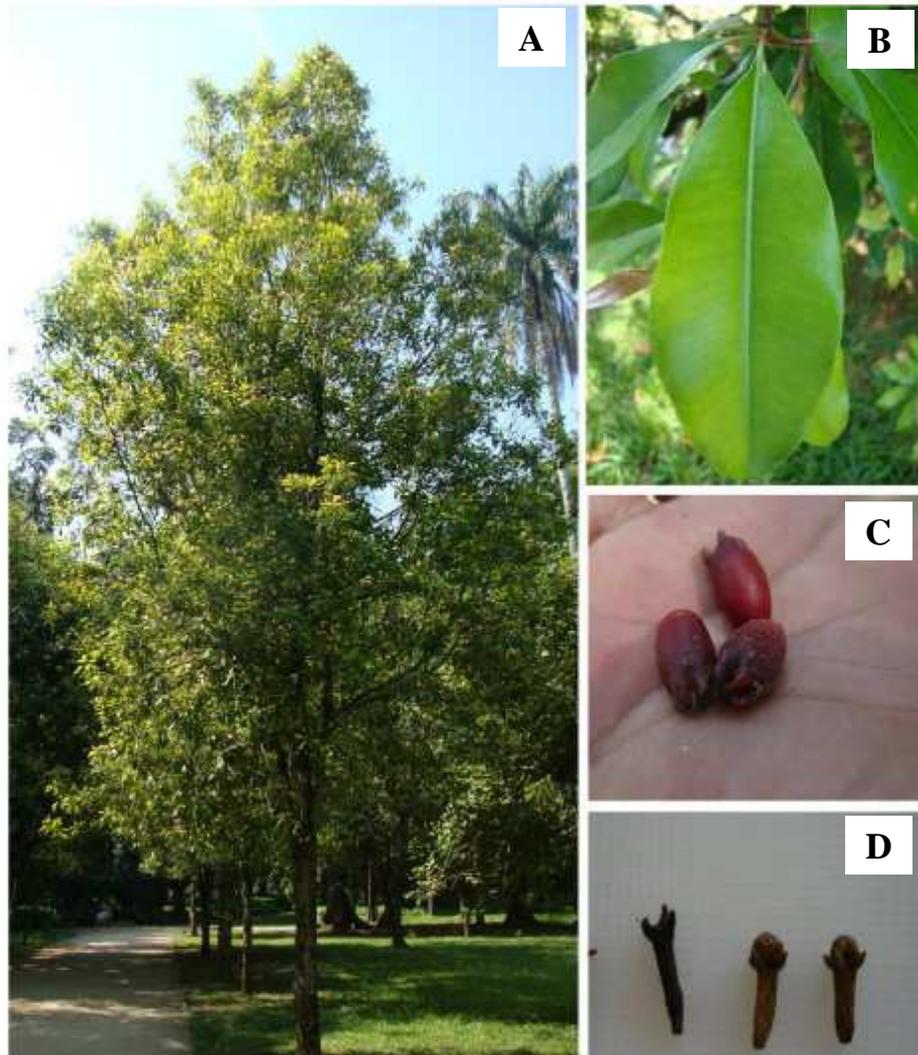


Fonte: SIMÕES *et al.*, 2004.

2.4.1 *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry – CRAVO-DA-ÍNDIA

A planta *Syzygium aromaticum* (Figura 3) pertence à família Myrtaceae. É uma árvore de grande porte, podendo atingir de 12 a 15 m de altura e o seu ciclo vegetativo alcança mais de cem anos. Originária da Indonésia, o cravo-da-índia é a gema floral seca da planta e foi disseminada pelos alemães para outros países. Zanzibar e Madagascar são os principais produtores de cravo-da-índia, seguidos pela Indonésia. No Brasil, praticamente apenas a Bahia, produz esta especiaria na forma comercial (AFFONSO *et al.*, 2012; MAZZAFERA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Figura 3: Árvore (A), folhas (B), frutos (C) e botões florais secos (D) do cravo-da-índia.

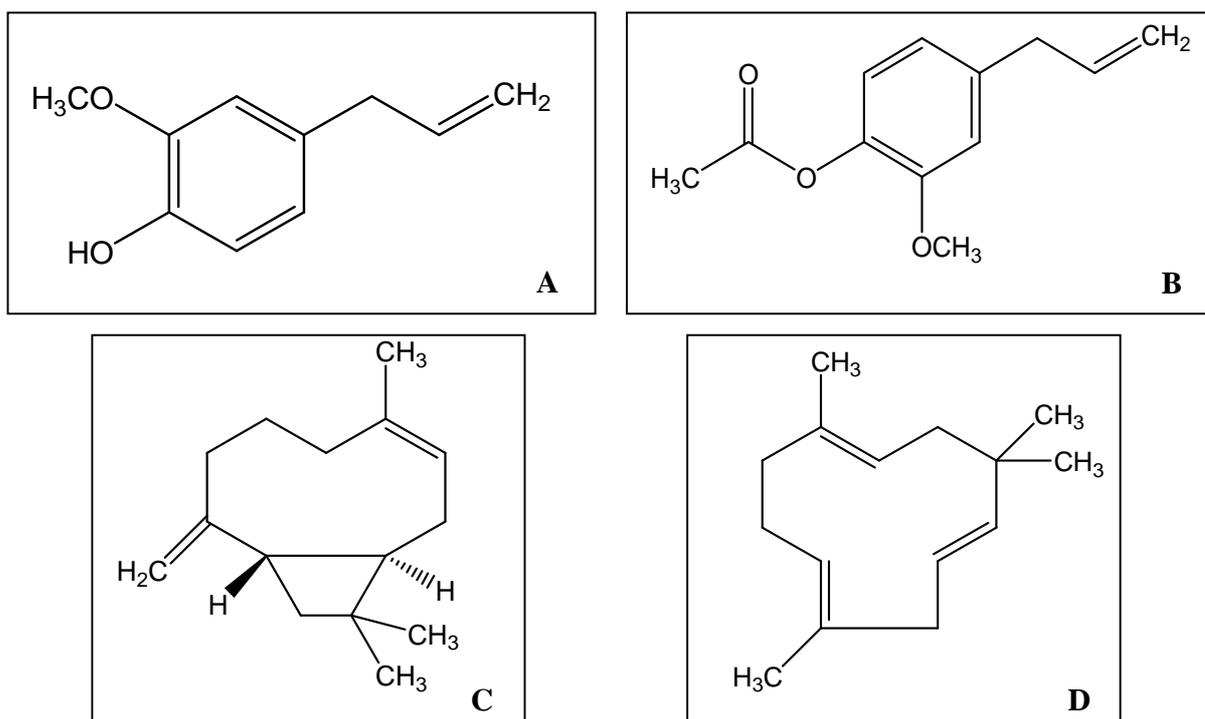


Fonte: (AFFONSO *et al.*, 2012)

Embora o cravo-da-índia seja referenciado na maioria das vezes como *Syzygium aromaticum* outros sinônimos botânicos são encontrados como *Caryophyllus aromaticus* L. (VOSS-RECH, *et al.* 2011), *Eugenia aromatica* (L.) Baill. (MORAIS *et al.*, 2009), *Eugenia caryophyllata* Thunb. (SILVESTRI *et al.*, 2010), *Jambosa caryophyllus* (Sprengel) Nied. (SHARMA *et al.*, 2016) e *Myrtus caryophyllus* Spreng (PUGAZHVENDAN; ELUMALI, 2013), devendo ser incluídos nas pesquisas bibliográficas das ações biológicas do cravo-da-índia.

O óleo essencial de seus botões florais pode ser extraído por hidrodestilação e possui como componente majoritário o eugenol, um fenilpropanoide volátil de amplo uso nas indústrias farmacêuticas. Contém ainda em sua composição, acetato de eugenol, β -cariofileno e humuleno (Figura 4) (CORTÉS-ROJAS *et al.*, 2014).

Figura 4. Estruturas do eugenol (A), do acetato de eugenol (B), do β -cariofileno (C), e do humuleno (D).



Fonte: O autor (2016) – (ChemDraw Pro 8.0)

2.5 EUGENOL

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

Pode ser produzido sinteticamente, sendo o método mais prático realizado através da alilação de guaiacol com cloreto de alilo. Contudo, o eugenol é predominantemente preparado a partir de fontes naturais de óleo essencial, misturando

o óleo com um excesso de sódio aquoso (3%) ou solução de hidróxido de potássio e agitando, até que todo o eugenol se converta em um sal alcalino fenólico. A porção não fenólica insolúvel é extraída com um solvente ou por meio de destilação. Após remoção da porção não dissolvida, a solução alcalina fenólica é acidificada a baixas temperaturas e o eugenol liberado purificado por destilação fracionada (BEDOUKIAN, P.Z., 1986).

O processo de hidrodestilação dos botões florais secos *Syzygium aromaticum*, resulta na obtenção do óleo essencial e do hidrolato. O óleo essencial pode também ser obtido através da percolação do material vegetal com um solvente orgânico apolar e posterior filtração e evaporação. Para o isolamento do eugenol a partir do óleo essencial de cravo, pode-se também empregar a técnica de cromatografia líquida por coluna clássica, realizada através da eluição gradiente de hexano e diclorometano e da separação das frações de interesse obtidas, após análise e identificação por CG/EM (SUDARMA; ULFA, 2009).

O eugenol é um composto extremamente versátil e foi incluído como um ingrediente em cosméticos e vários perfumes populares, sorvetes, produtos de panificação e doces, antissépticos bucais, produtos farmacêuticos e composições para dentistas (BARCELOUX, D.G., 2008; CHANG *et al.*, 2002). Em odontologia é utilizado em combinação com óxido de zinco para formar um cimento polimerizado usado para procedimentos cirúrgicos, recheios temporários, agentes de nivelamento e de polpa e forros da cavidade (BOHNERT *et al.*, 2008).

Foi identificado em várias plantas aromáticas, tais como *Myristica fragrans* (noz-moscada), *Cinnamomum verum* (canela), *Cinnamomum cassia* (Canela Saigon), *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum* (manjeriço). No entanto, a planta *Syzygium aromaticum* pode ser considerada a principal fonte natural deste composto, uma vez que o mesmo representa 45 a 90% do total do óleo. O eugenol comercial é derivado do óleo de cravo, de canela ou manjeriço obtido por destilação a vapor, que depois é refinado e purificado (ZHENG *et al.*, 1992; BARCELOUX *et al.*, 2008; BEDOUKIAN, P.Z., 1986).

2.6 MECANISMO DE AÇÃO DO EUGENOL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-INDIA

Como consequência de sua vasta gama de atividades farmacológicas e biológicas, os estudos sobre o eugenol e produtos a base de cravo se mantêm como uma prioridade de investigação, sendo também importante elucidar seus mecanismos de ação, quando possível (RAJA *et al.*, 2015).

