

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

**Efeito *in vitro* do monoterpeno carvacrol sobre estágios não ingurgitados de
Amblyomma dubitatum Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae)**

Cristiane Teixeira Franco

Juiz de Fora

2017

Cristiane Teixeira Franco

**Efeito *in vitro* do monoterpeno carvacrol sobre estágios não ingurgitados de
Amblyomma dubitatum Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae)**

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

Orientador: Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto

Juiz de Fora

2017

Cristiane Teixeira Franco

**Efeito *in vitro* do monoterpeno carvacrol sobre estágios não ingurgitados de
Amblyomma dubitatum Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae)**

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

Aprovada em 29 de março de 2017

Banca Examinadora:

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

João Luis Horácio Faccini
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Márcia Cristina de Azevedo Prata
Embrapa Gado de Leite

Agradecimentos

À Deus, nosso Senhor, por ter me ajudado a chegar até aqui. Sem Ele, nada do que foi feito se faria.

À minha amada mãe e ao Breno, meu filho, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu amado, José Geraldo de Castro Júnior, por me ajudar, com boa vontade e empenho, executar esse projeto. Em todos os momentos estive ao meu lado e com dedicação me ajudou no que fosse necessário. Foi o meu braço direito!

Ao meu orientador, prof. Dr. Erik Daemon, pela oportunidade concedida.

À essa equipe maravilhosa do Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP): Mariana Oliveira, Diego Rodrigues, Tatiane Senra, Natália Muniz, Rafael Nascimento. Gostaria de prestar meus agradecimentos em especial ao Ralph Maturano, pela dedicação e orientações prestadas, Caio Monteiro, Tatiane Novato, Viviane Zeringóta e Paula Barroso. A presença de todos foi essencial no cumprimento desse sonho.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal - pelo convívio, incentivo e ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	09
2 Revisão Bibliográfica.....	11
2.1 Biologia do <i>Amblyomma dubitatum</i>	11
2.2 Substância de origem vegetal.....	12
2.3 Atividade do monoterpeno carvacrol.....	13
3 Material e Métodos.....	16
3.1 Local do estudo.....	16
3.2 Obtenção dos carrapatos.....	16
3.3 Obtenção e diluição das substâncias.....	17
3.4 Testes.....	17
3.5 Análise estatística.....	18
4 Resultados.....	20
5 Discussão.....	22
6 Conclusão.....	23
7 Referências Bibliográficas.....	24

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mortalidade de larvas e ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma dubitatum* tratados com concentrações de carvacrol em condições laboratoriais20

Tabela 2. Concentrações letais de 50% (CL50) de carvacrol sobre larvas e ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma dubitatum* em condições de laboratório.....21

Lista de Ilustrações

Figura 1. Realização do teste de pacote de larvas.....	18
--	----

RESUMO

Amblyomma dubitatum apresenta importante papel como vetor de riquetsias na natureza. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade carrapaticida do carvacrol sobre larvas e ninfas não ingurgitadas de *A. dubitatum*. A realização dos experimentos ocorreu através do teste de pacote de larvas e ninfas, sendo colocadas no centro de papel filtro, dobrado ao meio, fechado nas laterais com cliques binder e umedecido com 90 µL da solução testada em cada lado. Os grupos foram mantidos em câmara climatizada ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10$) individualizadas. As concentrações testadas foram de 2,5; 7,5; 10; 15 e 20 mg/mL, com 10 repetições para larvas e sete para ninfas por tratamento. Foram formados dois grupos controle para cada estágio: água e etanol 70% (larvas) e água e DMSO 3% (ninfas). A mortalidade de larvas não ingurgitadas tratadas com a menor concentração de carvacrol foi 45,7%, sendo estatisticamente similar ($p>0,05$) para o grupo controle. Houve diferença estatística ($p<0,05$) a partir da concentração 7,5 mg/mL em relação ao grupo controle. O percentual de mortalidade de 100% foi obtido a partir da concentração 15 mg/mL, porém foi estatisticamente similar ($p>0,05$) a concentração 7,5 mg/mL. Para ninfas não ingurgitadas, a menor concentração não resultou em mortalidade, alcançando percentual de mortalidade de 65,7% na concentração de 20 mg/mL. A partir da concentração 10 mg/mL houve diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao grupo controle. Na determinação da CL50, para larvas e ninfas não ingurgitadas foram observados valores de 2,81 mg/mL e 14,57 mg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que carvacrol tem atividade carrapaticida sobre larvas de *A. dubitatum*.

