

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

Camila de Carvalho Delmonte

Avaliação da atividade carrapaticida do timol incorporado a duas formulações de uso tópico sobre estágios imaturos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae)

Juiz de Fora

2017

Camila de Carvalho Delmonte

Avaliação da atividade carrapaticida do timol incorporado a duas formulações de uso tópico sobre estágios imaturos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae)

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

Orientador: Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto

Juiz de Fora

2017

Camila de Carvalho Delmonte

Avaliação da atividade carrapaticida do timol incorporado a duas formulações de uso tópico sobre estágios imaturos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata
Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, MG

Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares
Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

Dedico essa dissertação ao meu companheiro Bruno,
que me ensina, dia após dia, a diferença entre conhecimento e sabedoria,
e me oferece amor e apoio incondicionais.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ser meu refúgio e minha fortaleza.

Ao meu orientador Prof. Dr. Erik Daemon pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos e vivenciar uma outra face da medicina veterinária. Por me conduzir com sabedoria, respeitando minha individualidade, e me conceder autonomia e liberdade para desenvolver este trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

À minha co-orientadora Prof. Dra Maria da Penha Henriques do Amaral, por acreditar no meu potencial quando eu ainda nem cogitava este mestrado. Pelos inúmeros conselhos, ensinamentos e o apoio decisivo. Nossas conversas sempre foram como um bálsamo para mim.

Aos amigos Valéria de Mello e Felipe Ferreira, do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFJF, por me conduzirem por um mundo totalmente novo, me ensinando e me auxiliando, sempre com bom humor e boa vontade.

À amiga Paula Barroso, pelo exemplo de perseverança e pela parceria fundamental.

Aos professores Dr. Rodrigo Fabri e Dra. Marta D'Agosto, pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao meu eterno mestre Paulo Theodomiro Santos Lima Júnior, que fez de mim uma médica veterinária honrada e pensante.

À minha família, que me ensinou o valor do estudo e do trabalho. Que ao se orgulhar de mim, me faz querer ser melhor para ser merecedora. Em especial aos meus pais Iêda e John Boswell, Geraldo Muanis, Paulo e Cirene Frizeiro - sim, tenho vários! - à minha avó Helena e meus irmãos Bárbara Delmonte e Rafael Cavalieri.

A minha outra família, de quatro patas, que me ensina todos os dias sobre comportamento animal e sobre a arte de viver: Chico, Zeca, Chiquinha, Tom, Mafix, Mel e Leona (*in memorian*).

Ao meu amor e melhor amigo, Bruno Frizeiro, pelo apoio, paciência, carinho e até ajuda prática nos meus experimentos. Você redefiniu para mim a palavra companheirismo. Este título também é seu.

E aos membros presentes na banca de defesa, por cederem seu tempo e conhecimento para enriquecer este trabalho.

*"I am only one; But still I am one. I cannot do everything; But still I can ... I will not
refuse to do something that I can do."*

Edward Everett Hale

RESUMO

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.) é um carrapato de conhecida importância médico-veterinária, devido ao seu potencial na transmissão de patógenos e aos danos diretos aos hospedeiros, como espoliação sanguínea, estresse, alergias e dermatites. O controle desses parasitos baseia-se, principalmente, no uso de substâncias químicas sintéticas, que frequentemente trazem conseqüências como contaminação ambiental, intoxicação dos animais e seus tratadores, e seleção de linhagens de carrapatos resistentes. O timol, um monoterpene aromático isolado inicialmente de plantas da família *Lamiaceae*, vem apresentando bons resultados no controle de *R. sanguineus s.l.* em testes *in vitro*. Para que seja utilizado como um carrapaticida, o timol necessita ser veiculado em uma formulação farmacêutica adequada, que apresente facilidade de aplicação, custo acessível e segurança para uso tópico. O objetivo deste trabalho foi avaliar, pela primeira vez, a atividade carrapaticida *in vitro* de duas formulações de uso tópico contendo diferentes concentrações de timol, sobre larvas e ninfas, ingurgitadas e não ingurgitadas, de *Rhipicephalus sanguineus s.l.*. Para tal, foram desenvolvidas duas formulações-base: uma emulsão óleo em água (O/A) e uma solução hidroalcoólica, contendo diferentes concentrações de timol (0,5 mg/mL a 20 mg/mL). Para os bioensaios foi adotado o teste de pacote de larvas modificado, no caso de larvas e ninfas não ingurgitadas, com avaliação da mortalidade após 24 horas; e o teste de imersão, para larvas e ninfas ingurgitadas, com avaliação da mortalidade após 15 dias. O grupo controle constituiu-se das formulações-base, sem timol. Foram feitas 10 repetições para cada tratamento. Nos testes com emulsão, foi alcançada taxa de mortalidade média de 94,2% com a concentração de 0,75 mg/mL em larvas não ingurgitadas. No caso de larvas ingurgitadas, houve mortalidade média de 95,0% na concentração de 5,0 mg/mL. Ninfas não ingurgitadas tratadas com a emulsão a 2,5 mg/mL atingiram taxa de mortalidade média de 83,3% e no teste com ninfas ingurgitadas, foi verificada média de 86,0% de mortalidade para a concentração de 5,0 mg/mL. Nos testes com a solução hidroalcoólica, a mortalidade média encontrada para larvas não ingurgitadas foi de 88,1% para a concentração de 2,5 mg/mL. Para larvas ingurgitadas, a maior taxa de mortalidade verificada foi de 25,0%, na concentração de 20 mg/mL; o teste com ninfas não ingurgitadas apresentou taxas de mortalidade de 91,0% na concentração de 1,0 mg/mL e no teste com ninfas ingurgitadas verificaram-se baixas taxas de mortalidade, com o valor máximo de 18,3% para 20 mg/mL. Além dos testes em carrapatos, foram realizados testes

de estabilidade preliminar com o objetivo de verificar eventuais problemas nas formulações. A solução hidroalcoólica mostrou-se estável em todas as condições testadas, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/ml; a emulsão O/A mostrou sinais de instabilidade precoce na concentração de 5,0 mg/ml, porém, na concentração de 2,5 mg/ml apresentou-se estável. Os resultados obtidos indicaram que o timol, quando incorporado às formulações propostas, apresentou aumento de sua atividade acaricida sobre larvas não ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. tratadas topicamente, quando comparado aos dados da literatura; e embora tenha havido variações na toxicidade entre diferentes estágios e formas (ingurgitadas/não ingurgitadas), estas formulações parecem ser promissoras para um futuro uso terapêutico.

Palavras-chave: carrapato-vermelho-do-cão, monoterpeneo, larvas, ninfas, emulsão, solução hidroalcoólica.

ABSTRACT

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.) is a tick with known medical and veterinary importance, due to its potential for transmission of pathogens as well as the direct damage caused to hosts, such as blood spoliation, stress, allergies and dermatitis. Control of these parasites is mainly based on the use of synthetic chemical substances, but these often have negative consequences, including environmental contamination, intoxication of animals and handlers/owners, and selection of resistant strains. Thymol, an aromatic monoterpene initially isolated from plants of the family *Lamiaceae*, has presented good results in controlling *R. sanguineus s.l.* in *in vitro* tests. For use as an acaricide, thymol needs to be carried in a suitable pharmaceutical formulation, allowing easy application, reasonable cost and safety for topical use. The objective of this work was to assess, for the first time, the *in vitro* acaricidal activity of two topical formulations, each with different concentrations of thymol, on larvae and nymphs, both engorged and non-engorged, of *R. sanguineus sensu lato*. For this purpose, two base formulations were prepared: an oil-in-water (O/W) emulsion and a hydroalcoholic solution, containing different thymol concentrations (0.5 mg/mL to 20 mg/mL). The formulations were analyzed by the larval packet test (modified) in the case of larvae and non-engorged nymphs, with evaluation of mortality after 24 hours; and by the immersion test for larvae and engorged nymphs, with evaluation of mortality after 15 days. The control group was exposed to the base formulations without thymol. There were ten repetitions of each treatment. In the tests with the emulsion, the best average mortality rate was 94.2%, with the concentration of 0.75 mg/mL for non-engorged larvae. In the case of the engorged larvae, the best average mortality was 95.0% at the concentration of 5.0 mg/mL. The average mortality of the non-engorged nymphs treated with the emulsion containing 2.5 mg/mL was 83.3% and in the test with engorged nymphs, the mean mortality was 86.0% for the concentration of 5.0 mg/mL. In the tests with the hydroalcoholic solution, the highest average mortality among the non-engorged larvae was 88.1% for the concentration of 2.5 mg/mL. In turn, for the engorged larvae, the highest mortality was 25.0%, at the concentration of 20 mg/mL, while the test with non-engorged nymphs produced a mortality rate of 91.0% at the concentration of 1.0 mg/mL and in the test with engorged nymphs the maximum mortality was 18.3% with a concentration of 20 mg/mL. Besides the tests with the ticks, preliminary stability tests were carried out to verify possible problems with the formulations. The hydroalcoholic solution remained stable

under all the conditions analyzed, at concentrations of 2.5 and 5.0 mg/ml, while the O/W emulsion showed signs of early instability at the concentration of 5.0 mg/ml but not at the concentration of 2.5 mg/ml. The results obtained indicate that the acaricidal activity of thymol, when included in the proposed formulations, was enhanced against non-engorged larvae with topical treatment in comparison with data in the literature. Although there were variations in toxicity between the different stages and forms (engorged and non-engorged), these formulations are promising for future therapeutic use.