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

A enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por hidrolisar a acetilcolina nas sinapses colinérgicas, tem sido alvo de pesticidas e sua inibição pelos organofosforados levam à paralisia e morte de artrópodes (RIBEIRO, 2012). Algumas pesquisas tem apontado o eugenol, como um potente inibidor da AChE, o que justifica sua alta atividade frente a *R. microplus* (DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009).

Alternativamente, a natureza hidrofóbica dos óleos essenciais pode exercer efeitos mecânicos simultâneos, como a desregulação cuticular e bloqueio dos espiráculos, o que leva a morte dos parasitos por estresse hídrico ou asfixia (BURGESS, 2009; ELLSE; WALL, 2014).

2.7 TOXICIDADE DO EUGENOL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-INDIA

Em contraste com muitas outras moléculas e produtos naturais, a toxicidade do eugenol e do óleo de cravo tem sido razoavelmente bem estudados, apesar de faltarem estudos de toxicidade crônica. São reconhecidos como “seguros” (GRAS - Generally Recognized as Safe) em produtos alimentares pelo FDA, mas a ingestão acidental de grandes quantidades de óleo de cravo pode ter graves consequências (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

O potencial do eugenol e do óleo de cravo para induzir hipersensibilidade cutânea tardia ou para provocar reações devido à sensibilização cutânea foi avaliada no

homem. A análise dos dados demonstrou que o eugenol isolado ou óleo de cravo tem um potencial muito baixo para causar esses efeitos (ROTHENSTEIN *et al.*, 1983). Em outro estudo, eugenol foi capaz de induzir dermatite de contato alérgica em cobaias, contudo essa alergia só foi confirmada em concentrações superiores a 25% (OHSUMI, *et al.*, 1996).

A toxicidade de várias substâncias como cinamaldeído, óleo essencial de canela, óleo essencial de *Cymbopogon* (lemongrass), timol, óleo essencial de tomilho, óleo essencial de cravo, eugenol e extrato de raiz de gengibre, foram avaliadas por Koci *et al.* (2015) em células caninas renais de túbulo proximal usando ensaio de viabilidade e marcadores de lesão renal. Das substâncias voláteis empregadas o óleo essencial de cravo e o eugenol foram os que apresentaram menor toxicidade.

Issac *et al.* (2015) investigou a toxicidade aguda e sub-aguda do clovinol (extrato seco concentrado de cravo) em machos e fêmeas de ratos wistar, verificando que em um período de 24 horas após administração de altas doses (1.25 à 5 g/kg b.w.) de seu extrato não foi observado nenhuma mortalidade, reação adversa, mudanças clínicas ou de comportamento nos animais estudados. Além disso, nenhuma mudança no padrão de alimentação e no peso dos animais foi encontrada. No estudo de toxicidade sub-aguda, após 28 dias de administração do clovinol nas concentrações de 0.5, 1.0 e 2.5 g/kg b.w., o extrato mais uma vez, não foi capaz de induzir mortalidade, comportamentos e sinais clínicos anormais ou mudanças no ganho de peso dos animais, quando comparado com o grupo controle. O clovinol também não provocou mudanças significantes ($p > 0.05$) em nenhum parâmetro bioquímico ou hematológico, perfil renal e marcadores da função hepática, indicando a segurança do uso de extratos a base de cravo.

O metileugenol, um dos componentes que podem ser encontrado no óleo essencial de cravo da Índia não causou danos no DNA do fígado, pulmão, bexiga, medula óssea ou rim de ratos wistar expostos a 400 e 1000 mg/kg. No entanto, quando a concentração foi aumentada para 2000 mg/kg, metileugenol causou danos no DNA e na medula óssea (DING *et al.*, 2011).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização mundial da saúde (WHO) tem permitido a ingestão diária de 2.5 mg de

eugenol por peso para humanos (WHO, 1982). Além disso, o FDA tem classificado o eugenol como seguro, além de considerar o mesmo como não carcinogênico e não mutagênico (RAJA *et al.*, 2015).

Um novo ativo, pleiteado como acaricida deve ter, inicialmente, níveis aceitáveis de toxicidade aos seres humanos, aos animais e ao ambiente. Em seguida, caso o ativo tenha comprovada segurança são iniciados os estudos de eficácia e do desenvolvimento de formulação (GRAF *et al.*, 2004). Diante dos dados de toxicidade apresentados na literatura, o óleo essencial de cravo e o eugenol, caso tenham eficácia carrapaticida comprovada, representam um potencial para o desenvolvimento de novos produtos carrapaticidas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a composição química do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e avaliar a atividade carrapaticida do óleo, do eugenol e do hidrolato frente a larvas e fêmeas de *R. microplus*. Além disso, este estudo também teve o objetivo de investigar a atividade carrapaticida do óleo essencial e do eugenol quando incorporados em uma formulação farmacêutica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo essencial e obter o hidrolato de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia).
- Determinar a composição química do óleo essencial de cravo-da-índia.
- Desenvolver uma formulação de contato para incorporação do óleo essencial e do eugenol e analisar a estabilidade macroscópica das formulações por meio da avaliação das características organolépticas e do pH.
- Avaliar a ação carrapaticida *in vitro* do eugenol, do óleo essencial e do hidrolato de *Syzygium aromaticum* frente as larvas de *R. microplus*.
- Avaliar a ação carrapaticida *in vitro* do óleo essencial e do eugenol frente a fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
- Avaliar a atividade carrapaticida das formulações adicionadas do óleo essencial e do eugenol frente as larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

4 METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

4.1 LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DOS TRABALHOS

O óleo essencial foi obtido dos botões florais secos de *Syzygium aromaticum*. As extrações foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

A análise dos óleos por CG/EM foi realizada na CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e a avaliação carrapaticida *in vitro*, foi realizada no Laboratório de Artrópodes Parasitos no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os botões florais secos de *Syzygium aromaticum* foram adquiridos no comércio da cidade de Juiz de Fora - Minas Gerais e o produto eugenol, com 99,0 a 100,0% de pureza (Biodinâmica, lote 547/14) foi adquirido em um estabelecimento de produtos odontológicos.

4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Empregou-se o processo de hidrodestilação utilizando um sistema de Clevenger modificado em vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 2000 mL, tendo como fonte de calor uma manta de aquecimento a 100°C (FARMACOPEIA, 2010). Para cada extração foram utilizados 150 g dos botões florais com 1000 mL de água destilada. Após 3,0 h cessou-se a destilação, sendo que o óleo e o hidrolato foram separados por diferença de densidade. Foram realizadas duas extrações do óleo essencial, os produtos das duas extrações foram misturados e utilizados nas análises.

Ao óleo essencial foi adicionado Na₂SO₄, para a separação de resíduos de água. O mesmo então foi filtrado e armazenado em frasco de vidro âmbar, lacrado e protegido

da luz. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração à -5°C, sendo posteriormente submetidas às análises.

4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A análise qualitativa e quantitativa do óleo essencial de cravo-da-índia foi realizada na CentralBio da Faculdade de Farmácia da UFJF em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo, modelo QP 2010 Plus (SHIMADZU) a 70 Ev em coluna capilar (Rtx-5MS Restek, EUA – 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm), sendo a fase estacionária composta de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano e como fase móvel foi utilizado o gás hélio.

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

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

Para a análise cromatográfica foi utilizado o Injetor AOC – 20i na seguinte condição: temperatura inicial da coluna de 100 à 220 °C com taxa de aquecimento de 3 °C/minuto. As temperaturas de injetor e interface foram mantidas em 250 °C e 280 °C respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL/min (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Uma avaliação qualitativa dos picos obtidos foi realizada por meio da comparação entre similaridade dos espectros de massa dos picos obtidos em relação ao banco de dados da biblioteca de espectros (NIST11) do equipamento. Foi considerada satisfatória uma similaridade maior ou igual a 94% (Apêndice A).

Através do Software LabSolutions CGMS 2.7 foi realizada a integração dos 4 picos principais, sendo possível inferir a quantidade relativa dos componentes majoritários presentes no óleo essencial.

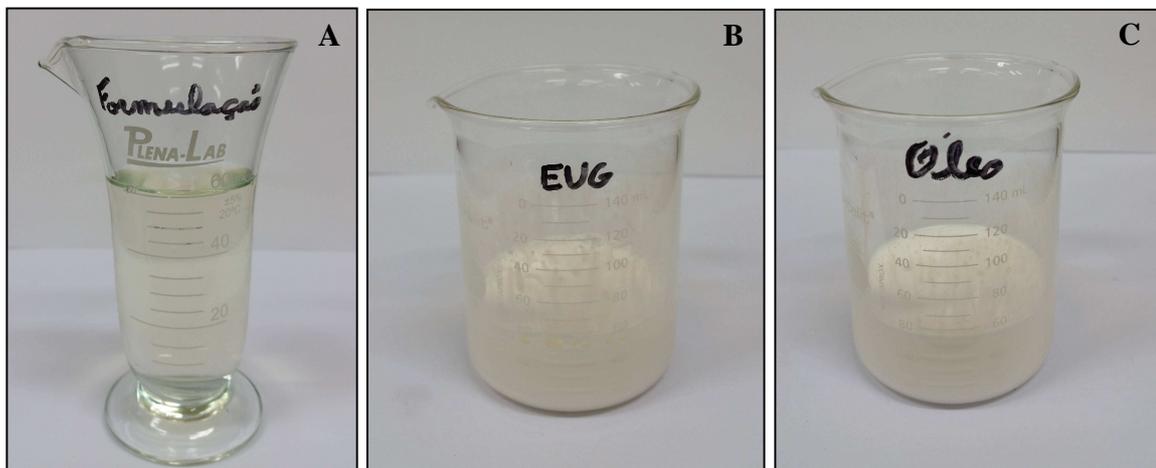
4.5 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

A formulação base desenvolvida para a incorporação do eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia constituiu-se de uma solução etanólica à 30%, na qual foram incorporados conservante parabeno, agentes umectante e de penetração, tensoativo e co-tensoativo (Figura 5). A formulação desenvolvida utilizada como veículo para o óleo essencial e eugenol, foi preparada por agitação manual e está apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Formulação base desenvolvida para incorporação dos componentes de estudo.

Componente	Função	Concentração
Tween 80	Tensoativo	2%
DMSO	Agente de penetração	5%
Glicerina	Umectante	5%
Lauril	Co-tensoativo	0,1%
Nipagin	Conservante	0,1%
Etanol 30%	Solução base	qsp 100%

Figura 5. Formulações desenvolvidas



A: Formulação base; B: Formulação contendo eugenol à 5%; C: Formulação contendo óleo essencial de cravo-da-índia à 5%.