Palavras-chave: carrapato da capivara. atividade carrapaticida. estágios imaturos. carrapatos.

Abstract

Amblyomma dubitatum plays an important role as a vector of rickettsia in nature. The aim of this essay was to evaluate the acaricidal activity of the carvacrol on unengorged larvae and nymphs of *A. dubitatum*. The process of experiments happened through the packet test of larvae and nymphs, being put in the center of the filter paper, folded in half, closed on the sides with binder clips and moistened with 90 μ L of the solution to be tested on each side. The groups were kept in a climate-controlled chamber ($27\pm 1^\circ\text{C}$ and $\text{RH} > 80\pm 10\%$) individually. The concentrations tested were of 2,5; 7,5; 10; 15 e 20 mg/mL, with ten repetitions for larvae and seven for nymphs per treatment. Were formed two control groups for each stage: water and ethanol 70% (larvae) and water and DMSO 3% (nymphs). The mortality of unengorged larvae treated with a lowest concentration of carvacrol was 45,7%, being similar statistically ($p > 0,05$) to the control group. There was a difference statistic ($p < 0,05$) from the concentration 7,5 mg/mL in relation to the control group. The mortality percentage of 100% was obtained from the concentration of 15 mg/mL, but it was statistically similar ($p > 0,05$) to the concentration 7,5 mg/mL. For the nymphs unengorged the lowest concentration didn't result in mortality, reaching a mortality percentage of 65,7% in a concentration of 20 mg/mL. From a concentration of 10 mg/mL there was a difference statistic of ($p < 0,05$) in relation to the control group. In the determination of CL50 for unengorged larvae and nymphs were observed values of 2,81 mg/mL and 14,57 mg/mL, respectively. The results obtained indicate that carvacrol has acaricidal activity on unengorged larvae of *A. dubitatum*.

Key-words: capybara ticks. acaricidal activity. immature stages. ticks.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 65 espécies de carrapatos (MARTINS *et al.*, 2014) e, destas, *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899 (= *Amblyomma cooperi* Nuttall e Warbuton, 1908) (ACARI: IXODIDAE) desempenha importante papel na epidemiologia da Febre Maculosa (FM) para mamíferos (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

A espécie *A. dubitatum* encontra-se distribuída no Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil. No Brasil tem sido encontrado nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (GUGLIELMONE *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2004).

Os estágios parasitários tem elevada especificidade por capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae), contudo existem registros de larvas e ninfas parasitando antas, morcegos, bovinos e humanos (GUIMARÃES *et al.*, 2001; BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006; LABRUNA *et al.*, 2007), bem como cães, gatos e gambás (HORTA *et al.*, 2004).

Segundo Quadros *et al.*, (2013) as capivaras servem de hospedeiras para várias espécies de carrapatos e exercem importante papel como potenciais reservatórios de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB). As capivaras que nunca foram infectadas por *R. rickettsii*, ao serem parasitadas por carrapatos contaminados são responsáveis pela manutenção e amplificação da bactéria a novos carrapatos (SOUZA *et al.*, 2009). Apesar do *A. dubitatum* não transmitir o agente da FMB para o homem (SZABÓ, 2013), este carrapato apresenta importante papel como vetor enzoótico de riquetsias na natureza (TRAVASSOS e VALLEJO, 1942a,b; SAKAI *et al.*, 2014). Desse modo, pode ser realizada a transmissão da bactéria para o carrapato *Amblyomma cajennense*, considerado o principal vetor da FM (GUEDES *et al.*, 2005; LABRUNA & MACHADO, 2006).