Keywords: Brown dog tick, monoterpene, larvae, nymphs, emulsion, hydroalcoholic solution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes estágios de vida de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.....	15
Figura 2 – Estrutura química do timol.....	20
Figura 3 – Teste de pacote de larvas.....	29
Figura 4 – Teste de imersão.....	30
Figura 5 – Testes de estabilidade das formulações.....	32
Figura 6 – Desenvolvimento das formulações.....	33
Figura 7 – Formulação com sinais de instabilidade (coalescência) após centrifugação inicial.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxas de mortalidade apresentadas em artigos anteriores referentes a tratamentos de diferentes estágios de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. com timol diluído em solventes convencionais.....	21
Tabela 2 – Composição da emulsão O/A e estudo crítico de seus componentes..	26
Tabela 3 – Composição da solução hidroalcoólica e estudo crítico de seus componentes.....	27
Tabela 4 – Taxas de mortalidade (média ± DP) de estágios imaturos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. tratados com emulsão O/A contendo timol incorporado.....	34
Tabela 5 - Taxas de mortalidade (média ± DP) de estágios imaturos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. tratados com solução hidroalcoólica contendo timol incorporado.....	35
Tabela 6 - Resultados da análise sensorial, centrifugação e pHmetria da emulsão e solução hidroalcoólica, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL, no teste de estabilidade acelerada.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Importância de <i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i>	14
2.2 Considerações sobre a anatomia e fisiologia de carrapatos ixodídeos.....	16
2.3 Controle de carrapatos.....	17
2.3.1 Controle com substâncias sintéticas.....	17
2.3.2 Controle com substâncias de origem vegetal.....	18
2.4 Timol.....	20
2.5 Desenvolvimento de formulações.....	22
2.6 Estabilidade de formulações.....	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Local dos experimentos.....	26
4.2 Desenvolvimento das formulações.....	26
4.3 Obtenção dos carrapatos.....	27
4.4 Bioensaios.....	28
4.4.1 Teste de pacote de larvas.....	28
4.4.2 Teste de imersão.....	29
4.5 Análise dos dados.....	30
4.6 Testes de estabilidade preliminar das formulações.....	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Desenvolvimento das formulações.....	33
5.2 Avaliação da atividade carrapaticida <i>in vitro</i>	33
5.3 Testes de estabilidade preliminar.....	35
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES GERAIS	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Latreille, 1806), o “carrapato-vermelho-do-cão”, apresenta ampla distribuição mundial e tem como principais hospedeiros os canídeos (LABRUNA, 2004; GUGLIELMONE et al, 2006; DANTAS-TORRES, 2008). Sua importância médica e veterinária está relacionada principalmente à transmissão de agentes patogênicos aos cães e aos humanos, mas também aos danos diretos relacionados ao parasitismo (DANTAS-TORRES, 2008; SERRA-FREIRE et al, 2011).

O controle destes parasitos normalmente é realizado com o uso de substâncias químicas sintéticas. No entanto, a seleção de populações de carrapatos resistentes devido ao seu uso indiscriminado (COLES & DRYDEN, 2014; MILLER, 2001), as intoxicações dos animais e seus tratadores (ANDRADE, 2004) e a possibilidade de contaminação do meio ambiente com resíduos destas substâncias (BONMATIN et al, 2015; SANDERSON et al, 2007) vêm aumentando a demanda por produtos carrapaticidas mais seguros. Além disso, a crescente relação de proximidade entre humanos e animais domésticos, sendo os cães muitas vezes considerados como membros da família, torna ainda mais importante o controle eficaz de parasitos e a segurança das substâncias utilizadas, a fim de não comprometer a saúde dos pets e de seus tutores. Assim, nos últimos anos, vem sendo desenvolvidas pesquisas que avaliam o potencial de substâncias derivadas de plantas para o controle de pragas (CHAGAS, 2004; REGNAULT-ROGER & PHILOGÉNE, 2008; BORGES et al, 2011; ELLSE & WAL, 2014).

Dentre as substâncias de origem vegetal já testadas está o timol, um monoterpene aromático isolado inicialmente de plantas da família Lamiaceae. Esta substância vem apresentando resultados promissores quanto ao seu potencial acaricida em várias espécies de carrapatos (NOVELINO et al, 2007; MONTEIRO et al, 2010; MENDES et al, 2011; DAEMON et al, 2012; MATOS et al, 2014; ARAÚJO et al, 2015; NOVATO et al, 2015).

Para que uma substância química seja utilizada para fins terapêuticos, frequentemente faz-se necessária sua incorporação a uma formulação que torne esta aplicação viável e não comprometa sua eficácia (YORK, 2005). Assim, o presente trabalho visou avaliar a viabilidade de incorporação do timol a duas formulações de contato magistrais, sua atividade carrapaticida *in vitro* contra estágios imaturos de *R. sanguineus s.l.* e a sua estabilidade de curto prazo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DE *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

Rhipicephalus sanguineus sensu lato é um carrapato ixodídeo que parasita principalmente os canídeos, mas pode ser encontrado parasitando outras espécies de mamíferos, aves e até humanos (DANTAS-TORRES et al, 2006; LOULY et al, 2006, MATURANO et al, 2015). Esta espécie é originária da África e acredita-se que, devido à estreita ligação dos cães com os humanos, este parasito foi disseminado durante os processos de migração humana (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES, 2008; PAZ et al, 2008).

Além dos danos diretos relacionados ao parasitismo, como espoliação sanguínea, desconforto e reações alérgicas, também pode atuar como vetor de patógenos como *Babesia spp*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* para os cães (DANTAS-TORRES, 2008; PAZ et al, 2008; DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2014) e, no Brasil, é considerado um vetor em potencial da bactéria *Rickettsia rickettsii* para humanos (SERRA-FREIRE et al, 2011). O status taxonômico dessa espécie ainda carece de consenso. Nos últimos anos, foram evidenciadas diferenças genéticas, morfológicas e epidemiológicas em indivíduos da espécie nas diferentes regiões do mundo e, diante da dificuldade na determinação do neótipo *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*, ficou estabelecido que a denominação mais indicada ao se referir a indivíduos deste complexo é *Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.)*. Até o momento, considera-se a existência de duas linhagens distintas da mesma espécie: uma de regiões tropicais da América do Sul e África, e uma de regiões temperadas da América do Sul e Europa Ocidental. (NAVA et al, 2015; HEKIMOĞLU et al, 2016).

Figura 1. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em diferentes estágios de vida.



Em sentido horário, a partir do alto: ninfa, fêmea, larva e macho.

Fonte: Parasite Image Database (National Center of Veterinary Parasitology) (2017). Disponível em <http://ncvptest.weebly.com/ticks.html>

Esta espécie é considerada trióxena, ou seja, depende de três hospedeiros para completar seu ciclo biológico. Este é constituído por fases parasitárias intercaladas com fases não parasitárias, de modo que cada estágio (larva, ninfa e adulto) necessita de um hospedeiro para se alimentar e realiza o processo de muda e a ecdise no ambiente (LABRUNA, 2004). Esta característica de sua biologia favorece a transmissão de patógenos, já que um mesmo carrapato, ao se alimentar em mais de um hospedeiro, pode agir como vetor e reservatório de agentes patogênicos (DANTAS-TORRES, 2008).

Após alimentar-se de sangue, cada fêmea deposita em torno de 4000 ovos no ambiente, e morre em seguida. Os locais preferidos para a deposição dos ovos são rachaduras e frestas em paredes, geralmente próximas aos locais onde os cães se deitam. Ao eclodirem, as larvas – que são dotadas de três pares de pernas - começam a busca por um hospedeiro, onde irão alimentar-se de sangue por três a 10 dias. Quando estão completamente ingurgitadas, se desprendem e caem no ambiente para realizar a primeira muda. Este processo pode levar de cinco a 15 dias, e dará origem a uma ninfa – dotada de quatro pares de pernas, ainda sem dimorfismo sexual – que buscará um hospedeiro e, após três a 11 dias se alimentando de sangue, cairá no ambiente para sua última muda. Esta leva de nove a 47 dias e tem como resultado a formação de um adulto, maior em tamanho, dotado de quatro pares de pernas, e com dimorfismo sexual (DANTAS-TORRES, 2008).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ANATOMIA E FISIOLOGIA DE CARRAPATOS IXODÍDEOS

Como todos os artrópodes, os carrapatos são revestidos externamente pelo tegumento quitinoso, ao qual são atribuídas funções de cobertura do corpo, proteção contra perda de água, reserva energética e a função de exoesqueleto, conferindo proteção mecânica contra danos físicos (SONENSHINE, 1991; HACKMAN & FILSHIE, 1982). A cutícula é a porção mais externa do tegumento, secretada pelas células epidérmicas. A maior parte dessa estrutura, definida por Hackman e Filshie (1982) como uma “membrana não celular heterogênea”, está disposta na cobertura externa do corpo do carrapato; no entanto, há evidências de que esta se estende pelo interior do corpo em determinados pontos de comunicação com o sistema traqueal e com os ductos das glândulas dermais. Sua densidade não é uniforme ao longo de toda a superfície externa do carrapato, de modo que há áreas mais delgadas, principalmente encontradas em pontos de articulações, e áreas mais espessas e endurecidas. A constituição química da cutícula ainda é uma questão controversa, no entanto admite-se que esta seja composta principalmente por lipídeos, polifenóis, proteínas e quitina (LEES, 1948, HACKMAN & FILSHIE, 1982).

Acredita-se que as ceras presentes na camada mais externa da cutícula, chamada epicutícula, sejam secretadas pelas glândulas dermais, sendo drenadas através de poros até a superfície (SONENSHINE, 1991). Esta secreção ocorre mais intensamente durante e imediatamente após o repasto ou após exposição à injúria pela luz, calor ou irritação mecânica, e é mais evidente em ninfas e fêmeas (LEES, 1947). Sua função já foi apontada como proteção contra o dessecamento dos carrapatos (SONENSHINE, 1991).

Sabe-se que a maior parte da perda de água nos carrapatos ocorre através da cutícula, e a camada de lipídeos presente nesta estrutura desempenha importante função na regulação deste fenômeno. Esta atividade parece funcionar por meio de um controle fisiológico, como demonstrado pela regeneração da camada de lipídeos da epicutícula de carrapatos após serem produzidas lesões artificiais por abrasão (LEES, 1947) e por mudanças nas proporções de lipídeos durante o processo de engurgitamento e de muda (HACKMAN & FILSHIE, 1982). Já foi verificado que determinadas substâncias, como por exemplo detergentes, quando aplicadas sobre a superfície da cutícula de carrapatos, podem aumentar a taxa de transpiração dos mesmos, levando a maior perda de água (LEES, 1947).

Larvas e ninfas de ixodídeos já foram citadas como sendo mais susceptíveis à perda de água do que adultos (KNÜLE & RUDOLPH, 1982). Além das perdas de água que ocorrem através do tegumento corporal, há ainda aquela decorrente das trocas gasosas do processo de respiração (SONENSHINE, 1991). Carrapatos ixodídeos possuem sistema respiratório constituído por espiráculos e traquéia. As larvas, entretanto, não apresentam estas estruturas e realizam suas trocas gasosas exclusivamente através da cutícula (HACKMAN & FILSHIE, 1982). Ninfas e adultos possuem espiráculos e traquéia e são dotadas de um mecanismo valvular de fechamento dos espiráculos, de modo que apresentam mais de um controle fisiológico para prevenir a perda de água para o ambiente (NEEDHAM & TEEL, 1991). O controle da abertura e fechamento dos espiráculos já foi relacionado ao status de equilíbrio hídrico do animal, e segundo Sonenshine (1991), carrapatos ingurgitados seriam incapazes de manter o fechamento do sistema respiratório, perdendo água mais rapidamente.