Fonte: o autor (2016)

As formulações adicionadas do óleo essencial e do eugenol foram submetidas ao teste de centrifugação e ao estudo de estabilidade preliminar, conforme preconizado

no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2004).

Primeiramente amostras das formulações foram submetidas a um processo de centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos e avaliadas visualmente ao final do teste. O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades tais como precipitação, separação de fases, formação de *caking*, coalescência entre outras.

As amostras foram também submetidas ao teste de estabilidade preliminar, conhecido também como Teste de Triagem, Estabilidade Acelerada ou de Curto Prazo. As formulações foram acondicionadas em tubos de vidro transparente com tampa, a fim de garantir boa vedação. O volume total do frasco não foi completado para permitir possíveis trocas gasosas. A duração do estudo foi de 15 dias. As amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa à $37 \pm 2^\circ\text{C}$, ao resfriamento em refrigeradores à $5 \pm 2^\circ\text{C}$, à ciclos alternados de congelamento e aquecimento (ciclos de 24 horas à $50 \pm 2^\circ\text{C}$, e 24 horas à $-5 \pm 2^\circ\text{C}$), à exposição a luz solar e à temperatura ambiente sob ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas no tempo de 24 horas e ao 15º dia, quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor), ao pH, bem como à separação de fase por centrifugação.

4.6 AVALIAÇÃO CARRAPATICIDA *IN VITRO*

4.6.1 Teste de pacote de larvas

Para a obtenção das larvas de *R. microplus* foram utilizadas fêmeas ingurgitadas provenientes de populações de campo. Para a realização dos experimentos foram utilizadas larvas com idade entre 15 a 28 dias pós-eclosão.

No primeiro teste foi utilizado etanol a 50% como controle e como diluente em todas as amostras. O eugenol, o óleo essencial e o hidrolato de cravo-da-índia foram testados nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%.

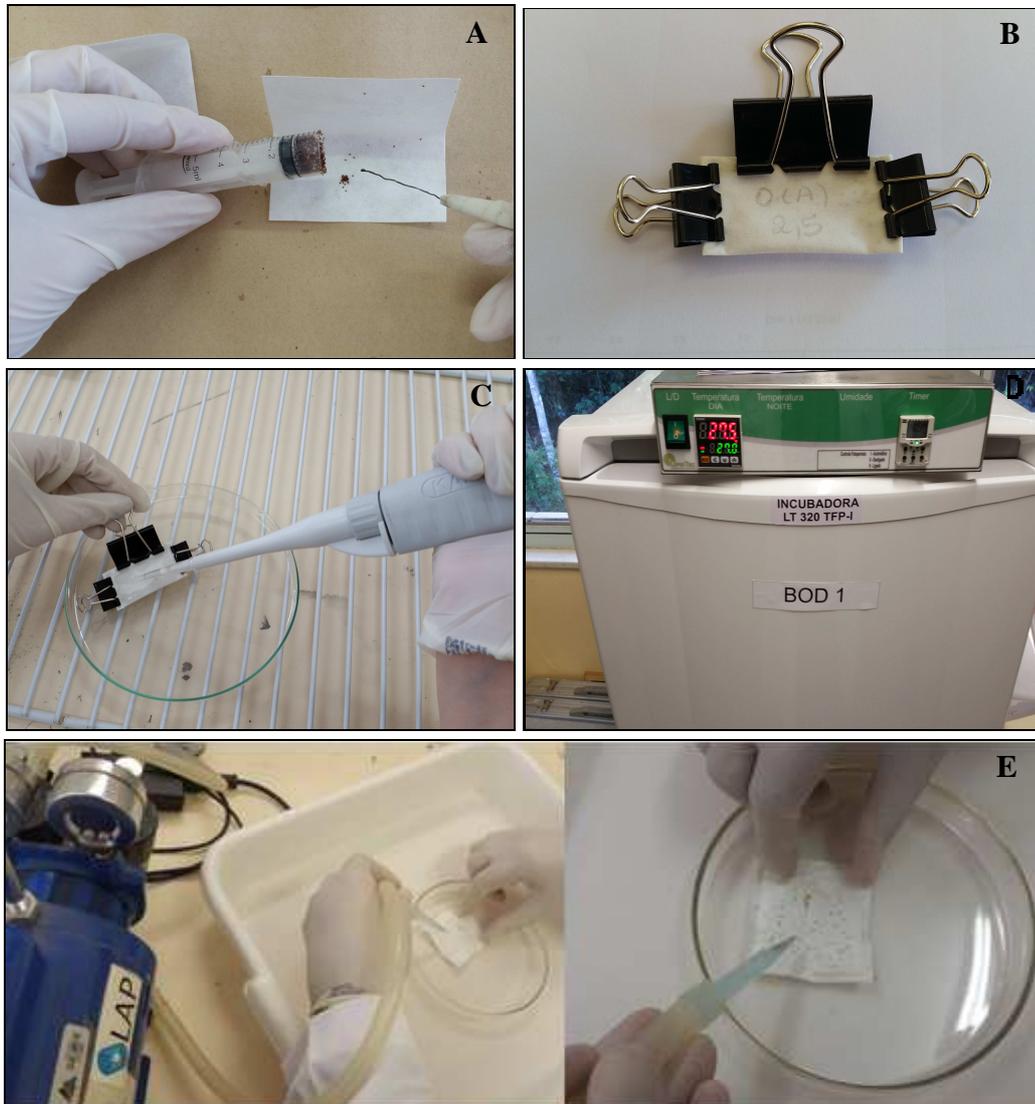
Posteriormente repetiu-se o teste com o eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia quando incorporados na formulação base e também quando diluídos em etanol 50% frente as larvas de *R. microplus* de populações de campo provenientes de São Carlos/SP. Para o controle negativo foi utilizada a formulação base e o etanol 50%. Os estudos com o hidrolato não tiveram continuidade, devido o mesmo não ter apresentado atividade no teste inicial.

Foi usado o teste de pacote de larvas (STONE e HAYDOCK, 1962), modificado por Monteiro *et al.* (2012), no qual aproximadamente 100 larvas foram colocadas em folhas de papel de filtro, medindo 6 x 6 cm (Figura 6A). Posteriormente, as folhas foram dobradas ao meio e as extremidades foram seladas com clips (Figura 6B). Em seguida, cada um dos lados dos pacotes resultantes foi umedecido uniformemente com 90 µL das soluções de ensaio (Figura 6C). No grupo controle, as larvas foram tratadas apenas com o solvente que foi usado para cada substância testada. Foram realizadas 10 repetições para todos os grupos.

Os grupos experimentais foram mantidos em uma câmara climatizada (27 ± 1 °C e umidade relativa (UR) > 80%) (Figura 6D), com uma câmara separada para cada substância, incluindo o grupo controle, para que não houvesse interferência entre as substâncias testadas.

A mortalidade foi avaliada após 24 h, a partir da contagem das larvas vivas e mortas com o auxílio de uma bomba de vácuo (Figura 6E). A mortalidade foi expressa em porcentagem: $\text{Mortalidade (\%)} = (\text{larvas mortas} / \text{total de larvas}) \times 100$.

Figura 6. Teste de pacote de larvas



A: Larvas ingurgitadas sendo colocadas no centro do papel filtro; B: Papel filtro dobrado ao meio e fechado nas laterais com clips; C: Papel filtro sendo umedecido com 90 μ L; D: Cabine climatizada com temperatura $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR > 80%; E: Contagem de larvas vivas e mortas com a utilização de uma bomba de vácuo.

Fonte: O autor (2016)

4.6.2 Teste com fêmeas ingurgitadas

As fêmeas foram selecionadas de um montante de aproximadamente 300 espécimes, fornecidos pelo laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite – MG, sendo populações de campo provenientes de Uberlândia-MG.

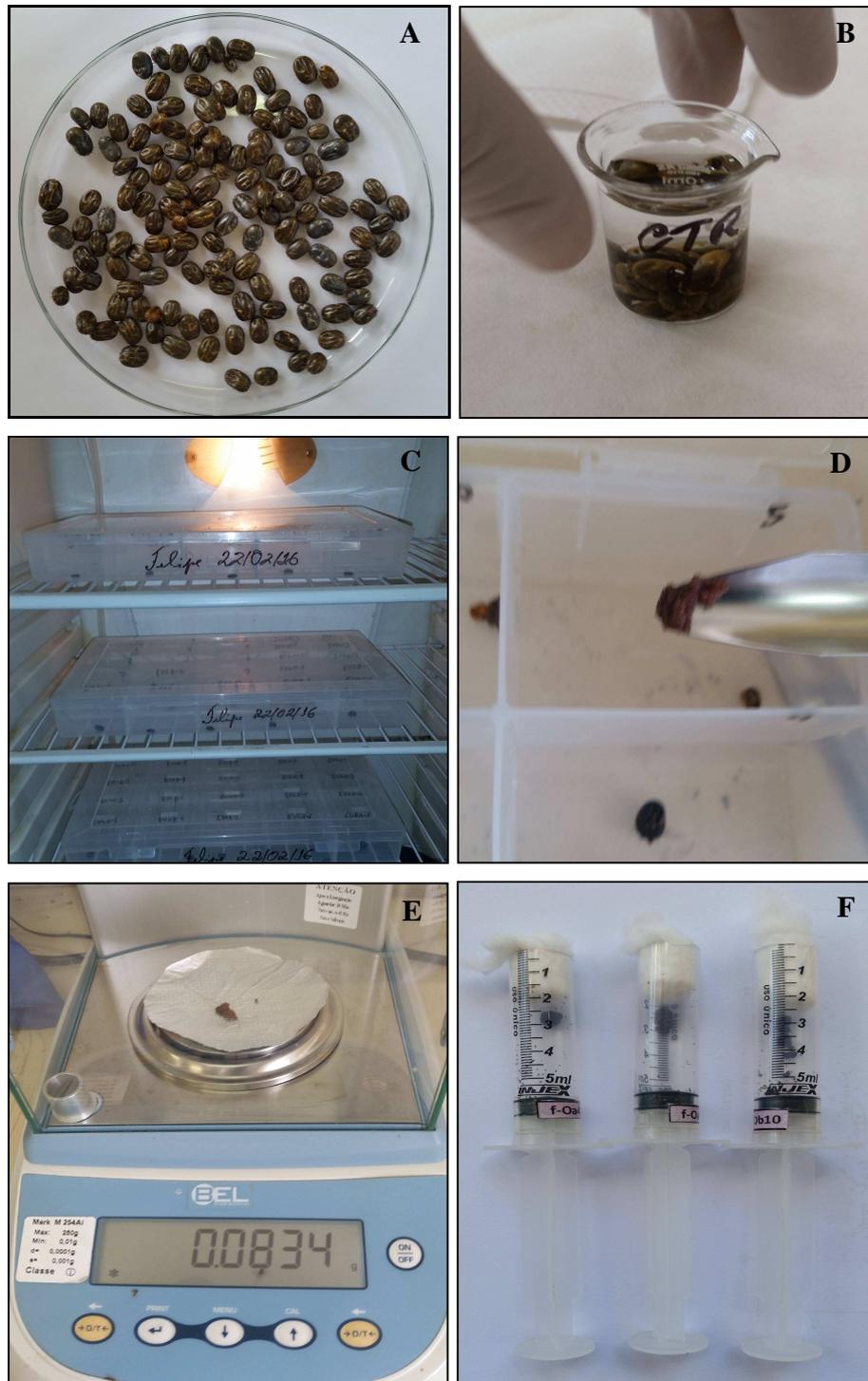
O eugenol e o óleo de cravo-da-índia foram testados nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0% quando incorporados na formulação base e também quando diluídos em etanol 50%. Para o controle negativo foi utilizada a formulação base e o etanol 50% sem a adição dos componentes estudados.