O desafio no controle de populações de carrapatos em áreas de mata ciliar por meio da utilização de roçadeiras mecânicas embarga em limitações ecológicas. Sendo assim, a alternativa viável é o controle químico (SUCEN, 2004). Porém, a utilização de carrapaticidas sintéticos de forma indiscriminada e contínua pode acarretar a contaminação do ambiente e intoxicação de humanos e animais (ELLSE & WALL, 2013). Uma alternativa promissora ao uso desses produtos é a utilização de substâncias de origem vegetal que apresentam propriedades carrapaticidas (BORGES *et al.*, 2011). Na natureza, os óleos essenciais são produzidos através do metabolismo secundário de plantas aromáticas, formados por uma

mistura de substâncias, resultante da sinergia das moléculas que os constituem, com elevado desempenho na proteção contra predadores e patógenos (BAKKALI *et al.*, 2008).

O carvacrol é um dos maiores constituinte dos óleos essenciais de plantas aromáticas prioritariamente em espécies vegetais das famílias Lamiaceae e Verbenaceae. Possui forma líquida de coloração amarelo claro e praticamente insolúvel em água. Essa substância é um monoterpeno isômero do timol, possuindo um grupo hidroxila localizado em local diferente na estrutura molecular. Possui atividade comprovada contra bactérias (BOTELHO *et al.*, 2007; NOSTRO *et al.*, 2007), nematóides (NTALLI *et al.*, 2011), insetos (PAVELA, 2011) e ácaros (CAVALCANTI *et al.*, 2010). Sua ação carrapaticida foi comprovada contra as espécies *Rhipicephalus turanicus* (Pomerantzev, 1940) (KOC *et al.*, 2013), *Ixodes scapularis* (Say, 1821) e *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758) (JORDAN *et al.*, 2011), *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844) (CETIN *et al.*, 2010), *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (SENRA *et al.*, 2013a,b) e *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888) (NOVATO *et al.*, 2015). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência carrapaticida do carvacrol sobre larvas e ninfas não ingurgitadas de *A. dubitatum*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biologia do *Amblyomma dubitatum*

Carrapatos são ectoparasitos obrigatórios de vertebrados e de ampla distribuição. Atualmente existem aproximadamente 65 espécies descritas no Brasil (ANDREOTTI & KOLLER, 2013) e dentre essas, destaca-se o *A. dubitatum*. Sua distribuição concentra-se no sul da América do Sul estando presente na Argentina, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Brasil (regiões sudeste, centro-oeste e sul) (GUGLIELMONE *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2004). As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são consideradas os principais hospedeiros, sendo conhecido popularmente como carrapato-da-capivara (ARAGÃO, 1936).

Seu ciclo de vida é trioxeno (ARAGÃO, 1936) e as mudas ocorrem no ambiente. Labruna *et al.*, (2004) realizaram estudo em laboratório, em temperatura controlada de 27°C e relataram que as larvas permaneceram no hospedeiro preferencial por cerca de 4-11 dias, enquanto as ninfas permanecem por cerca de 4-9 dias e fêmeas permanecem em média de 6-14 dias. O ciclo de vida em laboratório foi completado em um período médio de 189,4 dias. A relação número de ovos/grama, encontrada por Chacón *et al.*, (2004) foi de 10.204 ovos.