Camargo et al (2012) observaram aumento dos efeitos acaricidas de formulações contendo fungos acaripatogênicos contra diferentes estágios de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), diante da adição de óleo mineral a essas formulações, em comparação ao uso de suspensão aquosa para aplicação dos fungos, sugerindo que, devido às propriedades quitinofílicas do óleo, há maior aderência do agente acaricida no tegumento dos carrapatos. Além disto, os autores apontaram a possibilidade de haver diferenças na susceptibilidade ao óleo mineral nos diferentes estágios de vida dos carrapatos, com maior susceptibilidade de larvas não-ingurgitadas em relação a fêmeas ingurgitadas.

Chagas et al (2003) comprovaram o aumento de toxicidade de alguns solventes sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus* na presença de azeite de oliva, um óleo vegetal, indicando a importância de agentes lipofílicos como promotores de permeação.

2.3 CONTROLE DE CARRAPATOS

2.3.1 Controle com substâncias sintéticas

Atualmente o controle de carrapatos em cães se baseia no uso regular de substâncias químicas sintéticas, que têm alto custo e longo período de desenvolvimento (GRAF et al, 2004). Os produtos podem ter efeito curativo (que combatam as infestações vigentes) e/ou efeito preventivo (que eliminem os carrapatos ao primeiro contato, antes que uma infestação se estabeleça); um produto que atue nas duas frentes oferece maior chance de

sucesso a longo prazo e reduz o risco de transmissão de doenças pelos carrapatos (BEUGNET & FRANC, 2012).

Além do uso de carrapaticidas nos cães, é importante que seja realizado o tratamento do ambiente, de modo a atingir todas as fases de vida do parasito, inclusive aquelas que estão em período de muda (COLES & DRYDEN, 2014, DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2014).

Os principais grupos químicos utilizados hoje para controle de carrapatos em cães são organofosforados, carbamatos, formamidinas, piretróides, fenilpirazóis e lactonas macrocíclicas (BEUGNET & FRANC, 2012). Dentre estes, já foram relatados no meio científico casos de resistência de *R. sanguineus s.l.* ao amitraz, coumafós, cipermetrina e deltametrina (MILLER et al, 2001; BORGES et al, 2007). Eventualmente verificam-se queixas por parte dos tutores de cães quanto a resistência de outras bases químicas; no entanto, a falha muitas vezes está associada ao uso incorreto dos produtos carrapaticidas, como intervalos muito longos entre as aplicações, uso de doses incorretas, equívocos na escolha da base química a ser utilizada, aplicação incorreta e armazenagem em condições inadequadas (COLES & DRYDEN, 2014).

Além da seleção de populações de carrapatos resistentes, os carrapaticidas sintéticos despertam preocupações quanto à sua segurança para os animais e seus tratadores, além da possibilidade de contaminação do meio ambiente com seus resíduos.

2.3.2 Controle com substâncias de origem vegetal

Óleos essenciais são substâncias derivadas do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Apresentam composição complexa e variável, são líquidos, voláteis e caracterizados por seu forte odor. São extraídos por meio de destilação e utilizadas pelos humanos desde tempos remotos por seus efeitos medicinais, cosméticos e conservantes (BATISH et al, 2008).

Nas plantas, podem apresentar funções de proteção, repelindo predadores e combatendo parasitos, mas também podem atuar como atrativos para insetos polinizadores. (BAKKALI et al, 2008). São metabolizados em todos os órgãos vegetais, e são encontrados em plantas das famílias Myrtaceae e Lamiaceae, dentre outras (TRIPATHI et al, 2009). A composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com a genética da planta, o local da colheita, a estação do ano, a parte utilizada da planta e o método de destilação. De modo geral, são compostos por duas ou três

substâncias principais, em maiores concentrações (geralmente terpenos e terpenóides), que determinam suas propriedades biológicas, e outras substâncias aromáticas em menor quantidade (BAKKALI et al, 2008; TRIPATHI et al, 2009).

Devido a sua composição complexa, os óleos essenciais podem atuar em diversos sítios de ação ao mesmo tempo, o que torna mais difícil o processo de seleção de resistência ou adaptação dos organismos-alvo (BAKKALI et al, 2008). Além disso, apresentam menor toxicidade para mamíferos quando comparados a muitas substâncias sintéticas utilizadas no controle de pragas e menor persistência de resíduos no ambiente (ISMAN, 2000; GEORGE et al, 2014). Por se tratarem muitas vezes de substâncias amplamente estudadas e já utilizadas em outras áreas da ciência, como em alimentos e cosméticos, apresentam vantagens como o custo mais acessível (muitos de seus constituintes já estão disponíveis comercialmente, com elevado grau de pureza), maior facilidade para registro de produtos, além de serem oriundas de fontes renováveis (ISMAN, 2000; TRIPATHI et al, 2009).

Diversos estudos já evidenciaram a atividade acaricida de óleos essenciais sobre carrapatos ixodídeos (CLEMENTE et al, 2010; SANTOS & VOGEL, 2012; GOMES et al, 2014; MELLO et al, 2014; HÜE et al, 2015; CAMPOS et al, 2015; CHAGAS et al, 2016).

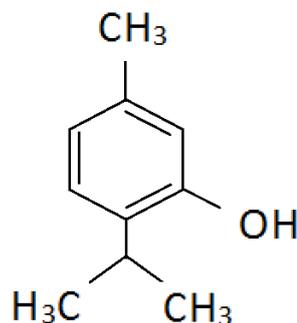
Uma das maiores limitações para o uso de produtos extraídos de plantas no controle de pragas é sua eficácia variável, observada diante das frequentes variações na composição dos mesmos (BATISH et al, 2008; GEORGE et al, 2014). Como já foi dito, a composição química dos óleos essenciais pode variar devido a vários fatores – genéticos, geográficos, climáticos, métodos de extração, parte utilizada da planta, entre outros - afetando sua bioatividade. Uma possível solução para esta questão é o uso de seus componentes bioativos isolados.

Os terpenos representam a classe mais abundante de bioativos isolados de plantas aromáticas, e são classificados de acordo com o número de moléculas de isopreno presentes em sua estrutura. Cada molécula de isopreno contém cinco carbonos. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais observados são os monoterpenos (com 10 carbonos) e os sesquiterpenos (com 15 carbonos) (Dubey et al., 2003).

2.4 TIMOL

O timol é um monoterpreno formado por duas unidades de isopreno, totalizando 10 carbonos em sua estrutura (BAKKALI et al, 2008). Inicialmente isolado do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Lamiaceae), apresenta-se sob a forma de cristais incolores, que possuem odor característico. Sua aplicação terapêutica mais comum é como antisséptico bucal (PRIESTLEY et al, 2003).

Figura 2 – Estrutura química do timol.



Fonte: o autor (2017)

Esta substância vem sendo estudada há alguns anos por seus efeitos bactericida, fungicida, nematocida, moluscicida, acaricida, inseticida e antioxidante (YANISHLIEVA et al, 1998; CARVALHO et al, 2003; FLORIS et al, 2004; BOTELHO et al, 2007; FERREIRA et al, 2011; NTALLI et al, 2011; VASCONCELOS et al, 2014), e foi classificado como uma substância segura pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1993). Foi verificado também que o timol se dissipa rapidamente no meio ambiente, deixando poucos resíduos (HU e COATS, 2008).

O efeito acaricida do timol já foi amplamente comprovado em diversas espécies de carrapatos, como *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus s.l.* (NOVELINO et al, 2007; DAEMON et al, 2009, MONTEIRO et al, 2009; MONTEIRO et al, 2010; MENDES et al, 2011; SCORALIK et al, 2012; DAEMON et al, 2012; MATOS et al, 2014; ARAÚJO et al, 2015; NOVATO et al, 2015).

Embora ainda não se conheça seu exato mecanismo de ação sobre os carrapatos, há evidências indicando sua ação sobre o sistema reprodutor de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus s.l.* (MATOS et al, 2014).

As pesquisas sobre a atividade acaricida do timol sobre *R. sanguineus s.l.* tem mostrado resultados promissores. Ao tratar larvas não ingurgitadas de *R. sanguineus s.l.* com timol nas concentrações de 2,5 a 20,0 mg/ml, solubilizado em solução aquosa de DMSO 1%, Daemon et al (2009) registraram taxas de mortalidade máximas de 37,7%, para a maior concentração testada. Posteriormente, ao tratar larvas não ingurgitadas com timol nas mesmas concentrações, porém diluído em água com etanol 50%, Daemon et al (2012) registraram taxas de mortalidade de 96,7%, 95,9 e 98,1% para as concentrações de 10,0, 15,0 e 20,0 mg/ml, respectivamente.

Em testes com larvas ingurgitadas de *R. sanguineus s.l.* tratadas com timol nas mesmas concentrações, solubilizado em água com etanol 50%, Daemon et al (2009) verificaram taxas de mortalidade de 97% e 100,0%, para as concentrações de 15,0 e 20,0 mg/ml.

Ninfas não ingurgitadas de *R. sanguineus s.l.* já foram desafiadas por Senra et al (2013) com timol em solução hidroalcoólica de etanol 50%, registrando taxas de mortalidade de 100,0% para todas as concentrações testadas (2,5 mg/ml a 20,0 mg/ml).

Ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus s.l.*, quando tratadas com timol solubilizado em água e DMSO 1% nas mesmas concentrações, apresentaram taxas de mortalidade de 100%, a partir da concentração de 5,0 mg/ml (MONTEIRO et al, 2009).

Tabela 1: Taxas de mortalidade apresentadas em artigos anteriores referentes a tratamentos de diferentes estágios de *Rhipicephalus sanguineus* com timol diluído em solventes convencionais.

	Larvas não ingurgitadas (Daemon et al, 2009)	Larvas não ingurgitadas (Daemon et al, 2012)	Larvas ingurgitadas (Daemon et al, 2009)	Ninfas não ingurgitadas (Senra et al, 2013)	Ninfas ingurgitadas (Monteiro et al, 2009)
Solvente	DMSO 1%	Etanol 50%	DMSO 1%	Etanol 50%	DMSO 1%
CONTROLE	7,9±5,0 ^a	0,6±1,0 ^a	3,0±6,7 ^a	2,0±6,3 ^a	0,0±0,0 ^a
2,5 mg/mL	21,3±16,7 ^b	47,5±11,6 ^b	3,0±4,8 ^a	100,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^a
5,0 mg/mL	17,4±7,2 ^b	50,2±14,0 ^b	0,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^b	100,0±0,0 ^b
10,0 mg/mL	19,1±1,9 ^b	96,7±2,6 ^c	3,0±4,8 ^a	100,0±0,0 ^b	100,0±0,0 ^b
15,0 mg/mL	32,1±7,9 ^c	95,9±2,5 ^c	97,0±6,7 ^b	100,0±0,0 ^b	100,0±0,0 ^b
20,0 mg/mL	37,7±13,4 ^c	98,1±3,5 ^c	100,0±0,0 ^b	100,0±0,0 ^b	100,0±0,0 ^b

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Fontes: Daemon et al, 2009; Monteiro et al, 2009; Daemon et al, 2012; Senra et al, 2013.