O desenvolvimento dos testes foi fundamentado pela técnica de Drummond *et al.* (1973), utilizando-se fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Na amostra de carrapatos (Figura 7A) as fêmeas foram selecionadas de acordo com os critérios de tamanho e mobilidade e separadas em grupos (n=10), que foram tratadas com os ativos em variadas concentrações.

As fêmeas foram mergulhadas nas formulações e nas soluções e deixadas por cinco minutos em imersão (Figura 7B). Concluído o tempo de contato, foram coletadas e fixadas separadamente no interior de um recipiente adaptado para o teste. Estas foram mantidas por 15 dias sob temperatura controlada de 27(±1,0°C) e umidade relativa acima de 80% (Figura 7C). Após o período de incubação, foram realizadas as pesagens da ovoposição de cada fêmea (Figuras 7D e 7E).

Os ovos de cada fêmea foram transferidos para seringas plásticas, com a extremidade distal cortada e vedadas com algodão hidrófilo, sendo mantidas nas mesmas condições das fêmeas, por 20 dias, para a observação da eclosão larval (Figura 7F).

Figura 7. Teste de imersão de fêmeas ingurgitadas.



A: Placa de petri com fêmeas de *R. microplus*; B: Imersão no grupo controle; C: Fêmeas em BOD climatizada; D: Coleta da ovoposição; E: Pesagem da ovoposição; F: Ovos na seringa lacrada.

Fonte: O autor (2016)

4.7.3 Avaliação da eficácia do tratamento

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

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

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

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

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

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

Para a avaliação da eclosão larval (EL) empregou-se a leitura direta (%) de larvas eclodidas no interior da seringa. A eclosão larval nos indica a porcentagem, de 0-100%, de ovos que eclodirão dos grupos controles e dos tratamentos. O esperado é que conforme se aumente a concentração dos ativos na formulação, a eclosão larval tenha índice decrescente.

Os resultados de eficácia de tratamento com as formulações contendo os óleos essenciais foram confrontados com os dados da Portaria 48, de 12 de maio de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1997), que estabelece um valor mínimo de eficácia de 95% *in vivo* para que um produto possa ser considerado um acaricida.

4.6.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.0. Os dados foram tratados por meio de análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas. Foram consideradas como diferenças significativas, valores de $p < 0,01$ e $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA

Após o processo de hidrodestilação por 3 horas o rendimento médio das extrações do óleo essencial de cravo-da-índia, pelo método utilizado, alcançou resultado de 7,13% para o óleo e 28,2% para o hidrolato (Tabela 2). Foi observado diferença entre os rendimentos obtidos na primeira e na segunda extração que pode ser explicada devido a variação na natureza da matéria-prima vegetal.

Tabela 2: Peso médio (g) de planta utilizada por extração e rendimento do óleo essencial e do hidrolato de cravo-da-índia (mL) e (% m/v).

Extração Óleo essencial de cravo-da-índia	Peso médio por extração	Rendimento do óleo		Rendimento do hidrolato	
	(g)	(mL)	(%)	(mL)	(%)
1º extração	150,0	9,8	6,53	44,2	29,47
2º extração	150,0	11,6	7,73	40,4	26,93
Total	300,0	21,4	7,13	84,6	28,2
Média	150,0	10,7	7,13	42,3	28,2

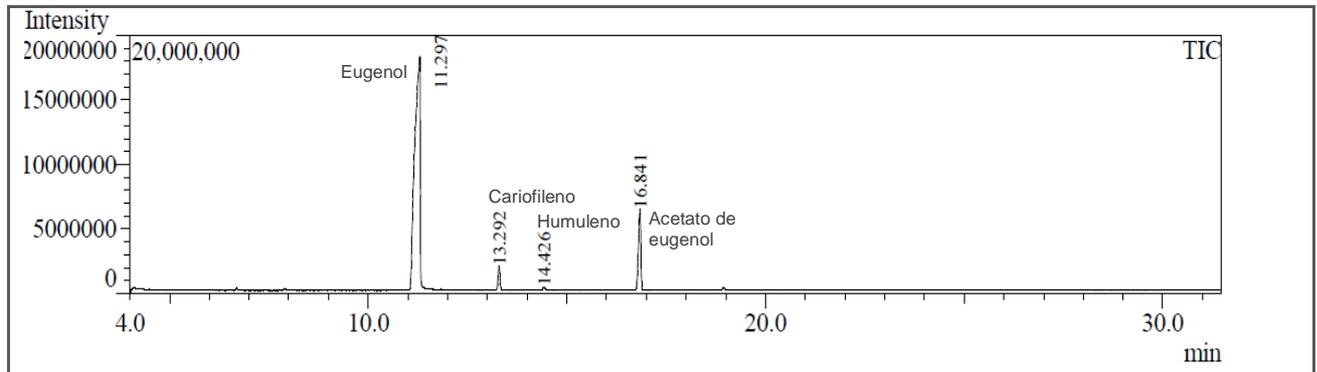
Silvestri *et al.* (2010), utilizando o mesmo método de extração, mas com tempo de 90 minutos, encontrou rendimento de 1,87% (m/v), bem menor ao encontrado no trabalho. Esta diferença pode ser explicada em parte devido a diferença no tempo extrativo, demonstrando que maiores tempos de extração são necessários para o aumento no rendimento do óleo.

Utilizando a técnica extrativa de CO₂ supercrítico, Martínez (2005), encontrou rendimento de até 17,1%. Embora apresente rendimento superior, a técnica utilizada apresenta alto custo para implantação e manutenção quando comparada à hidrodestilação. O autor também verificou variação no rendimento ao utilizar dois lotes diferentes, o que reforça a influência da natureza da matéria-prima como um dos fatores determinantes para o rendimento do processo.

5.2 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL

Através da análise de CG/EM foi possível identificar os componentes majoritários presentes no óleo de cravo. O cromatograma obtido pode ser visualizado a seguir (Figura 8).

Figura 8: Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de cravo-da-índia, com destaque para os componentes majoritários.

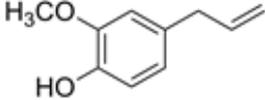
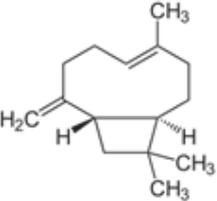
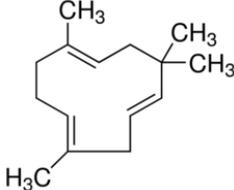
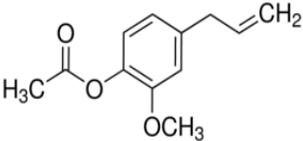


Fonte: O Autor (2016)

Na composição volátil do óleo essencial de cravo-da-índia, utilizado no estudo, foram destacados quatro compostos majoritários, destacando-se o eugenol, com 83,97% da área total, seguido pelo acetato de eugenol com 12,58%, o cariofileno com 3,04% e o humuleno com 0,42% (Tabela 3). Outros compostos também foram detectados, mas estavam em quantidades diminutas e por isso não foram expressos.

A origem da planta, a parte utilizada, o estágio de desenvolvimento, a interação com insetos e predadores, as condições climáticas e de crescimento, como temperatura, solo e fertilizantes e as condições de destilação e estocagem são capazes de exercer influência sobre o conteúdo e rendimento de metabólitos voláteis (OLADIMEJI *et al.*, 2001; OZCAN; ERKMEN, 2001).

Tabela 3: Componentes do óleo essencial de cravo-da-índia (botões florais secos) e seus tempos de retenção, através da técnica de CG/EM.

Picos	Nomes	Estrutura da substância	TR (min)	Altura	Área	Quantidade relativa (%)
1	Eugenol		11.297	18063049	172475453	83.97
2	Cariofileno		13.292	1867335	6235233	3.04
3	Humuleno		14.426	250363	854959	0.42
4	Acetato de Eugenol		16.841	6300008	25846144	12.58

Em análise qualitativa de CG/EM, realizada pelo mesmo grupo de pesquisa no óleo essencial de cravo, foram identificados 4 componentes: eugenol, acetato de eugenol, β -cariofileno e oxido cariofileno (DE MELLO *et al.*, 2014). Dados presentes na literatura reforçam o eugenol como composto majoritário (90,3%), além do β -cariofileno (4,83%) e do acetato de eugenol (1,87%) (SILVESTRI *et al.*, 2010).

Jairoce *et al.* (2016), após obter o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* por 4 horas de hidrodestilação, realizou a caracterização de seus componentes utilizando a técnica de CG/EM para identificação e CG/FID para quantificação. Foi encontrando 62,72% de eugenol, 18,46% de cariofileno, 2,04% de α -cariofileno (humuleno) e 15,97% de acetato de eugenol, o que se assemelha aos componentes encontrados em nosso estudo, além de mais uma vez demonstrar o eugenol como o principal constituinte.

Em um trabalho de revisão sobre a espécie *Syzygium aromaticum*, Cortés-rojas e colaboradores (2014), descreveram que o rendimento do óleo essencial obtido através

dos botões florais secos pode chegar até 18%, sendo o mesmo composto, de um modo geral, por 89% de eugenol, 5 a 15% de cariofileno e acetato de eugenol e até 2,1% de α -humuleno (humuleno). Além dos compostos majoritários citados o autor também descreveu que é possível encontrar outros componentes voláteis em menores concentrações como β -pineno, limoneno, farnesol, benzaldeído, 2-heptanona e hexanoato de etilo.

5.3 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

Após a incorporação do óleo essencial (5%) e do eugenol (5%), as formulações apresentaram-se como uma emulsão homogênea, de aspecto branco leitoso, odor característico de cravo e pH 5,55 para a formulação adicionada do óleo e 5,66 para a formulação com o eugenol.