Estudos avaliaram a distribuição sazonal dos estágios de vida livre de *A. dubitatum*. Na Argentina, Debárbora *et al.*, (2014) observaram que o pico de abundância de larvas é de maio a julho, ninfas de julho a outubro e adultos de novembro a março. A espécie apresenta padrões do ciclo de vida de uma geração por ano. Na região de Campinas-SP, Souza *et al.*, (2006) registraram que os picos populacionais de adultos ocorrem durante os meses de agosto a fevereiro, enquanto os estágios imaturos não foram identificados. Nas fronteiras entre os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, Szabó *et al.*, (2007) registraram que ninfas ocorrem durante o inverno e primavera, e adultos ocorrem durante a primavera e outono. Em Minas Gerais, Guedes e Leite (2008) observaram que o estágio adulto apresentou pico durante a primavera e verão e os estágios imaturos não foram identificados.

Lemos *et al.*, (1996) coletaram de uma capivara, um exemplar de *A. dubitatum* e isolaram uma riquetsia do grupo da FM, numa área endêmica da doença, na cidade de Pedreira, SP. O ocorrido enfatiza a importância secundária desse carrapato na epidemiologia

da FMB ao desempenhar papel relevante na manutenção e amplificação da bactéria *R. rickettsii*, agente etiológico da doença, na natureza (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

2.2 Substâncias de origem vegetal

Os óleos essenciais são compostos voláteis, possuem odor forte (BAKKALI *et al.*, 2008), são geralmente líquidos incolores ou levemente amarelados, com sabor ácido e picante, pouco estáveis em presença de luz, calor e ar, além de serem pouco solúveis em água. Em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso (SIMÕES & SPITZER, 1999; SAITO & SCRAMIN, 2000). Resultam de misturas complexas de substâncias obtidas a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Desempenham papel ecológico como atrativo para polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou servem como defensores químicos contra patógenos e predadores (CHAGAS, 2004). A extração dos compostos vegetais ocorre principalmente pelo método de destilação a vapor que consiste na evaporação e condensação de líquidos, a fim de produzir, refinar e concentrar óleos essenciais ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (BALANDRIN *et al.*, 1985; PENGELLY, 2004). Os principais constituintes dos óleos essenciais são os terpenóides ou terpenos e os fenilpropanóides. A concentração desses compostos nos óleos de uma mesma espécie vegetal pode variar de acordo com a estação do ano, hora do dia, condições de crescimento e composição genética da planta, de acordo com Pengelly *et al.*, (2004).

O carvacrol é um monoterpene isômero do timol, apresenta um grupo hidroxila localizado em local diferente na sua estrutura molecular. É o principal constituinte dos óleos essenciais de plantas aromáticas da família Lamiaceae com exemplos as espécies de *Rosmarinus* sp. (alecrim), *Salvia* sp. (sálvia), *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus* sp. (tomilho), *Ocimum* sp. (manjeriço), *Marjorana* sp. (manjerona), *Mentha* sp. (menta), *Satureja* sp. (segurelha), dentre outras e no óleo essencial da espécie *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) que pertence à família Verbenaceae, como em outras plantas do gênero *Lippia* (PENGELLY, 2004; NEVES, 2009).

Os óleos e alguns de seus componentes apresentam atividades antibacteriana, antifúngica e inseticida sendo, empregados na indústria de produtos sanitários, odontológicos,

agronômicos como pesticidas, preservadores, aditivos alimentares e remédios naturais, além da fabricação de perfumes e maquiagens (BAKKALI *et al.*, 2008).

2.3 Atividades do monoterpeno carvacrol

Alguns estudos relatam o efeito dos monoterpenos na redução da germinação de sementes e crescimento de plantas (EHLERS, 2004; GRONDAHL, 2008).