2.5 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES

Para que uma substância seja utilizada para fins terapêuticos, muitas vezes faz-se necessária sua incorporação a uma formulação farmacêutica, associando-a a outros componentes, de modo que se obtenha um produto estável, eficaz, de fácil aplicação e com características organolépticas que facilitem sua aceitação pelo consumidor (YORK, 2005; ALLEN et al, 2007). O ramo da ciência que trata da preparação de produtos farmacêuticos é a farmacotécnica (FERREIRA et al, 2008).

Fármaco ou princípio ativo é a substância responsável pela ação terapêutica da formulação (FERREIRA et al, 2008). Os adjuvantes farmacêuticos ou excipientes são substâncias não-medicinais como espessantes, solventes, promotores de permeação, conservantes e diluentes, adicionados durante o preparo de uma formulação; seu uso resulta na obtenção dos diversos tipos de formas farmacêuticas e confere características físico-químicas específicas a elas (ALLEN et al, 2007).

As formas farmacêuticas possibilitam o uso do princípio ativo nas doses adequadas, protegem o fármaco das influências ambientais, ocultam características indesejáveis como odor ou sabor repugnantes, permitem a veiculação de substâncias pouco solúveis ou instáveis e permitem a ação controlada do fármaco e sua aplicação de acordo com o local de ação desejado (ALLEN et al, 2007).

As principais formas farmacêuticas adotadas em carrapaticidas para pequenos animais são pós, shampoos, loções (emulsões), sprays (soluções hidroalcoólicas), sabonetes, tabletes palatáveis, soluções spot-on e coleiras de polímeros plásticos impregnadas com o princípio ativo (BEUGNET & FRANC, 2012).

Quando uma substância passa a ser estudada para determinada aplicação terapêutica, são aplicados estudos de formulação para estabelecer as características iniciais do produto, e qual será sua forma farmacêutica. Na sequência, o produto é submetido a testes progressivos de ensaios pré-clínicos (testes *in vitro*) e clínicos, de modo que este tenha sua eficácia e segurança comprovadas antes de seu registro e comercialização (BARRY, 2005; ALLEN et al, 2007).

Emulsão é uma forma farmacêutica constituída pela mistura de dois ou mais líquidos imiscíveis, de modo que há uma fase interna, dispersa na forma de glóbulos e outra externa, contínua (BILLANY, 2005b). Para o seu preparo são utilizados agentes emulsificantes ou surfactantes, substâncias que apresentam propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, e constituirão a interfase responsável pela manutenção da estabilidade dessa

mistura (ATTWOOD, 2005). As emulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), sendo a primeira fase dispersa e a segunda contínua. Nas emulsões O/A, há gotículas de óleo dispersas numa fase contínua de água; nas emulsões A/O, há gotículas de água dispersas numa fase contínua de óleo.. Dentre as vantagens desta forma farmacêutica destacam-se a possibilidade de administração de princípios ativos insolúveis em outros veículos, disfarçar das características organolépticas de determinados fármacos, melhorando sua aceitação, aumentar a sua estabilidade e oferecer fácil aplicação e remoção do produto da pele (ALLEN et al, 2007).

Soluções hidroalcoólicas são preparações líquidas homogêneas contendo uma ou mais substâncias dissolvidas em uma mistura de água e etanol; seu preparo, na maioria das vezes, requer apenas a mistura do soluto com o solvente (BILLANY, 2005a; ALLEN et al, 2007). Dentre as vantagens desta forma farmacêutica, destacam-se a imediata disponibilidade do fármaco para absorção, levando a rápida resposta terapêutica, a distribuição uniforme e homogênea do fármaco na preparação e sua rápida evaporação após ser aplicado sobre a pele, conferindo efeito refrescante e deixando a pele seca (BILLANY, 2005a).

2.6 ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES

A estabilidade é a capacidade de um produto manter – dentro de limites estabelecidos e por tempo determinado – as propriedades e características originais que apresentava no momento de sua fabricação. Para sua caracterização são levados em conta propriedades físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas. O conhecimento destes dados possibilita a determinação de condições de armazenamento ideais, prazo de validade do produto, bem como a antecipação de interações do fármaco com os adjuvantes presentes na formulação (BRASIL, 2004; ALLEN et al, 2007).

Incidência de luz, variações de temperatura, presença de oxigênio e umidade podem atuar como catalizadores nas reações de degradação das formulações (BRASIL, 2004; ALLEN et al, 2007). Os processos de instabilidade das formulações farmacêuticas podem ser detectados, muitas vezes, por alterações de suas características organolépticas (BRASIL, 2004; BILLANY, 2005a; ALLEN et al, 2007).

Os testes de estabilidade preliminar ou acelerada são utilizados como triagem inicial diante de um certo número de formulações propostas para um medicamento, de modo que se escolha a mais estável para dar seguimento aos estudos (PUGH, 2005;

ALLEN et al, 2007). Os testes de estabilidade de longo prazo visam expor as formulações farmacêuticas às condições usuais de transporte de armazenamento que ocorreriam durante a distribuição do produto. Estes estudos têm duração de, no mínimo, 12 meses (ALLEN et al, 2007).

Os principais fenômenos de instabilidade observados nas emulsões são: cremeação ou sedimentação (fenômenos reversíveis, causados pela força de gravidade), floculação (fenômeno reversível, causado pelas forças de forças de Van der Waals) e coalescência (fenômeno irreversível, onde ocorre ruptura do filme interfacial) (TOPAN, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade acaricida do timol em diferentes concentrações, incorporado a duas formulações magistrais de uso tópico, sobre estágios imaturos de *R. sanguineus s.l.*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver duas formulações magistrais de uso tópico (uma emulsão O/A – óleo em água – e uma solução hidro alcoólica) contendo timol em diferentes concentrações.

Avaliar a atividade acaricida das formulações desenvolvidas sobre estágios imaturos de *R. sanguineus s.l.*.

Analisar a estabilidade preliminar das formulações por meio da avaliação do aspecto, das características organolépticas e do pH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

O desenvolvimento das formulações e análise de sua estabilidade ocorreram no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Os testes *in vitro* em carrapatos foram realizados no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP) da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

4.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Foram desenvolvidas duas formulações-base, sendo uma emulsão óleo em água (O/A) e uma solução hidroalcoólica. O timol utilizado nas formulações foi obtido da empresa **Sigma-Aldrich**, com $\geq 99\%$ de pureza.

A emulsão O/A foi formulada com as seguintes matérias-primas, denominadas pela International Nomenclature of Cosmetic Ingredient (INCI): Cetearyl Alcohol – Álcool Cetoestearílico, Sodium Laureth Sulfate – Lauril Sulfato de Sódio, Metylparaben - Metilparabeno, Propylparaben - Propilparabeno, Glycerin - Glicerina, Grape Seed Oil – Óleo de Semente de Uva, Water – Água (Tabela 2). Para seu preparo, os constituintes foram separados de acordo com sua solubilidade em água ou óleo. A fase oleosa foi aquecida a 75°C e a fase aquosa a 80°C e, em seguida, a fase aquosa foi adicionada sobre a fase oleosa, emulsionando-se em geral, com auxílio de pistilo, até a homogeneização completa.

Tabela 2: Composição da emulsão O/A e estudo crítico de seus componentes.

Componente	Concentração (%)	Estudo crítico
Álcool cetoestearílico	1	Agente oleoso
Lauril sulfato de sódio	0,1	Surfactante (Tensoativo)
Nipagin	0,025	Conservante
Nipasol	0,025	Conservante
Glicerina	1,25	Umectante
Óleo de semente de uva	0,25	Emoliente
Timol (exceto na emulsão controle)	0,05 a 1	Princípio ativo, acaricida
Etanol absoluto	q.s.	Solvente
Água purificada	q.s.p. 100	Veículo

A solução hidroalcoólica contém em sua formulação: Glycerin - Glicerina, Metylparaben - Metilparabeno, Ethanol – Etanol; foi preparada uma solução hidroalcoólica de etanol 50% e, em seguida, foram adicionados os outros componentes e misturados com bastão de vidro até sua completa homogeneização, à temperatura ambiente, em cálice graduado de vidro (Tabela 3).

Tabela 3: Composição da solução hidroalcoólica e estudo crítico de seus componentes.

Componente	Concentração (%)	Estudo crítico
Glicerina	5	Umectante
Nipagin	0,1	Conservante
Timol (exceto na solução controle)	0,05 a 1	Princípio ativo, acaricida
Etanol absoluto	q.s.	Solvente
Etanol 50%	q.s.p. 100	Veículo

Após 24h do preparo, as amostras foram avaliadas quanto à homogeneidade e características organolépticas, a fim de identificar eventual processo de instabilidade. Em ambas as formulações o timol foi incorporado posteriormente ao preparo das fórmulas-base, previamente solubilizado em etanol absoluto *q.s.* (quantidade suficiente).

4.3 OBTENÇÃO DOS CARRAPATOS

As larvas de *R. sanguineus s.l.* utilizadas foram provenientes de colônia mantida por meio de infestações artificiais em coelhos *Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758 (mestiços Nova Zelândia x Califórnia), de acordo com o método proposto por Neitz *et al* (1971). As fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus s.l.* foram mantidas em estufa com umidade e temperatura controladas ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$), para oviposição. Após 15 dias, os ovos foram pesados em alíquotas de 200 mg, colocados em seringas plásticas de três mililitros com a extremidade distal cortada, tampadas com algodão hidrófilo e devidamente identificadas. As seringas foram então mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade citadas e as larvas foram usadas nos testes 15-25 dias após a eclosão. As ninfas não-ingurgitadas foram testadas 15 dias após ecdise e as larvas e ninfas ingurgitadas, obtidas por meio de infestações artificiais em coelhos, foram testadas no mesmo dia em que se desprenderam do hospedeiro. Todos os carrapatos utilizados no presente experimento corresponderam a excedente de pesquisas realizadas no âmbito do

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (PPGCV-UFRRJ) (CEUA nº 6311290416).

4.4 BIOENSAIOS

Para as análises *in vitro*, 18 grupos foram formados, sendo nove para a emulsão e nove para a solução hidroalcoólica: emulsão controle, emulsão com timol a 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/mL. Grupos semelhantes foram formados para a solução hidroalcoólica. As concentrações foram determinadas com base nos testes já realizados anteriormente com timol em *R. sanguineus s.l.* – 2,5 a 20 mg/mL - (DAEMON et al, 2009, MONTEIRO et al, 2009, DAEMON et al, 2012, SENRA et al, 2013), testando-se também concentrações mais baixas de timol, com o objetivo de avaliar eventual potencialização do efeito carrapaticida propiciado pela interação do timol com os adjuvantes das formulações.