As formulações do óleo essencial de cravo e do eugenol foram submetidas primeiramente ao teste de centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos. Após o teste as formulações mantiveram-se estáveis sem a separação das fases.

Após o término do estudo de estabilidade preliminar, por um período de 15 dias, as formulações foram avaliadas macroscopicamente com relação as características organolépticas e valores de pH. Não foram observadas modificações nas características das formulações controle (mantidas em temperatura ambiente) e submetidas as condições de estufa, geladeira e ciclos de congelamento e descongelamento. As formulações expostas a luminosidade, apresentaram uma leve mudança na coloração indicando que produtos a base de eugenol e do óleo essencial de cravo devem ser acondicionados em recipientes protegidos da luz. Também não foram observadas mudanças bruscas no pH das amostras.

O desenvolvimento de formulações carrapaticidas é importante não só para garantir a estabilidade do produto, mas também para facilitar sua aplicação, permitir a permanência do produto por um tempo maior no animal, melhorar sua ação, diminuir a degradação do ativo e a contaminação microbiológica.

5.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CARRAPATICIDA

5.4.1 Teste do pacote de larvas

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

Os resultados obtidos, no teste inicial *in vitro* de triagem com as larvas de *Rhipicephalus microplus* realizados empregando-se as concentrações 0,1; 0,25; 5,0; 1,0 e 2,0%, demonstraram que o eugenol e o óleo essencial promoveram 100% de mortalidade em concentrações superiores a 0,25 e 1,0%, respectivamente (Tabela 4). O óleo apresentou na concentração de 0,5%, mortalidade superior à 95%. No entanto, o hidrolato de cravo-da-índia não demonstrou nenhuma atividade, nem mesmo na maior concentração testada (2,0%).

Tabela 4: Mortalidade de larvas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia diluídos em soluções hidroetanólicas (etanol 50% v/v) sob condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR > 80 \pm 10%).

	Eugenol (%)	Óleo essencial (%)
Controle*	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a
0,1	65,15 \pm 22,02 ^b	15,89 \pm 19,87 ^b
0,25	100,0 \pm 0,0 ^c	45,04 \pm 14,55 ^c
0,5	100,0 \pm 0,0 ^c	98,77 \pm 1,71 ^d
1,0	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^d
2,0	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^d

Os resultados representam a média \pm DP (n=10 pacotes de larvas por grupo).

Medias com letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tuckey.

O grupo controle para todas as amostras foi etanol 50%.

Os testes foram realizados simultaneamente, sendo mesma população de carrapatos e grupo controle para as substâncias.

Os hidrolatos, subprodutos do processo de hidrodestilação, podem conter em sua composição a presença de substâncias hidrofílicas bioativas, o que, somado ao seu alto rendimento, justifica a investigação de sua atividade. No entanto, o presente trabalho, demonstrou que o hidrolato de cravo-da-índia não apresentou potencial como carrapaticida, em parte justificado pelas características físico-químicas de suas substâncias de caráter mais hidrofílico que diferem dos componentes presentes no óleo essencial. Uma alternativa viável para a confirmação do potencial do hidrolato de cravo-

da-índia seria a caracterização de seus componentes químicos e a investigação de sua atividade após concentração através da técnica de liofilização.

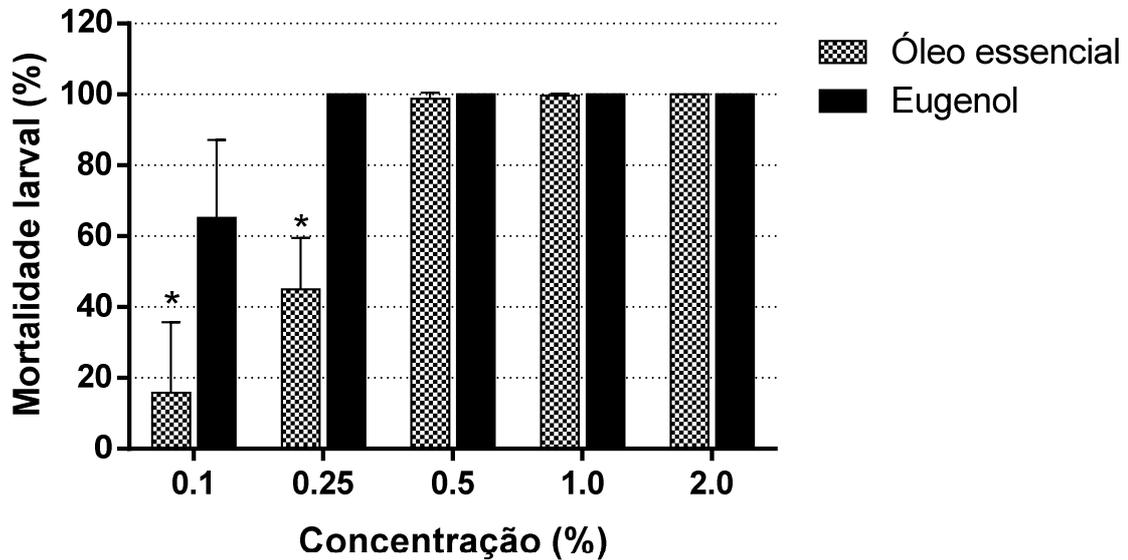
A avaliação da atividade de um potencial agente carrapaticida frente as larvas é de grande importância, uma vez que estas apresentam-se como um importante estágio do ciclo biológico do carrapato e são consideradas alvos em sistemas estratégicos de controle. Desde 1975 a FAO tem recomendado o uso do Teste do Pacote de Larvas – TPL para avaliação da resistência à carrapaticidas. Este trabalho apresenta de forma pioneira os resultados da avaliação da eficácia carrapaticida do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* em larvas de *R. microplus*.

Monteiro e colaboradores (2012), ao verificarem a ação do eugenol sobre as larvas de *R. microplus* encontraram como resultado 99,4% de mortalidade para a concentração de 2,5 µL/mL (0,25%), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. A pequena variação encontrada justifica-se devido a possíveis alterações que podem ocorrer na eficácia acaricida de acordo com a origem da colônia e condições ambientais (RAYNAL *et al.*, 2013).

Utilizando outro método de pacote de larvas (SHAW, 1966), adaptado por Leite (1988), Valente e colaboradores (2014) também estudaram a atividade do eugenol frente as larvas de *R. microplus*, encontrando taxa de mortalidade 9,91% na concentração de 0,1% e de 100% para concentrações superiores a 0,3%. Nesse teste, o eugenol foi solubilizado em Triton X-100 3%.

Sob o ponto de vista químico, sugere-se que a ação carrapaticida do óleo essencial de cravo-da-índia seja devido a presença do eugenol (AGNOLIN, 2010; MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.* 2011; OLIVEIRA *et al.* 2009). Contudo, torna-se importante comparar as atividades do óleo essencial e eugenol (Gráfico 1) com a finalidade de verificar se o eugenol presente no óleo age de forma isolada ou se poderia haver sinergismo com os demais componentes; ou ainda, se os demais componentes do óleo de cravo possuem algum efeito antagonista na ação acaricida do eugenol.

Gráfico 1: Estudo comparativo da mortalidade de larvas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia em soluções hidroetanólicas.



Os resultados representam a mortalidade média \pm DP (n=10 pacotes de larvas por grupo).* $p < 0,01$ diferença significativa entre os grupos de larvas tratados com o óleo essencial e os grupos tratados com o eugenol, usando ANOVA de duas vias (Two-way ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Ao analisar o gráfico verifica-se que, apesar do eugenol ter tido uma atividade maior do que a do óleo essencial, a partir da concentração de 0,5% foi possível observar atividades semelhantes entre as substâncias. Portanto, a utilização do óleo pode representar uma vantagem, uma vez que não requer etapas de purificação que utilizam solventes e resíduos que aumentam o custo do produto final carrapaticida.

O segundo teste realizado com larvas de *R. microplus*, comparando os efeitos do óleo essencial e do eugenol quando veiculados em solução hidroetanólica ou na formulação mostrou um perfil semelhante ao teste inicial, com o eugenol apresentando 100% de mortalidade em concentrações superiores à 0,25%. Porém, neste experimento, o óleo obteve atividade semelhante ao eugenol já na concentração de 0,25%, chegando a 100% de mortalidade em 0,5%, o que reforça o potencial acaricida deste produto natural (Tabela 5).

Tabela 5: Mortalidade de larvas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial **incorporados em formulação** e **diluídos em soluções hidroetanólicas** (etanol 50% v/v), sob condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $>80 \pm 10\%$).

	Formulação base		Etanol 50%	
	Eugenol (%)	Óleo essencial (%)	Eugenol (%)	Óleo essencial (%)
Controle*	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a
0,1	32,76 \pm 13,38 ^b	11,95 \pm 4,55 ^b	38,06 \pm 26,53 ^b	35,99 \pm 9,67 ^b
0,25	99,11 \pm 1,59 ^c	99,55 \pm 1,44 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	97,92 \pm 1,64 ^c
0,5	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c
1,0	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c
2,0	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c

Os resultados representam a média \pm DP (n=10 pacotes de larvas por grupo).

Medias com letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tuckey.

Os grupos controle utilizados foram etanol 50% e a formulação base.

Os testes foram realizados simultaneamente, sendo mesma população de carrapatos e grupos controle para as substâncias.

Comparando-se os tratamentos realizados com o eugenol e o óleo de cravo veiculados na solução hidroetanólica e na formulação desenvolvida, verifica-se que a formulação não foi capaz de propiciar uma melhora na eficácia do tratamento.

O desenvolvimento de formulações é considerado uma etapa crítica na prospecção de novos agentes farmacêuticos. Embora apresente a vantagem de garantir a estabilidade do componente ativo, em muitos casos, componentes da fórmula podem atuar de forma antagonista diminuindo a ação do componente testado. Diante do exposto, é recomendável que o teste de uma substância quando incorporado em uma formulação seja sempre comparado com a mesma substância quando dissolvida em um solvente. No entanto, Chagas *et al.* (2003) verificaram que são poucos os trabalhos comparativos com relação a interferência de diferentes solventes no resultado final de um experimento.

Dados da literatura mostram que podem ocorrer diferentes níveis de eficácia acaricida de acordo com a região geográfica e população de carrapatos utilizadas (RAYNAL *et al.*, 2013). No presente estudo as larvas foram obtidas de fêmeas coletadas de populações de campo referentes aos municípios de Uberlândia/MG e São Carlos/SP. Como são amostras biológicas naturais, que já foram submetidas a diferentes acaricidas químicos e apresentam diferentes perfis de resistência, os

resultados, embora denotem maior heterogeneidade e desvio quando comparados com colônias artificiais, representam de forma mais real a atividade dos componentes em condições de campo.

5.4.2 Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas.