Langenheim (1994) declarou que os terpenos podem ter efeito inibidor ou estimulador no número de organismos associados incluindo plantas, herbívoros e microorganismos. Ehlers (2011) investigou se o efeito do carvacrol foi afetado pela presença de microorganismos do solo no desempenho de gramas associadas. A gramínea *Agrostis capillaris* é encontrada em pastos secos e co-ocorre com *Thymus pulegioides* e com *Thymus serpyllum*. *T. pulegioides* produz o carvacrol como o principal constituinte do seu óleo essencial (50–80% do total constituinte do óleo) (GRONDAHL *et al.*, 2008), enquanto em *T. serpyllum*, o carvacrol não é o composto majoritário (STAHL-BISKUP, 2002). No trabalho desenvolvido por Ehlers (2011), as plantas foram cultivadas em vasos individuais em combinação de dois tipos diferentes de tratamentos do solo: solo esterilizado tratado com carvacrol e não tratado com carvacrol e solo não esterilizado tratado com carvacrol e não tratado com carvacrol. Os resultados esclarecem que a taxa de sobrevivência de *A. capillaris* foi elevada em solo estéril e não estéril sem a presença do carvacrol e a biomassa das plantas foi reduzida em solo estéril tratado com carvacrol. Concluiu-se que a presença de microorganismos no solo pode minimizar o efeito negativo do monoterpeno no que refere ao desempenho de plantas associadas, enfatizando o importante papel desses agentes nessa interação.

O uso de extratos vegetais tem sido uma alternativa promissora no controle de pragas, devido principalmente à elevada diversidade vegetal brasileira, considerada uma das mais ricas do mundo (JACOBY *et al.*, 2002). O uso sem critérios técnicos de carrapaticidas sintéticos resulta na intoxicação de animais e de humanos, na contaminação do solo e de recursos hídricos. Devido a isso, tem aumentado a busca por novas alternativas de controle de carrapatos conforme Borges *et al.*, (2011). As razões que elucidam o crescente interesse por essas substâncias estão relacionadas à baixa toxicidade aos mamíferos e a curta persistência no ambiente. Muitas dessas substâncias constituem-se em complexos químicos que podem limitar a seleção de indivíduos resistentes (MIRESMAILLI *et al.*, 2006).

A respeito de estudos com carrapatos, pesquisas evidenciam a atividade dessa molécula sobre larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l e *Amblyomma cajennense* s.l (SENRA *et al.*, 2013a), larvas de *R. microplus* e *Dermacentor nitens* (SENRA *et al.*, 2013b), larvas e fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (CRUZ *et al.*, 2013), e ninfas de *I. scapularis* e *Amblyomma americanum* (DOLAN *et al.*, 2009; JORDAN *et al.*, 2011), larvas de *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens* (NOVATO *et al.*, 2015), larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Senra *et al.*, (2013a,b) comprovaram a atividade carrapaticida do carvacrol para larvas de *R. microplus* e *D. nitens*, larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* s.l. e *R. sanguineus* s.l, e alcançaram a eficiência de 100% na concentração de 2,5µl/ml para os estágios de larvas de *R. microplus*, *D. nitens* e *R. sanguineus* s.l e a eficiência de 100% na concentração de 5,0 µl/ml para larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* s.l..

Estudo realizado por Cruz *et al.*, (2013) investigou a atividade do óleo essencial de *Lippia gracilis* extraído de diferentes genótipos e de seus principais constituintes, timol e carvacrol, sobre larvas não ingurgitadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Para larvas, a concentração letal obtida para os isolados do óleo essencial do genótipo LGRA-201 apresentou valor de CL50 de 1,31 mg/mL e para fêmeas ingurgitadas o genótipo LGRA-106 apresentou valor de 4,66 mg/mL. Concentrações a partir de 4, 5, 8 e 10 mg/mL causaram mortalidade de 100% das larvas de *R. microplus* em todos os genótipos testados. Para larvas e fêmeas, respectivamente, carvacrol apresentou valores de CL50 de 0,22 e 4,46 mg/mL enquanto, timol foi de 3,86 e 5,50 mg/mL. Portanto, carvacrol foi mais eficiente que timol.