4.4.1 Teste de pacote de larvas

Para as fases não ingurgitadas, foi utilizado o teste do pacote de larvas como proposto por Stone e Haydock (1962) e adaptado por Monteiro *et al* (2012).

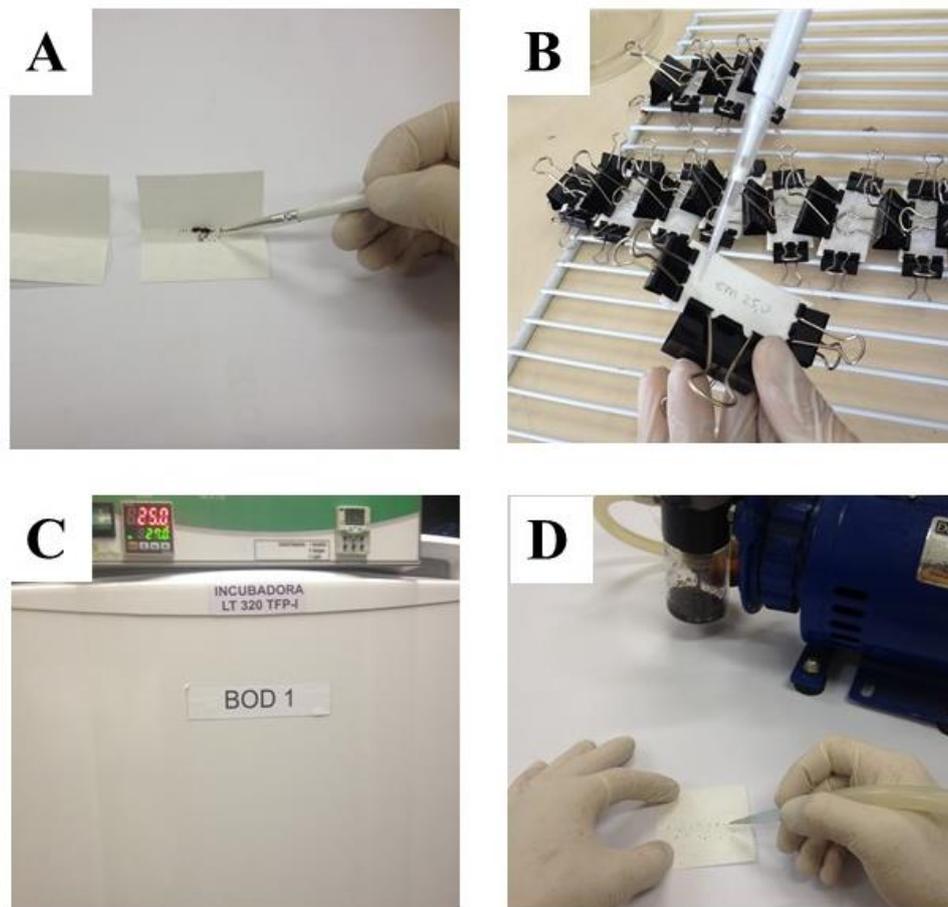
Aproximadamente 100 larvas foram colocadas sobre papel filtro com dimensões 6 x 6 cm, que foi dobrado ao meio e selado com três cliques de papel tipo “grampomol”. Em seguida, cada lado do papel filtro foi umedecido com 90µL da formulação testada e os envelopes contendo os carrapatos foram acondicionados em câmara climatizada (27±1°C e UR 80±10%). Cada envelope corresponde a uma unidade amostral e foram feitas 10 repetições para cada tratamento. Após 24 horas, os envelopes foram abertos para a contagem do número de larvas vivas e mortas, com o uso de uma bomba de vácuo adaptada para a sucção das larvas vivas (Figura 3). O percentual médio da mortalidade foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de mortalidade}(\%) = \left(\frac{\text{numero de larvas mortas}}{\text{número total de larvas}} \right) \times 100$$

Equação 1. Cálculo do percentual médio de mortalidade de larvas de *R. sanguineus s.l.* submetidas aos bioensaios.

A mesma metodologia foi utilizada para ninfas não ingurgitadas, sendo que neste caso foram utilizadas cinco ninfas em cada pacote.

Figura 3- Teste de pacote de larvas.



A: Montagem dos pacotes de larvas; B: Pacote sendo tratado com 90 μ L de formulação carrapaticida em cada lado; C: Câmara climatizada com temperatura de 27 \pm 1°C e UR80 \pm 10% ; D: Contagem do número de larvas vivas e mortas com auxílio de bomba de vácuo.

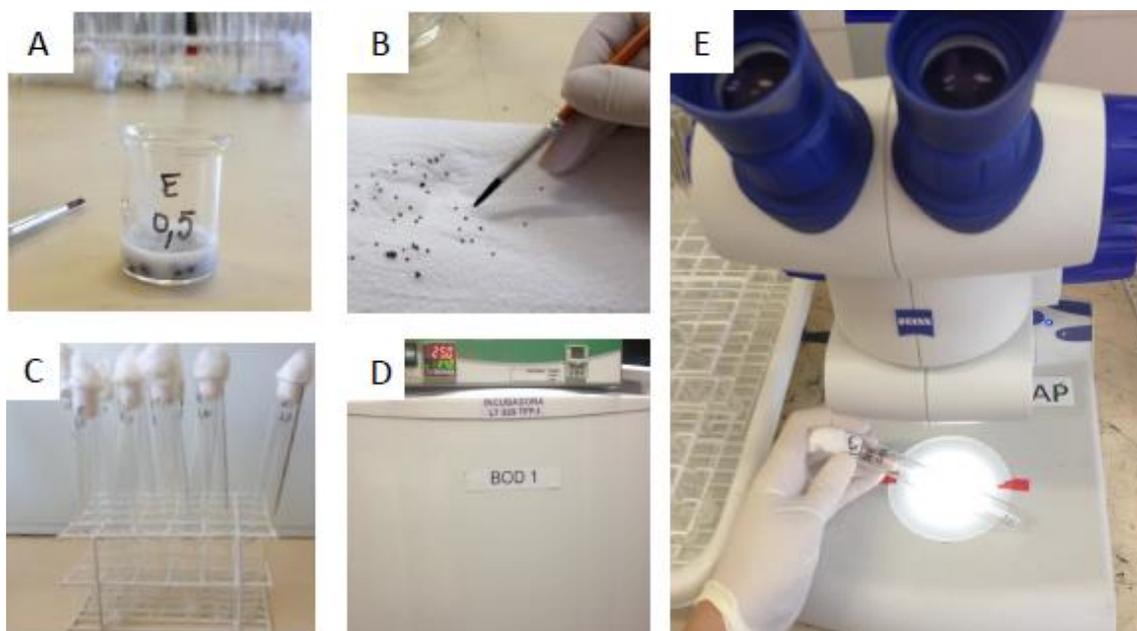
Fonte: o autor (2016)

4.4.2 Teste de imersão

O ensaio em larvas ingurgitadas foi feito pelo teste de imersão, segundo o método proposto por Drummond et al (1973). As larvas ingurgitadas recuperadas em infestações artificiais em coelhos foram separadas em grupos de 100 espécimes e imersas nas formulações durante cinco minutos, sendo que cada grupo correspondeu a um tratamento. Após a imersão, as larvas foram secas em papel absorvente e divididas em subgrupos contendo 10 indivíduos, colocados em tubos de ensaio devidamente identificados e

vedados com algodão hidrófilo, de modo que cada tubo correspondeu a uma repetição. Logo, para cada tratamento, 10 repetições foram realizadas, cada repetição contendo 10 larvas ingurgitadas. Avaliaram-se as taxas de mortalidade após 15 dias e, durante este período, os tubos foram mantidos em câmara climatizada a $27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}\geq 80\%$ (Figura 4). O percentual médio da mortalidade foi obtido da mesma forma como relatado para larvas não ingurgitadas. Para o ensaio com ninfas ingurgitadas foi utilizada a mesma técnica, sendo que neste caso, cada unidade experimental continha cinco ninfas, e cada tratamento continha 10 repetições.

Figura 4 - Teste de imersão.



A: Imersão de larvas ingurgitadas de *R. sanguineus s.l.* na formulação carrapaticida; B: Secagem das larvas tratadas com papel filtro; C: Grupos tratados acondicionados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo; D: Câmara climatizada com temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR } 80\pm 10\%$; E: Contagem das larvas vivas e mortas com auxílio de lupa de aumento.

Fonte: o autor (2016)

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas com o software **Bioestat versão 5.0**.

No caso dos bioensaios, os dados obtidos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$ e analisados pelos testes Kruskal-Wallis e Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

Para os valores de pH obtidos nos testes de estabilidade, foi feito o cálculo da média de três medições consecutivas e esta foi analisada por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.6 TESTES DE ESTABILIDADE PRELIMINAR DAS FORMULAÇÕES

Para avaliação da estabilidade das formulações foram adotadas as diretrizes do teste de estabilidade preliminar, também conhecido como teste de estabilidade acelerada ou de curto prazo (BRASIL, 2004). Neste teste as formulações são armazenadas durante 15 dias expostas a diferentes condições de estresse a fim de acelerar eventuais processos de instabilidade e é realizada avaliação sensorial, centrifugação e medição do pH para cada amostra, 24 horas após o preparo (1º dia do teste, antes de serem submetidas às condições de estresse) e ao 15º dia de exposição. As condições de armazenagem adotadas foram: temperatura elevada (em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$), temperatura baixa (em geladeira a $5 \pm 2^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) com e sem exposição à luz, e ciclos de congelamento e descongelamento (24 horas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e 24 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, alternadamente), como proposto por Brasil (2004).

Foram eleitas para este teste a emulsão e a solução hidroalcoólica nas concentrações de 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, que foram as menores concentrações que apresentaram atividade carrapaticida satisfatória em mais de um estágio testado. Todos os testes foram realizados em tubos de polipropileno graduados, transparentes e devidamente tampados.

Para avaliação sensorial, as formulações foram avaliadas quanto a alterações na cor, odor e aspecto.

A centrifugação foi realizada submetendo-se 10mL de cada amostra a um ciclo de 3000 rpm por 30 minutos (Excelsa Baby 208N - Fanem) em temperatura ambiente, e observando-se em seguida a presença ou ausência de sinais macroscópicos de instabilidade, tais como cremeação, coalescência e floculação.

O pH foi verificado por potenciômetro (HI 221 – Hanna Instruments) devidamente calibrado com soluções-tampão pH4 e pH7, e as amostras foram avaliadas em diluição 1:10 em água recém-destilada, em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Cada amostra foi aferida três vezes e os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão das três medições.

Para a avaliação sensorial e interpretação dos testes de centrifugação, adotou-se a seguinte nomenclatura para tradução dos resultados (BRASIL, 2004):

- Normal, sem alteração (N);
- Levemente modificado (LM);
- Intensamente modificado (IM).