O eugenol e o óleo essencial de cravo-da-índia foram testados frente as fêmeas de *R. microplus* nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0% quando diluídos em etanol 50% (Tabela 6) e também quando incorporados na formulação base (Tabela 7). Os resultados referentes ao Índice de Produção de Ovos (IPO), Eclosão Larval (EL) e Eficácia do Tratamento (%C) estão apresentados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6: IPO, EL e %C de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia **em soluções hidroetanólicas (Etanol à 50%)** sob condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR > 80 \pm 10%).

Concentração (%)	Eugenol			Concentração (%)	Óleo essencial		
	IPO	EL	%C		IPO	EL	%C
Controle água	50,02 \pm 8,78 ^a	94,44 \pm 5,27 ^a	-	Controle água	50,02 \pm 8,78 ^a	94,44 \pm 5,27 ^a	-
Etanol 50%	48,37 \pm 9,00 ^a	99,17 \pm 2,04 ^a	-	Etanol 50%	48,37 \pm 9,00 ^a	99,17 \pm 2,04 ^a	-
1,25	37,19 \pm 24,76 ^a	48,33 \pm 33,63 ^b	55,9	1,25	33,47 \pm 24,16 ^{ab}	34,44 \pm 40,65 ^b	75,5
2,5	53,34 \pm 5,16 ^a	43,00 \pm 20,44 ^b	51,4	2,5	41,30 \pm 22,85 ^{ab}	39,00 \pm 34,03 ^b	62,9
5,0	35,00 \pm 18,36 ^a	6,50 \pm 6,23 ^c	94,4	5,0	24,86 \pm 16,15 ^b	8,30 \pm 15,51 ^b	95,6
10,0	7,97 \pm 11,87 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	100,0	10,0	2,57 \pm 8,12 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b	100,0

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

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

O grupo controle para todas as amostras foi etanol 50%.

O controle água foi utilizado para verificar os parâmetros das fêmeas na ausência de qualquer substância que pudesse afeta-las.

Os testes foram realizados simultaneamente, sendo mesma população de carrapatos e grupo controle para ambas substâncias.

Os tratamentos das fêmeas com o óleo essencial de cravo-da-índia e com o eugenol em soluções hidroetanólicas reduziram significativamente a produção de ovos a partir da concentração de 5% para o óleo essencial e em 10% para o eugenol. A eclosão larval foi reduzida em todas as concentrações testadas, sendo que o tratamento com as soluções contendo 10% do óleo essencial ou eugenol foram capazes de inibir completamente a eclosão. Os resultados demonstraram boas eficácias de tratamento nas concentrações de 5 e 10%.

Comparando-se os tratamentos das fêmeas com as soluções hidroetanólicas adicionadas de eugenol ou do óleo de cravo, verificou-se melhores eficácias de tratamento quando utilizado o óleo de cravo, atingindo ambos 100% de eficácia de tratamento na concentração de 10%.

Tabela 7: IPO, EL e %C de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações de eugenol e óleo essencial de cravo-da-índia **incorporados em formulação** sob condições de laboratório (27 ±1 °C e UR>80 ± 10%).

Concentração (%)	Eugenol			Concentração (%)	Óleo essencial		
	IPO	EL	%C		IPO	EL	%C
Controle água	50,02 ±8,78 ^a	94,44 ±5,27 ^a	-	Controle água	50,02 ±8,78 ^a	94,44 ±5,27 ^a	-
Formulação base	43,34 ±11,32 ^{ab}	95,00 ±10,00 ^a	-	Formulação base	43,34 ±11,32 ^{ab}	95,00 ±10,00 ^a	-
1,25	40,34 ±9,32 ^{ab}	78,13 ±21,03 ^a	3,7	1,25	24,91 ±19,82 ^b	64,44 ±35,39 ^{ab}	37,7
2,5	30,36 ±20,02 ^c	34,78 ±36,44 ^b	62,6	2,5	23,45 ±23,39 ^b	34,11 ±36,92 ^{bc}	74,8
5,0	11,65 ±16,13 ^c	18,40 ±26,51 ^b	85,6	5,0	18,18 ±17,08 ^b	23,29 ±25,70 ^c	76,5
10,0	16,12 ±15,05 ^c	7,20 ±16,28 ^b	96,3	10,0	16,03 ±18,00 ^b	8,33 ±13,54 ^c	92,9

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

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

O grupo controle para todas as amostras foi a formulação base.

O controle água foi utilizado para verificar os parâmetros avaliados das fêmeas na ausência de qualquer substância que pudesse afeta-los.

Os testes foram realizados simultaneamente, sendo mesma população de carrapatos e grupo controle para ambas substâncias.

O tratamento das fêmeas com o eugenol veiculado na formulação reduziu significativamente a produção de ovos e a ecloração larval nas concentrações de 2,5; 5,0; e 10,0%.

Utilizando-se a mesma formulação base adicionada do óleo essencial nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0% observou-se que as formulações não tiveram efeito significativo na produção de ovos. No entanto foram capazes de reduzir de modo significativo a ecloração larval a partir da concentração de 2,5%. Não foram observadas eficácias de tratamento superiores à 95% após a utilização das formulações de óleo testadas.

Vale ressaltar que os tratamentos realizados com as soluções controle de etanol 50% e com a formulação placebo não influenciaram na produção de ovos e na ecloração

larval, uma vez que os tratamentos com os mesmos apresentaram resultados similares ao tratamento controle feito com água, o que significa que os resultados obtidos referem-se ao efeito do eugenol ou do óleo essencial, e não do solvente etanol ou dos componentes das formulações.

Comparando-se os tratamentos realizados com o eugenol e o óleo de cravo veiculados na solução hidroetanólica e na formulação, verificaram-se melhores eficácias de tratamento do eugenol e do óleo essencial quando veiculados na solução hidroetanólica. A utilização da formulação desenvolvida nesse trabalho não proporcionou vantagem em relação ao uso da solução hidroetanólica.

Estudos anteriores já reportaram as atividades fungicida, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antisséptica, inseticida e repelente do óleo de cravo-da-índia (NERIO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Com relação a atividade carrapaticida, já foi demonstrada eficácia *in vitro* de 100% do extrato apolar de cravo-da-índia sobre as fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ALVAREZ *et al.*, 2008). Contudo, o referido extrato foi utilizado de forma concentrada, o que dificulta a extrapolação do resultado para uso comercial, uma vez que não é possível prever a menor concentração com atividade.

De Mello *et al.* (2014) também avaliaram a atividade carrapaticida *in vitro* de óleo essencial de cravo-da-índia sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, apresentando índices de 88,97 a 100% de mortalidade em concentrações a partir de 2,5 à 15%. Porém, os testes foram conduzidos somente através da incorporação do óleo em formulações de contato, as quais possuem natureza proprietária, dificultando a replicação e comparação dos estudos (ELLSE; WALL, 2014).

Estudos conduzidos por Santos *et al.* (2012) mostraram a atividade acaricida do óleo do fruto de cravo-da-índia em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Este autor obteve como resultado, nas concentrações de 2,5 e 5,0%, eficácias de aproximadamente 97,15 e 99,42% respectivamente, com óleo veiculado em solução de acetona 40%. Contudo o autor não verificou a composição do óleo essencial utilizado.

Valente *et al.* (2014), ao realizarem o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas, com diferentes concentrações de eugenol (1 à 30%) solubilizado em Triton X-100 3%, verificou que o eugenol a 2% foi capaz de interferir na eficiência de reprodução de *R.*

microplus em 45.04%, apresentando 79.29% de eficiência na concentração de 3%. Já na concentração de 5%, o autor verificou inibição da ovoposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* com 100% eficiência.

No presente trabalho, quando o óleo essencial foi diluído em etanol 50%, o mesmo apresentou eficácia de tratamento acima de 95%, a partir da concentração de 5,0%, o que corrobora com dados já publicados na literatura.

Muitos dos componentes ativos utilizados comercialmente como repelentes de artrópodes foram originalmente isolados a partir de uma planta ou de alguma outra fonte natural, mas são produzidos atualmente de forma sintética. (BISSINGER; ROE, 2010). Embora seja extenso o número de plantas e derivados com ação repelente, poucos são comercializados. Em alguns casos o custo da extração e purificação do componente ativo torna a comercialização inviável. Além disso, o rendimento desses compostos pode ser baixo (MOORE; LENGLET; HILL, 2007).

A aplicação de óleos essenciais como ingredientes funcionais, tem despertado grande interesse no setor industrial devido à tendência dos consumidores em utilizarem, preferencialmente, produtos farmacêuticos ou alimentícios de origem natural (MARTINAZZO *et al.*, 2007; SCHERER, 2009).

Considerando todos os tratamentos realizados em fêmeas, conclui-se que o uso do eugenol, substância purificada (99-100%) não proporcionou superioridade significativa nas eficácias de tratamento em relação ao óleo essencial de cravo. Esses resultados reforçam o potencial do uso do óleo essencial de cravo como carrapaticida, uma vez que o mesmo é uma alternativa de fácil acesso, baixo custo e com alto rendimento no processo extrativo.

Além disso, o isolamento e a purificação do eugenol, a partir do óleo de cravo, aumentam o custo do processo, geram perdas no rendimento total e ainda há o consumo de solventes orgânicos que agredem o meio ambiente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram a expressiva atividade carrapaticida do eugenol e do óleo essencial de cravo-da-índia mesmo em concentrações inferiores à 0,5% em larvas e a partir de 5% para fêmeas.

Através dos testes realizados foi possível reafirmar o importante potencial do óleo essencial de cravo-da-índia e do eugenol, sugerindo a utilização dos mesmos como carrapaticidas ou em associação com acaricidas sintéticos com objetivo de reduzir o impacto ambiental e o desenvolvimento de resistência. Estes compostos destacam-se diante de outras substâncias por se mostrarem seguros para o manipulador e para o animal e possuírem reduzido impacto ambiental.

Contudo, novas pesquisas deverão ser realizadas sob a perspectiva de testar os ativos em outras formulações que possam melhorar sua atividade, bem como devem ser realizados testes *in vivo* para a validação da eficiência dos ativos em condições de campo.

7 REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo-da-índia. **Revista Virtual de Química**. v.4, n.2, p.146-161, 2012.

AGNOLIN, C. A. **Avaliação dos óleos essenciais de capim limão, citronela e eucalipto no controle do carrapato**. 2012. Tese. Pós-graduação em Zootecnia, área de Produção Animal/Bovinocultura de leite. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

AGNOLIN, C. A. **Óleo de citronela no controle de ectoparasitas de bovinos**. 2009. Dissertação. Pós-graduação em Zootecnia, área de Produção Animal/Bovinocultura de leite. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C. J.; LEAL, M. L. R.; BECK, R. C. R.; MEINERZ, G. R.; PARRA, C. L. C.; MACHADO, P. R.; FOLETTTO, V.; BEM, C. M.; NICOLODI, P. R. S. J. Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**.v.12, n.4, p.482-487, 2010.

ALVES, W. V.; LORENZETTI, E. R.; GONÇALVES, F. C. Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *Rhipicephalus (boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. v.2, p.14-25, 2012.

AMERICA, E. S. O. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**. v. 8, n. 5. USA, 1972.

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinamomun zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: Caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana**. 2010. Dissertação. Pós-graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; TANAKA, A. S. **Controle do Carrapato por meio de Vacina – Situação atual e perspectivas**. Campo Grande, MS.Embrapa gado de corte. 58 p. ISBN 1517-3747, 2002.

BAJPAI V. K.; SHUKLA S.; KANG S. C.; Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Bioresource Technology**, vol. 99, 8903-8908, 2008.

BARCELOUX, D. G. **Medical Toxicology of Natural Substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals**. Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008.

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

BARRETO, C. **Dicas para começar e melhorar a sua produção**. 2008. Disponível em: http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/1,3916,1669299-1489-1,00.html. Acesso em: 12 jul 2015. 2008.

BEDOUKIAN, P. Z. **Perfumery and Flavouring Synthetics**, 3rd ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 1986.

BEADLES, M.L.; DRUMMOND, R.O.; WHETSTONE, T.M. Tropical horse tick: effects of solvents on oviposition. **Journal of Economic Entomology**. 66, p. 125-127, 1973.

BESTEN, M. A.; JASINSKI, V. C. G.; COSTA G. L. C.; NUNES, D. S.; SENS, S. L.; WISNIEWSKI JR., A.; SIMIONATTO, E. L.; RIVA, D.; DALMARCO, J. B.; GRANATO, D. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis species*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 6, 2012.

BISSINGER, B. W.; ROE, R. M. Tick repellents: Past, present, and future. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 2, p.63–79, 2010.

BLAGBURN, B. L.; LINDSAY, D. S. Ectoparasitocidas. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 50, p. 851-870, 2003.

BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H. R.; LEWIS, N. G. **Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways**. Elsevier: San Diego, CA, USA, 2008.

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

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

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

BRASIL. **Produção da pecuária municipal**. vol 42, p.1-39. IBGE. Rio de Janeiro, 2014.

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

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

BROWN H. A., MINOTT D. A., INGRAM C. W., WILLIAMS L. A. D. Biological activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal of Tropical Insect Science**. v.18: p.9–16, 1998.

BURGESS, I. F.; BROWN, C. M.; PEOCK, S.; KAUFMAN, J. **Head lice resistant topyarethroid insecticides in Britain [letter]**. *BMJ*, 311(7007):752, 1995.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência hoje**, v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997.

CASTAGNINO, G. L. B.; ORSI, R. O. Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, 2012.

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

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

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

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

CHANG, M. C.; UANG, B. J.; WU, H. L.; LEE, J. J.; HAHN, L. J.; JENG, J. H. Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: Roles of glutathione and reactive oxygen species. **British Journal of Pharmacology**, v.135, p. 619–630. 2002.

CHAUHAN, L. K. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprotruron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**., v.48, n.8, p.636-46, 2007.

CHEN, A. C.; HE, H.; TEMEYER, K. B.; JONES, S.; GREEN, P.; BARKER, S. C. A Survey of *Rhipicephalus microplus* Populations for Mutations Associated With Pyrethroid Resistance. **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 102, n. 1, p.373-380, 2009.

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

- COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 47–54, 1993.
- COLLINS, H. L.; CALLCOTT, A. M. A. Fipronil: an ultra-low-dose bait toxicant for control of red imported fire ants (*Hymenoptera*: Formicidae). **Florida Entomologist**, v. 81, n. 3, p. 407- 415, 1998.
- CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90–96, 2014.
- DAMIANI, N.; FERNÁNDEZ, N. J.; PORRINI, M. P.; GENDE, L. B.; ÁLVAREZ, E.; BUFFA, F.; BRASESCO, C.; MAGGI, M. D.; MARCANGELI, J. a.; EGUARAS, M. J. Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: Antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. **Parasitology Research**, v. 113, p.701–709, 2014.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, n. FEBRUARY, p.6938–6946, 2008.
- DE LA VEGA, R. New method for determination of viability of *Boophilus microplus* (IXODOIDEA, IXODIDAE) larvae. **Folia Parasitologica**, Prague, v.28, n.4, p.371-375, 1981.
- DE LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; DE SOUSA, B. D.; DE MORAIS, S. M.; FREITAS, S. M. Effect of stalk and leaf extracts from euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211–214, 2006.
- DE MELLO, V.; PRATA, M. C. D. A.; DA SILVA, M. R.; DAEMON, E.; DA SILVA, L. S.; GUIMARÃES, F. D. G.; DE MENDONÇA, A. E.; FOLLY, E.; VILELA, F. M. P.; DO AMARAL, L. H.; CABRAL, L. M.; DO AMARAL, M. D. P. H. Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4431–7, 2014.
- DE MONTEIRO, C. M.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA, F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. D. S.; FAZA, A.; DE CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1295–1300, 2012.
- DING, W.; LEV, D. D.; BISHOP, M. E.; LYN-COOK, L. E.; KULKARNI, R.; CHANG, C. W.; AIDOO A. Methyleugenol genotoxicity in the Fischer 344 rat using the comet assay and pathway-focused gene expression profiling. **Toxicological Sciences**, 123:103–112, 2011.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4313–4318, 2009.

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.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp.** Plant Protection Bulletin. FAO method n.º 7, v.19, p.15-18,1971.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants: module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention.** Rome: FAO, p.25–77, 2004.

FOIL, L. D.; COLEMAN, P.; EISLER, M.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GUERRERO, F. D.; JONSSON, N. N.; LANGSTAFF, I. G.; LI, A. Y.; MACHILA, N.; MILLER, R. J.; MORTON, J.; PRUETT, J. H.; TORR S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p. 163-181, 2004.

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

GARRIDO, F. A.; MARTÍNEZ, S. I.; MARTÍNEZ, V. J. L.; LÓPEZ-LÓPEZ T. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.383, p.1106-1118, 2005.

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

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. De; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. De; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, v. 23, p. 150–6, 2014.

GUERREIRO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

HARLEY, K.L.S., WILKINSON, M.A. A modification of pasture spelling to reduce acaricide treatments for cattle tick control. **Australian Veterinary Journal**, Collingwood, v.47, p.108-111, 1971.

HAZARI, M.M., MISRA, S.C. Behaviour and survival of *Boophilus microplus* larvae under outdoor conditions. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v.3, n.2, p.187-88, 1993.

HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; WAGNER, G. G.; GEORGE, J. E. Sequence analysis of the knockdown resistance-homologous regions of the para-type sodium channel gene from pyrethroid-resistance *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Columbia, v.36, n.5, p.539-543, 1999.

ISMAN, M. B.; Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 9: p. 603–608, 2000.

ISSAC, A.; GOPAKUMAR, G.; KUTTAN, R.; MALIAKEL, B.; KRISHNAKUMAR, I. M. Safety and anti-ulcerogenic activity of a novel polyphenol-rich extract of clove buds (*Syzygium aromaticum* L). **Food & function**, v. 6, p. 842–52, 2015.

JAIROCE, C. F.; TEIXEIRA, C. M.; NUNES, C. F. P.; NUNES, A. M.; PEREIRA, C. M. P.; GARCIA, F. R. M. Insecticide activity of clove essential oil on bean weevil and maize weevil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 72–77, 2016.

KEMP, D.H.; MCKENNA, R.V.; THULLNER, R.; WILLADSEN, P. **Strategies for tick control in a world of acaricide resistance**. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL; CONTROL DE LA RESISTENCIA EN GARRAPATAS Y MOSCAS DE LA IMPORTANCIA VETERINARIA Y ENFERMEDADES QUE TRANSMITEN, 1999. Jalisco, México. Proceedings. Jalisco, México: IICA, p. 1–10, 1999.

KIM, E. H.; KIM, H. K.; AHN, Y. J. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 885–889, 2003.

KNAAK, N. & FIUZA, L.M. Potencial of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5(2): p.120-132, 2010.

KOCI, J.; JEFFERY, B.; RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. In vitro safety assessment of food ingredients in canine renal proximal tubule cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 289–298, 2015.

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

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

- LORINI, I.; FILHO, A. F. Integrated pest management strategies used in stored grain in Brazil to manage phosphine resistance. **Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa)**, p. 293–300, 2007.
- MARCHIORI, C. H.; OLIVEIRA, A. T.; LINHARES, A. X. *Coleoptera* (insecta) e *Macrochelidae* (Acarina) associados a fezes de gado bovino no Estado de Goiás: constância, dominância e frequência mensal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 1, p. 49-54, 2000.
- MARQUES, A. O.; ARANTES, G. J.; SILVA, C. R. Avaliação da eficácia da ivermectina a 1% (solução injetável), no tratamento de bovinos naturalmente infestados pelo carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI:IXODIDAE) e mantidos em pastagem. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.2, p.117-119, 1995.
- MARTINAZZO, A.P. Difusividade efetiva em folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf submetidas à secagem com diferentes comprimentos de corte e temperaturas do ar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p.68-72, 2007.
- MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ Supercrítico : Desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos.** 2005. Tese. Doutorado em Engenharia de Alimentos - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de campinas, Campinas, 2005.
- MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; CASTILLO-HERRERA, G.; FLORES-FERNANDEZ, J. M.; ALVAREZ, A. H.; LUGO-CERVANTES, E. Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. p. 822-827, 2011.
- MERLINI, L.S.; YAMAMURA, M.H. Estudo in vitro da resistência de *Boophilus Microplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do norte do estado do Paraná. **Ciências Agrárias**. v.19, n.1, p.38-44, 1998.
- MICHELETTI, S. M. F. B.; DIAS, N. S.; VALENTE, E. C. N.; SOUZA, L. A.; LOPES, D. O. P.; SANTOS, J. M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**. v.19, n.1, p.44-48, 2010.
- MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Columbia, v.36, n.5, p. 533-538, 1999.
- MOHAMED, A. a; EL-EMARY, G. a; ALI, H. F. Influence of some citrus essential oils on cell viability, glutathione-s-transferase and lipid peroxidation in ehrlich ascites carcinoma cells. **In Vitro**, v. 6, n. 10, p. 820–826, 2010.

MOORE, S.J. ; LENGLET, A. N. H., Plant-based insect repellents, in: M. Debboun, S. Frances, D. Strickman (Eds.), **Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses**. CRC Press, Boca Raton, pp. 275–303, 2007.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista brasileira de farmacognosia**, vol.19, n.1b p.315-320, 2009.