Figura 5 – Testes de Estabilidade das formulações.



A: Grupos formados para exposição a diferentes condições de armazenagem; B: Centrifugação das amostras; C: Avaliação do pH com potenciômetro.

Fonte: o autor (2016)

5 RESULTADOS

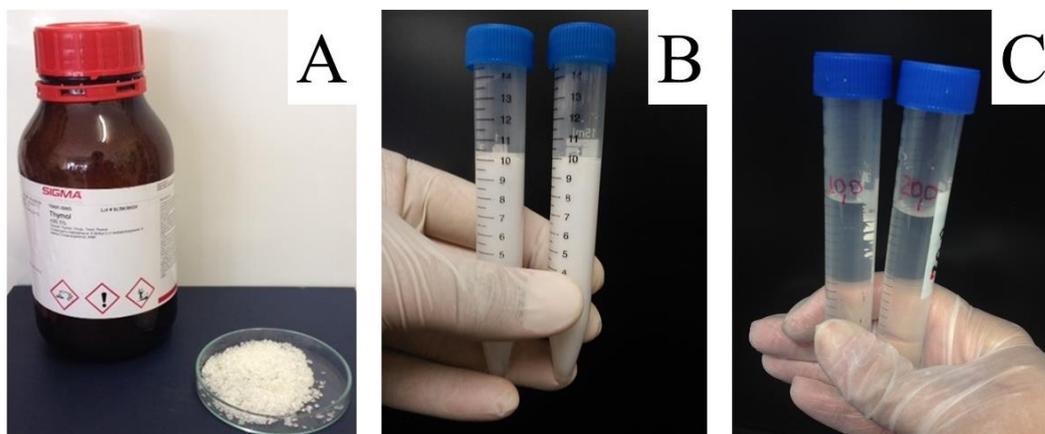
5.1 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

A emulsão após o preparo apresentou-se com aspecto leitoso, homogêneo e com fluidez satisfatória para aplicação nos testes de pacote e nos testes de imersão.

A solução hidroalcoólica apresentou-se límpida e incolor, conforme determina a literatura para esta forma farmacêutica.

Ambas as formulações apresentaram odor característico do timol.

Figura 6 – Desenvolvimento das formulações.



A: Timol em sua forma comercial; B: Emulsão O/A com timol incorporado; C: Solução hidroalcoólica com timol incorporado.

Fonte: o autor (2016)

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARRAPATICIDA *IN VITRO*

Nos testes com emulsão em larvas não ingurgitadas, a partir da concentração de 0,75 mg/mL, todos os grupos tratados apresentaram mortalidade próxima de 100%, com diferença significativa em relação ao grupo controle. Para larvas ingurgitadas, foram necessárias concentrações mais elevadas de timol para atingirem-se taxas de mortalidade relevantes, observando-se 95,0% de mortalidade na concentração de 5,0 mg/mL. Já no teste com ninfas não ingurgitadas, foram verificadas taxas de mortalidade crescentes na medida em que se aumentou a concentração de timol, sendo verificada mortalidade de 83,3% para a concentração de 2,5 mg/mL que aumentou até chegar a 100,0% com o uso de 20 mg/mL. No teste com ninfas ingurgitadas, houve mortalidade média de 86,0% na

concentração de 5 mg/mL. Os resultados dos bioensaios com a emulsão O/A estão demonstrados na íntegra na Tabela 4.

Tabela 4: Taxas de mortalidade (média \pm DP) de estágios imaturos de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. tratados com emulsão contendo timol incorporado.

	Larvas não ingurgitadas	Larvas ingurgitadas	Ninfas não ingurgitadas	Ninfas ingurgitadas
CONTROLE	0,8 \pm 1,4 ^a	3,0 \pm 4,8 ^{ab}	4,0 \pm 8,4 ^a	4,0 \pm 8,4 ^a
0,5 mg/mL	73,2 \pm 11,6 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^a	12,5 \pm 16,3 ^{ab}	3,3 \pm 10,5 ^a
0,75 mg/mL	94,2 \pm 9,8 ^{bc}	5,0 \pm 7,1 ^{ab}	41,7 \pm 17,5 ^b	2,0 \pm 6,3 ^a
1,0 mg/mL	100,0 \pm 0,0 ^c	16,0 \pm 7,0 ^{bc}	41,7 \pm 15,7 ^b	2,0 \pm 6,3 ^a
1,25 mg/mL	99,5 \pm 1,3 ^c	29,0 \pm 14,5 ^c	40,2 \pm 25,2 ^b	0,0 \pm 0,0 ^a
2,5 mg/mL	100,0 \pm 0,0 ^c	40,0 \pm 15,6 ^{cd}	83,3 \pm 22,1 ^c	32,0 \pm 23,5 ^b
5,0 mg/mL	100,0 \pm 0,0 ^c	95,0 \pm 5,3 ^{de}	86,7 \pm 12,4 ^c	86,0 \pm 21,2 ^{bc}
10,0 mg/mL	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^e	97,2 \pm 8,3 ^c	95,0 \pm 9,3 ^{bc}
20,0 mg/mL	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^e	100,0 \pm 0,0 ^c	100,0 \pm 0,0 ^c

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%.

Controle = emulsão sem timol

Nos ensaios com a solução hidroalcoólica, a concentração de 2,5 mg/mL provocou 88,1% de mortalidade em larvas não ingurgitadas, atingindo-se 98,1% com o uso de 5,0 mg/mL e 100,0% com o uso de 10,0 e 20,0 mg/mL. A atividade sobre larvas ingurgitadas foi parcial, pois a maior concentração testada (20 mg/mL) provocou apenas 25,0% de mortalidade, valor considerado baixo para que haja um controle efetivo de carrapatos (BRASIL, 1997). Para o teste com ninfas não ingurgitadas, observou-se 91,0% de mortalidade para a concentração de 1,0 mg/mL, chegando a 100,0% a partir de 5,0 mg/mL e, no caso de ninfas ingurgitadas, a solução hidroalcoólica não apresentou atividade carrapaticida relevante, mesmo nas concentrações mais altas, atingindo-se a mortalidade máxima de 18,3% com o uso de 20 mg/mL. Os resultados dos bioensaios com a solução hidroalcoólica estão demonstrados na íntegra na Tabela 5.

Tabela 5: Taxas de mortalidade (média \pm DP) de estágios imaturos de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. tratados com solução hidroalcoólica contendo timol incorporado.

	Larvas não ingurgitadas	Larvas ingurgitadas	Ninfas não ingurgitadas	Ninfas Ingurgitadas
CONTROLE	0,1 \pm 0,3 ^a	7,5 \pm 10,4 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a
0,5 mg/mL	3,1 \pm 4,7 ^{ab}	7,0 \pm 8,2 ^{ab}	4,5 \pm 9,6 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a
0,75 mg/mL	7,7 \pm 4,6 ^{bc}	12,0 \pm 10,3 ^{ac}	5,0 \pm 10,0 ^a	2,0 \pm 6,3 ^a
1,0 mg/mL	6,5 \pm 7,5 ^{abc}	6,0 \pm 8,4 ^{ab}	91,0 \pm 16,6 ^b	0,0 \pm 0,0 ^a
1,25 mg/mL	15,2 \pm 3,5 ^{cd}	8,0 \pm 7,9 ^a	92,0 \pm 10,3 ^b	2,0 \pm 6,3 ^a
2,5 mg/mL	88,1 \pm 11,9 ^{de}	0,0 \pm 0,0 ^b	96,0 \pm 8,4 ^b	0,0 \pm 0,0 ^a
5,0 mg/mL	98,1 \pm 3,6 ^e	8,0 \pm 10,3 ^{ab}	100,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^a
10,0 mg/mL	100,0 \pm 0,0 ^e	11,0 \pm 12,9 ^{ac}	100,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^a
20,0 mg/mL	100,0 \pm 0,0 ^e	25,0 \pm 17,2 ^c	100,0 \pm 0,0 ^b	18,3 \pm 24,9 ^a

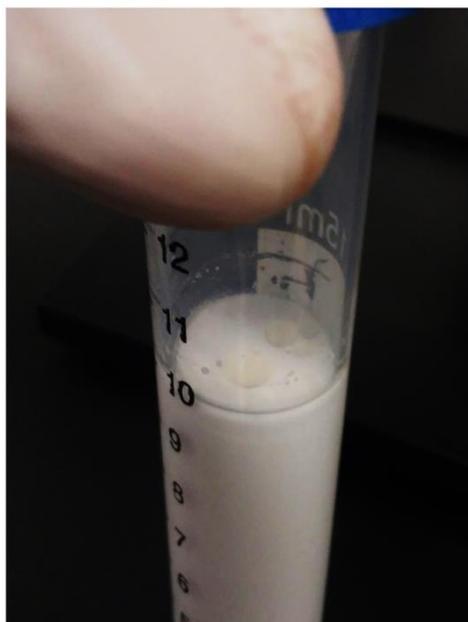
Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%.

Controle = solução sem timol

5.3 TESTES DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

Nos testes de estabilidade preliminar, ao submeterem-se a emulsão O/A e a solução hidroalcoólica nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL à centrifugação para triagem inicial, verificou-se que emulsão a 5 mg/mL apresentou-se intensamente modificada, com sinais de coalescência (Figura 7). Por isso, esta amostra foi excluída no prosseguimento dos estudos de estabilidade. A emulsão O/A a 2,5 mg/mL e a solução hidroalcoólica nas duas concentrações testadas não apresentaram alterações após a centrifugação inicial e prosseguiram para os desafios de armazenagem.

Figura 7: Processo de instabilidade verificado na emulsão a 5 mg/ml (coalescência).



Fonte: o autor (2016)

Após os 15 dias de exposição a diferentes condições de temperatura e luminosidade, todas as amostras testadas permaneceram com coloração estável e odor característico do timol. A solução hidroalcoólica mostrou-se estável em todas as situações, nas duas concentrações testadas. A emulsão O/A a 2,5 mg/mL permaneceu estável nas condições de temperatura ambiente, com e sem exposição à luz, e quando mantida sob refrigeração contínua; no entanto, mostrou sinais de instabilidade (cremeação) após a centrifugação final, nas amostras mantidas em estufa e no ciclo de gelo e degelo. A análise do pH demonstrou variação não significativa ($p < 0,05$) entre os valores iniciais (1º dia) e finais (15º dia) para todas as formulações testadas, quando analisados por ANOVA e Teste de Tukey. Os resultados da análise sensorial, centrifugação e análise do pH estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados da análise sensorial, centrifugação e pHmetria da emulsão e solução hidroalcoólica, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL, no teste de estabilidade acelerada. Os valores de pH estão apresentados como média e desvio padrão de 3 medições consecutivas para cada amostra.