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

OHSUMI, T.; HIGASHI, S.; OZUMI, K.; KUROKI, K. Study on allergic contact dermatitis of eugenol in guinea pig. **Oral Therapeutics and Pharmacology**, 15, 63–68, 1996.

OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, O. O.; OKEKE, I. N.; DAGNE, E. Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v.11, n.2, p.64-7, 2001.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

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

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of chromatography**, v. 812, n. 1-2, p. 23–33, 2004.

OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research and Technology**, v.212, n.6, p.658-60, 2001.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

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

PIMENTEL, D. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. **Environment, Development and Sustainability**, v. 7, p. 229–252, 2005.

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

POHL, P.C. **Participação dos transportadores ABC na destoxificação de acaricidas no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Tese. Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

POTARROYO S., J. H.; SOSSAI, S. **Alternativas para o controle de carrapato: vacinas e medicamentos**. Dissertação. Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, [ano]. Disponível em: http://www.simcorte.com/index/Palestras/q_simcorte/simcorte14.pdf

PRATES, H. T.; J. P. SANTOS. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados, In: Lorini, I.; L. H. Miike & V. M. Scussel (eds.). **Armazenagem de grãos**. Ed Campinas: IBG, p. 443–461, 2002.

PUGAZHVENDAN, S. R.; ELUMALI, K. Larvicidal activity of selected plant essential oil against important vector mosquitoes: Dengue vector, *aedes aegypti* (L.), malarial vector, *anopheles stephensi* (Liston) and filarial vector, *culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). **Middle East Journal of Scientific Research**, v. 18, n. 1, p. 91–95, 2013.

RAJA, M. R. C.; SRINIVASAN, V.; SELVARAJ, S.; MAHAPATRA, S. K. Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. **Pharmaceutica Analytica Acta Journal**, v. 6, n. 5, p. 367, 2015.

RAUH, J. J.; LUMMIS, S. C. R.; SATTELLE, D. B. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. **Trends in Parasitology Sciences**, v. 11, p. 325–329, 1990.

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

RIBEIRO, V. L. S. **Estudo do mecanismo de ação da atividade acaricida de *calea serrata* (asteraceae) em *Rhipicephalus (boophilus) microplus* e da sua toxicidade em roedores**. 2012. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2012. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/60960?locale=pt_BR>.

ROCHA, D.C.C. **Conhecer o ciclo biológico do carrapato-do-boi ajuda o produtor a evitar perdas**. 2011. Disponível em: <http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=3828>. Acesso em: 23 Ago 2015.

- ROTHENSTEIN, A. S.; BOOMAN, K. A.; DORSKY, J. Eugenol and clove leaf oil: A survey of consumer patch-test sensitization. **Food Chemical Toxicology**, v. 21, p. 727–733, 1983.
- SABATINI, G. A.; KEMP, D. H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 53-62, 2001.
- SAKAMOTO, C. A. M.; LOPES, W. D. Z.; BUZZULINI, C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; DE LIMA, R. C. A.; DOS SANTOS, T. R.; SANTANA, L. F.; DE MENDONÇA, R. P.; SOARES, V. E.; HENRIQUE, C. H.; COSTA, A. J. Anthelmintic efficacy of an oral formulation of Aurixazol against gastrointestinal nematodes of naturally and experimentally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 336–344, 2013.
- SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, R. A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. Efeito *in vitro* do extrato de nim (*Azadirachta indica*) e óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.34, n.2, p: 111-115, 2012
- SANTOS, T. R. B.; FARIAS, N. A. R.; FILHO, N. A. C.; PAPPEN, F. G.; JUNIOR, I. S. V. Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.1, 2009
- SARTOR, I. F.; BICUDO, P. L. Agentes empregados no controle de ectoparasitas. In: SPINOSA, H. S. *et al.* **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 47, p. 480-492.
- SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- SHARMA, A.; FLORES-VALLEJO, R. D. C.; CARDOSO-TAKETA, A.; VILLARREAL, M. L. Antibacterial Activities of Medicinal Plants Used in Mexican Traditional Medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 2016.
- SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus - resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. **Bulletin Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 389-405, 1966.
- SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D. De; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata Thunb.*). **Revista Ceres**, v. 57, p. 589–594, 2010.
- SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editoras da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. Cap 18, p. 467 – 496.

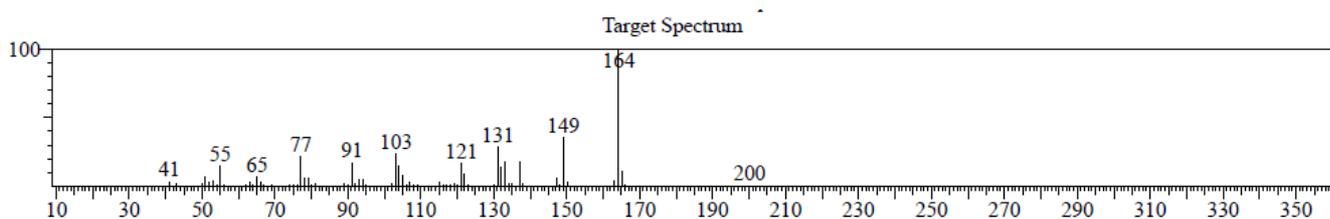
- SINGH, N. K.; JYOTI; VEMU, B.; SINGH, H.; PRERNA, M.; DAUNDKAR, P. S.; SHARMA, S. K.; DUMKA, V. K. In vitro acaricidal activity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng (Rutaceae) extracts against synthetic pyrethroid-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, 2015.
- SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press, v. 1., 1991
- SOUZA, A.P.; VEIGA, L.P.H.N.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; CARDOSO, C.P.; NUNES, A.P.O. Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de *Rhipicephalus (boophilus) microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.17, n.4, p. 242-245, 2008
- STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- STONE, B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 3, p. 563-578, 1962.
- SUDARMA, I. M.; ULFA, M. Chemical Transformation of Eugenol Isolated From Clove Oil To 4-Allyl- 2-Methoxy-6-Sulfonicphenol and 4-Allyl-2-Methoxy-6-Aminophenol. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 267–270, 2009.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3ª edição, p. 576-577, 583-584, 646-648, 651-654. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- TEPE, B.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN A. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Various Extracts of *Thymus seigii* M. Zohary et P. H. Davis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1132-1137, 2004.
- TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1-66, 2003.
- TRINDADE, H. I., ALMEIDA, K. S., FREITAS, F. L.C. 2011. Tristeza parasitária bovina – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. v 9, n.16, 2011.
- VALENTE, P. P.; AMORIM, J. M.; CASTILHO, R. O.; LEITE, R. C.; RIBEIRO, M. F. B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 113, p. 417–423, 2014.

- VILLARINO, M. A.; WAGHELA, S. D.; WAGNER, G. G. Histochemical Localization of Esterases in the Integument of the Female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Tick. **Journal of Medical Entomology**, Columbia, v. 38, n. 6, p. 780-782, 2001.
- VOSS-RECH, D.; KLEIN, C. S.; TECHIO, V. H.; SCHEUERMANN, G. N.; RECH, G.; FIORENTIN, L. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. **Ciência Rural**, v. 41(2), p. 314-320, 2011.
- WALIWITIYA, R.; KENNEDY, C. J.; LOWENBERGER, C. A.; Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci*, v. 65: p. 241–248, 2009.
- WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Ectoparasites: Pathology, Biology and Control**. 2 ed. United Kingdom: Blackwell Science, 76, p. 55-57, 65-66, 181-185. 2001.
- WHARTON, R. H.; ROULSTON, W. J. **Acaricide resistance in *Boophilus microplus* in Austrália**. In: WORKSHOP ON HEMOPARASITES (ANAPLASMOSIS AND BABESIOSIS), 1975, Cali, Colombia. Proceedings... Bogotá: Centro Internacional de Agricultura Tropical, v.2. p. 73-92, 1977.
- WHO - World Health Organization Regional Office for the Western Pacific. **Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines**. Manila: WHO, 1998.
- WHO - World Health Organization. **Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants; Twenty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**, WHO Technical Report Series, No. 683; Geneva, Switzerland, 1982.
- YANG, Y. C.; LEE, S. H.; LEE, W. J.; CHOI, D. H.; AHN, Y. J. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4884–4888, 2003.
- YU, Z.; WANG, H.; WANG, T.; SUN, W.; YANG, X.; LIU, J. Tick-borne pathogens and the vector potential of ticks in China. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1–8, 2015.
- ZERINGÓTA, V.; SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; FAZA, A. P.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A.; MONTEIRO, C. M. O.; CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 112(7), p. 2675-9, 2013.
- ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, p. 192–201, 2004.
- ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*). **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 999–1003, 1992.

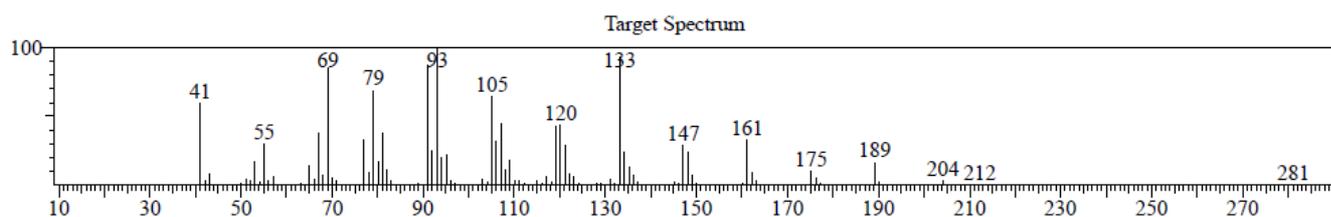
APÊNDICE A

ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS
PRESENTE NO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA.

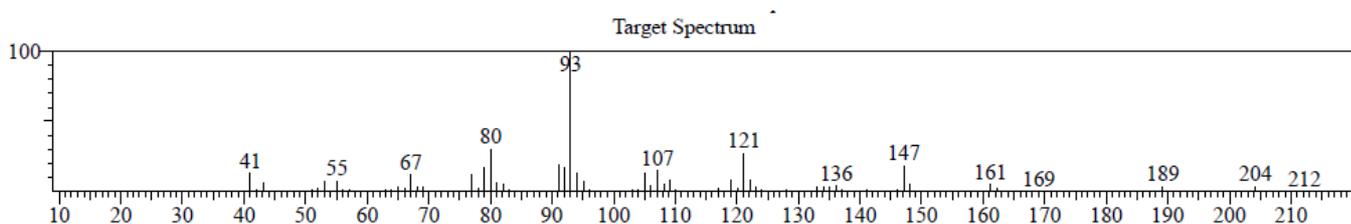
Espectro 01: Eugenol



Espectro 02: Cariofileno



Espectro 03: Humuleno



Espectro 04: Acetato de eugenol