Avaliações	Emulsão		Solução	
	2,5mg/mL	5,0mg/MI	2,5mg/mL	5,0 mg/mL
Tempo inicial (24h)				
Análise sensorial	N	N	N	N
Média do pH	6,78±0,05	-	6,12±0,14	6,57±0,03
Centrifugação	N	IM	N	N
Após 15 dias em T°C ambiente, exposto a luz				
Análise sensorial	N	-	N	N
Média do pH	6,35±0,15	-	5,75±0,07	6,16±0,10
Centrifugação	N	-	N	N
Após 15 dias em T°C ambiente, protegido da luz				
Análise sensorial	N	-	N	N
Média do pH	6,26±0,04	-	5,84±0,08	5,86±0,06
Centrifugação	N	-	N	N
Após 15 dias, em geladeira (T=5±2°C)				
Análise sensorial	N	-	N	N
Média do pH	6,67±0,21	-	6,04±0,11	5,96±0,10
Centrifugação	N	-	N	N
Após 15 dias, em estufa (T=37±2°C)				
Análise sensorial	N	-	N	N
Média do pH	6,65±0,05	-	5,99±0,21	5,91±0,05
Centrifugação	LM	-	N	N
Após 15 dias, em ciclo gela-degela (T=4±2°C e T=40±2°C)				
Análise sensorial	N	-	N	N
Média do pH	6,46±0,10	-	5,80±0,16	6,15±0,03
Centrifugação	LM	-	N	N

N = normal ; LM = levemente modificada; IM = intensamente modificada.

6 DISCUSSÃO

Por muitos anos as substâncias sintéticas foram utilizadas com bons resultados para o controle de carrapatos. No entanto, devido ao seu uso indiscriminado e às suas características físico-químicas, hoje estamos diante da ocorrência de populações de carrapatos resistentes (EIDEN et al, 2015; ESTRADA-PEÑA, 2005; MILLER et al, 2001), bem como do risco de contaminação ambiental e intoxicações de humanos e de outros animais pelo contato com as mesmas (BERNY et al, 2010, JONES, 1990; LEE et al, 2010). Assim, faz-se necessária a busca por substâncias eficazes e com menor impacto na saúde de humanos, de outros animais e do meio ambiente. Dentre estas substâncias destaca-se o timol, que já teve sua segurança atestada (HU & COATS, 2008; USEPA, 1993) e tem apresentado resultados promissores quanto a sua atividade acaricida em diversos estudos (MONTEIRO et al, 2010; MENDES et al, 2011; DAEMON et al, 2012; MATOS et al, 2014; ARAÚJO et al, 2015; NOVATO et al, 2015). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram aumento do efeito acaricida do timol sobre larvas não ingurgitadas nos testes com emulsão e solução hidroalcoólica, quando comparados aos apresentados por Daemon et al (2009) e Daemon et al (2012).

No caso de larvas ingurgitadas, verificou-se aumento da atividade acaricida no caso da emulsão, e os testes com a solução hidroalcoólica não demonstraram taxas de mortalidade relevantes, alcançando-se taxas menores do que aquelas verificadas quando o timol foi testado diluído em água + DMSO a 1% (DAEMON et al, 2009). Para ninfas não-ingurgitadas, emulsão e solução alcançaram taxas de mortalidade similares àquelas obtidas em estudo anterior, onde utilizou-se timol solubilizado em etanol (SENRA et al, 2013). Finalmente, para ninfas ingurgitadas, os grupos tratados com a emulsão apresentaram aumento de toxicidade nas concentrações abaixo de 5,0 mg/ml, e a partir desta concentração foram observadas taxas de mortalidade similares ao estudo anterior, que utilizou água + DMSO 1%; a solução hidroalcoólica, por sua vez, não atingiu taxas de mortalidade relevantes, ficando com taxas de mortalidade abaixo daquelas verificadas por Monteiro et al (2009).

As variações observadas entre os resultados para os diferentes estágios testados no presente trabalho devem ser analisadas à luz das diferenças anatomo-fisiológicas dos ixodídeos, inerentes a cada estágio (larva/ninfa) e fase (ingurgitada/não-ingurgitada), e considerando-se as propriedades químicas dos componentes das formulações.

Em ambas as formulações desenvolvidas foi utilizada uma substância viscosa, com propriedades higroscópicas e umectantes, a glicerina, com o objetivo de prevenir o ressecamento da formulação. Este componente tem a capacidade de formar um filme hidrofílico nas superfícies onde é aplicado (RIBEIRO, 2006). Diante das taxas de mortalidade verificadas nos testes em larvas não ingurgitadas, sugere-se um possível efeito deletério sobre estas, causado pela glicerina, quando em associação com o timol, que pode ser decorrente de um aumento nas perdas de água através da cutícula (RAVINDRAN et al, 2011), ou mesmo pela formação de um filme causando a oclusão dos canais responsáveis pelas trocas gasosas, já que, como citado, neste estágio os carrapatos não apresentam o sistema de respiração traqueal. Para ninfas não ingurgitadas, não foi observado tal efeito, e houve toxicidade com taxas de mortalidade similares àquelas verificadas em estudo anterior (SENRA et al, 2013), em que foi utilizada solução hidroalcoólica de etanol 50% como solvente. Como as ninfas não dependem exclusivamente da cutícula para realizar suas trocas gasosas e absorção de água, por serem dotadas de sistema traqueal, o efeito oclusivo das formulações sobre o tegumento pode ter sido contrabalançado pela atividade respiratória, de modo que o efeito deletério dos adjuvantes das duas formulações foi atenuado. Entretanto, como não houve mortalidade significativa nos grupos controles, a mera ação obstrutiva da glicerina não justificaria o aumento da ação deletéria do timol. Assim, devem ser buscadas outras hipóteses farmacológicas e/ou físico-químicas que esclareçam esta potencialização.

Os resultados dos testes com larvas ingurgitadas mostraram aumento nas taxas de mortalidade nos grupos tratados com a emulsão. No caso da solução hidroalcoólica, mesmo nas maiores concentrações testadas as taxas de mortalidade não foram relevantes. Vale destacar que em estudo anterior (DAEMON et al, 2009), em que foi utilizado timol solubilizado em água + DMSO 1%, só atingiram-se taxas de mortalidade relevantes (97,0%) a partir da concentração de 15 mg/mL. O aumento de toxicidade no tratamento com emulsão em larvas ingurgitadas pode estar relacionado ao uso de promotores de permeação com propriedades lipofílicas, como o álcool cetosteárilico e o óleo de semente de uva. Dada a lipossolubilidade do timol, pode-se suspeitar que a emulsão permitiu maior interação do princípio ativo com a camada de gordura da cutícula, facilitando sua entrada no organismo, e manteve o timol por mais tempo em contato com o carrapato, pela possibilidade de formação de um filme ao redor do tegumento. Além de auxiliar na permeação do princípio ativo, a deposição de substâncias oleosas sobre a cutícula pode ter gerado um efeito oclusivo, impedindo as trocas gasosas e de água através

da mesma que, nesta fase, naturalmente já contém maior quantidade de cera pela atividade aumentada das glândulas dermais. Vale considerar, ainda, as propriedades higroscópicas da glicerina, que podem ter contribuído para gerar um desequilíbrio hídrico, tendo como consequência o dessecamento do carrapato. Nos testes com ninfas ingurgitadas, para a emulsão, foram verificadas taxas de mortalidade similares às encontradas em estudo anterior (MONTEIRO et al, 2009), que utilizou solução aquosa de DMSO 1% como solvente. Por outro lado, nos testes com larva e ninfas ingurgitadas tratadas com a solução hidroalcoólica, observaram-se taxas de mortalidade inferiores (DAEMON et al, 2009; MONTEIRO et al, 2009). Para entender este fenômeno, é importante considerar a maior produção de ceras pelas glândulas dermais que ocorre nas fases ingurgitadas, como explicado anteriormente. É possível que a solução hidroalcoólica tenha gerado uma solubilização parcial ou inadequada das ceras presentes na superfície da cutícula, de modo que a penetração do timol não foi bem sucedida. Por outro lado, a interação dos agentes de penetração lipofílicos com o timol e a camada de gordura da cutícula pode justificar o fato da emulsão alcançar níveis de toxicidade satisfatórios.

Em relação aos estudos de estabilidade preliminar, verificou-se que a solução hidroalcoólica nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL manteve-se estável em todas as condições de armazenagem testadas. A emulsão a 2,5 mg/mL, por sua vez, mostrou sinais aparentes de instabilidade (cremeação) quando submetida ao calor excessivo e aos ciclos de congelamento e descongelamento; no entanto, segundo Brasil (2004), pequenas alterações nestas condições são aceitáveis, frequentes e até mesmo esperadas; além disto, não houve variação significativa nos seus valores de pH, que mostram-se adequados para aplicação na pele de cães, considerando-se que o pH médio da pele de um cão sadio varia entre 5,86 e 6,45, com valor médio de 6,16 (BRIONES et al, 2004; LAUREL, 2005). A emulsão a 5,0 mg/mL mostrou-se intensamente modificada na centrifugação inicial (coalescência) e por isso não foi testada em outras condições. Por tratar-se de estudo inédito envolvendo a incorporação do timol como carrapaticida em formulações para uso tópico, os dados aqui apresentados têm valor considerável, pois fornecem subsídios para novas pesquisas.

Para melhor entendimento da ação das formulações testadas no presente trabalho, são necessários mais estudos acerca do exato mecanismo de ação do timol, bem como investigações sobre a ação dos componentes umectantes e emolientes aqui utilizados. Aliado a isso, ajustes nas proporções dos adjuvantes e, eventualmente, a adição de outros excipientes, podem oferecer maior estabilidade às formulações propostas, favorecendo

num futuro breve a avaliação de seu efeito acaricida *in vivo*, contribuindo assim para a validação de estratégias de manejo integrado no controle de *Rhipicephalus sanguineus s.l.*

7 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo reafirmam o potencial do timol como carrapaticida, e contribuem para o avanço desta linha de pesquisa, ao demonstrar que o timol pode ser incorporado a formulações carrapaticidas de uso tópico estáveis e de baixo custo, possibilitando uma futura aplicação terapêutica desta substância na medicina veterinária.

Ambas as formulações desenvolvidas apresentaram efeito carrapaticida relevante, sendo que, sobre as formas ingurgitadas, a solução hidroalcoólica não atinge níveis de toxicidade satisfatórios.

O ensaio de estabilidade ora apresentado deve ser complementado com outras análises, de acordo com a legislação vigente.

As formulações desenvolvidas mostram-se promissoras para futuros ajustes e aplicação em estudos *in vivo* sobre a atividade acaricida do timol contra *R. sanguineus s.l.*

REFERÊNCIAS

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ANDRADE, S. F.; SANCHES, O.; TOSTES, R.A. Relato de cinco casos de intoxicação por amitraz em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v. 9, n. 53, p. 38-42, 2004.

ARAÚJO, L.X.; NOVATO, T.P.L.; ZERINGÓTA, V.; MATOS, R.S.; SENRA, T.O.S.; MATURANO, R.; PRATA, M.C.A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3271-3276, 2015.

ATTWOOD, D. Sistemas dispersos. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed.Porto Alegre: Artmed, p.65-112, 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed.Porto Alegre: Artmed, p.504-536, 2005.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BILLANY, M. Soluções. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed.Porto Alegre: Artmed, p.317-329, 2005a .

BILLANY, M. Suspensões e emulsões. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed.Porto Alegre: Artmed, p.341-364, 2005b.

BERNY, P.; CALONI, F.; CROUBELS, S.; SACHANA, M.; VANDENBROUKE, V.; DAVANZO, F.; GUITART, R. Animal poisoning in Europe. Part 2: companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 3, p. 255-259, 2010.

BEUGNET, F.; FRANC, M. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 267-279, 2012.

BONMATIN, J.M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D.P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E.A.D.; NOOME, D.A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35-67, 2015.

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

BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.D; BARBOSA, C.D.S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2011.

BOTELHO, M. A., NOGUEIRA, N. A. P., BASTOS, G. M., FONSECA, S. G. C., LEMOS, T. L. G., MATOS, F. J. A., MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRASIL. Portaria n°48, de 12 de maio de 1997. MAPA. Brasília, 1997.
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=72818869> acessado em 13/07/16

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

BRIONES, F.; GARCÍA, M.; OMEGNA, C. Determinación de pH normal de la piel de caninos y felinos. In: XIII CONGRESO CHILENO DE MEDICINA VETERINARIA DA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHILE, 2004, Valdivia. **Anais do XIII Congresso Chileno de Medicina Veterinaria da Universidad Autónoma de Chile**. Valdivia: 2004.

CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1, p. 140-147, 2012.

CAMPOS, R.N.S.; LIMA, C.B.N.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, A.P.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; LIMA, R.N.; ARAÚJO, V.A.; SANTANA, A.S.; BACCI, L. Acaricidal properties of vetiver essential oil from *Chrysopogon zizanioides* (Poaceae) against the tick species *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3, p. 324-330, 2015.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CHAGAS, A.C.S.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; PRATES, H.T.; PASSOS, W.M. Sensibility of *Boophilus microplus* tick to solvents. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 109-114, 2003.

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

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

CLEMENTE, M. A.; MONTEIRO, C.M.O.; SCORALIK, M. G.; GOMES, F.T.; AZEVEDO PRATA, M. C.; DAEMON, E. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 987-992, 2010

COLES, T.B.; DRYDEN, M.W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 8, 2014.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; ROSA, L.S.; CLEMENTE, M. A.; ARCOVERDE, A. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 495-497, 2009.

DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C.M.O.; GOLDNER, M.S.; MASSONI, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3, p. 542-545, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006 .

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637-646, 2003.

DRUMMOND, R.O.; ERNST, S.E.; TREVINO, J.L.; GILADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

EIDEN, A.L.; KAUFMAN, P.E.; ALLAN, S.A.; MILLER, R.J. Detection of permethrin resistance and fipronil tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 429-436, 2015.

ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasites control: a review. **Med. Vet. Entomol.** v. 28, p. 233-243, 2014.

ESTRADA-PEÑA, A. Etude de la resistance de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* aux acaricides. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 156, n. 2, p. 67-69, 2005.

FERREIRA, A. O.; BRANDÃO, M. **Guia prático da Farmácia Magistral**, 3ª. Ed. São Paulo, SP: Pharmabooks, 2008.

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

FLORIS, I.; SATTA, A.; CABRAS, P.; GARAU, V. L.; ANGIONI, A. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 2, p. 187-191, 2004.

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

GOMES, G.A.; MONTEIRO, C.M.O.; SANTANA JULIÃO, L.D.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; ZERINGÓTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R.S.; DAEMON, E.; CARVALHO, M.G.D. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 41-45, 2014.

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, n. S1, p. S427-S442, 2004.

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

HACKMAN, R.H.; FILSHIE, B.K. The tick cuticle. **Physiology of ticks. Current Themes in Tropical Science**, v. 1, p. 1-42, 1982.

HEKIMOĞLU, O.; SAGLAM, İ.K.; ÖZER, N.; ESTRADA-PEÑA, A. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 5, p. 798-807, 2016.

HU, D.; COATS, J. Evaluation of the environmental fate of thymol and phenethylpropionate in the laboratory. **Pest Management Science**, v. 64, n. 7, p. 775-779, 2008.

HÜE, T.; CAUQUIL, L.; FOKOU, J.H.; DONGMO, P.J.; BAKARNGA-VIA, I.; MENUT, C. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum* species on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Parasitology Research**, v. 114, n. 1, p. 91-99, 2015.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8, p. 603-608, 2000.

JONES, R.D. Xylene/amitraz: a pharmacologic review and profile. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 446-448, 1990.

KNULLE, W.; RUDOLPH, D. Humidity relationships and water balance of ticks. In: Obenchain, F. D. & Galun, R.(eds.). **Physiology of Ticks**. Pergamon Press, Oxford, pp. 43-70. 1982.

LABRUNA, M.B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13(supl.1):123-124, 2004.

LAUREL, C. R. D.; pH de la piel de caninos sometidos a shampoo cosméticos. Graduação em Medicina Veterinária (Monografia em Medicina Veterinaria) – Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología. Santiago de Chile, 2005.

LEE, S.J., MULAY, P., DIEBOLT-BROWN, B., LACKOVIC, M.J., MEHLER, L.N., BECKMAN, J., WALTZ, J.; PRADO, J.B.; MITCHELL, I.A.; HIGGINS, S.A.; SCHWARTZ, A.; CALVERT, G.M. Acute illnesses associated with exposure to fipronil—surveillance data from 11 states in the United States, 2001–2007. **Clinical Toxicology**, v. 48, n. 7, p. 737-744, 2010.

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

LEES, A.D. Passive and active water exchange through the cuticle of ticks. **Discussions of the Faraday Society**, v. 3, p. 187-192, 1948.

LOULY, C.C.B.; FONSECA, I.N.; OLIVEIRA, V.F.D.; BORGES, L.M.F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MATOS, R.S.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FURQUIM, K.C.S.; SAMPIERI, B.R.; REMÉDIO, R.N.; ARAÚJO, L.X.; NOVATO, T.P.L. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4555-4565, 2014.

MATURANO, R.; FACCINI, J.L.; DAEMON, E.; FAZZA, P. O.; BASTOS, R.R. Additional information about tick parasitism in Passeriformes birds in an Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Parasitology Research**, v. 114, n. 11, p. 4181-4193, 2015.

MENDES, A.S.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; BRITO, F.C.; MASSONI, T. . Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 136-139, 2011.

MELLO, V.; PRATA, M.C.A.; SILVA, M.R.D.; DAEMON, E.; SILVA, L.S.D.; GUIMARÃES, F.D.G.; MENDONÇA, A.E.D.; FOLLY, E.; VILELA, F.M.P.; AMARAL, L.H.D.; 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. 12, n. 113, p. 4431-4437, 2014.

MILLER, R.J.; GEORGE, J.E.; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J.B.. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille)(Acari: Ixodidae) collected from the Corozal army veterinary quarantine center, Panama. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 298-302, 2001.

MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E; CLEMENTE, M.A.; ROSA, L.D.S.; MATURANO, R. . Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 1093-1097, 2009.

MONTEIRO, C.M.O; DAEMON, E.; SILVA, A.M.R., MATURANO, R., & AMARAL, C.. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 615-619, 2010.

MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; CALMON, F.; SENRA, T.D.S.; FAZA, A.P.; CARVALHO, M.G.D. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1295-1300, 2012.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J; VENZAL, J.M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1, p. 2-8, 2015.

NEEDHAM, G.R.; TEEL, P.D. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 36, n. 1, p. 659-681, 1991.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the life-cycle of the karoo paralysis tick *Ixodes rubicundus* (Neumann, 1904). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 1971.

NOVATO, T.P.L.; ARAÚJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.D.O.S.; MATOS, R.D.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E.. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, 2015.

NOVELINO, A.M.S; DAEMON, E; SOARES, G.L.G. . Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887)(Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology research**, v. 101, n. 3, p. 809-811, 2007.

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

PAZ, G.F.; LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 3, p. 139-144, 2008.

PRIESTLEY, C.M.; WILLIAMSON, E.M.; WAFFORD, K.A.; SATTELLE, D.B.. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 8, p. 1363-1372, 2003.

PUGH, J. Cinética e estabilidade de produtos. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. p 112-123, 2005.

RAVINDRAN, R.; JULIET, S.; KUMAR, K.A.; SUNIL, A.R.; NAIR, S.N.; AMITHAMOL, K.K.; RAWAT, A.K.S.; GHOSH, S.. Toxic effects of various solvents against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 3, p. 160-162, 2011.

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B.J.R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharm.Biol.** 46, 41–52, 2008.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

SANDERSON, H.; LAIRD, B.; POPE, L.; BRAIN, R.; WILSON, C.; JOHNSON, D., BRYNING, G.; PEREGRINE, A.S.; BOXALL, A.; & SOLOMON, K. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. **Aquatic toxicology**, v. 85, n. 4, p. 229-240, 2007.

SANTOS, F.D. & VOGEL, F.S.F. Avaliação *in vitro* da ação do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 14, n. 4, p. 712-716, 2012.

SCORALIK, M.G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O. & MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 645-648, 2012.

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

SERRA-FREIRE, N.M.; SENA, L.M.M.; BORSOI, A.B.P. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **Entomobrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67-72, 2011.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**, v.1. New York, Oxford University Press, 1991.

STONE, B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 03, p. 563-578, 1962.

TOPAN, J.F. **Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annus L.*) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

TRIPATHI, A.K.; UPADHYAY, S.; BHUYAN, M.; & BHATTACHARYA, P.R. . A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 1, n. 5, p. 052-063, 2009.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention Pesticide and Toxic Substances Program. **Thymol R.E.D Facts**, 1993. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-080402_1-Sep-93.pdf> Acesso em: 13 jul. 2016.

VASCONCELOS, L.C.D.; SAMPAIO, F.C.; ALBUQUERQUE, A.D.J.D.R. & VASCONCELOS, L.C.D.S. Cell Viability of *Candida albicans* Against the Antifungal Activity of Thymol. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 277-281, 2014.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; GORDON, M.H. & RANEVA, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 59-66, 1999.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. p 17-28, 2005.