São escassas as investigações quanto a aplicação de substâncias de origem vegetal *in vivo*, porém, existem muitos estudos *in vitro*. No Brasil não foram realizadas pesquisas investigando a ação dessas substâncias por meio de aplicações no ambiente de pastagem. Em outros países, estudos com essa metodologia se tornaram realidade. Nos E.U.A., Dolan *et al.*, (2009) analisaram a eficácia do *nootkatone* sobre ninfas e adultos de *I. scapularis* e ninfas de *A. americanum* e do carvacrol sobre ninfas de *I. scapularis* e *A. americanum*. As investigações do primeiro estudo ocorreu em três anos e do segundo estudo em dois anos. A aplicação dos produtos foi realizada na concentração de 5%, e modo de aplicação realizada na vegetação utilizando pulverizador costal. No primeiro dia após o tratamento, os resultados foram de 100% de mortalidade de ninfas em ambas as espécies. O mesmo foi observado quando o *nootkatone* 5% foi aplicado sobre adultos de *I. scapularis*, entretanto, após 7 a 14 dias da aplicação, o percentual de controle diminuiu, indicando baixo poder residual. Uma solução encontrada pelos autores foi a utilização de bomba de alta pressão para a aplicação do

nootkatone, que foi capaz de manter o percentual de controle acima de 95% para as duas espécies após 42 dias de aplicação.

Jordan *et al.*, (2011) investigaram a eficiência de duas aplicações de acaricidas naturais derivados de plantas, *nootkatone*, carvacrol e EcoTrol T&O, no controle de ninfas de *I. scapularis* e *A. americanum* em aplicações no ambiente. O tratamento com carvacrol a 2% e do EcoTrol T&O resultaram na redução de ambas as espécies com mortalidade acima de 87% para o primeiro dia. A segunda aplicação elevou o percentual de controle que foi mantido acima de 85% por até 21 dias.

Araújo *et al.*, (2015) compararam os valores de CL50 em larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. utilizando carvacrol (1,76 mg/mL e 3,29 mg/mL), respectivamente. Assim, foi possível observar que *R. microplus* foi mais sensível a ação dessa substância, quando comparada a sensibilidade de larvas de *R. sanguineus* s.l..

Novato *et al.*, (2014) realizaram testes com larvas de *A. sculptum* e *D. nitens*, utilizando carvacrol e registraram a CL50 de 3,49 e 3,33 mg/mL, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP), da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizada no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Obtenção dos carrapatos

Os carrapatos utilizados no presente estudo foram coletados no estágio de larvas (N=198) e fêmeas (N=7) ingurgitadas em um espécime de capivara (macho, adulto) recém atropelado na rodovia MG 353 KM 100 (município de Matias Barbosa, Minas Gerais) e encaminhado à sede do IBAMA no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Os carrapatos foram retirados e encaminhados ao LAP para identificação específica, de acordo com as chaves dicotômicas descritas por Martins *et al.*, (2010) para ninfas, após a realização da muda das larvas, e Onofrio *et al.*, (2006) para adultos. As larvas ingurgitadas foram acondicionadas em seringas descartáveis com capacidade de 5 mL, com a extremidade distal cordada e vedada com algodão hidrófilo, na razão de 10 larvas/seringa. As larvas ingurgitadas foram observadas diariamente para a detecção do início da ecdise. As fêmeas ingurgitadas após limpas com pincel de cerdas macias, foram acondicionadas individualmente em placas de Petri medindo 5 cm de diâmetro. Larvas e fêmeas ingurgitadas foram mantidas em câmara climatizada, regulada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa superior a 80%, para a realização da muda e da postura, respectivamente. A cada três dias após o início da postura, os ovos de cada fêmea foram recolhidos, pesados, acondicionados em seringas e mantidos em condições semelhantes às larvas e fêmeas ingurgitadas. No presente trabalho foram utilizadas larvas não ingurgitadas, provenientes da postura das fêmeas ingurgitadas, e ninfas não ingurgitadas, provenientes da ecdise de larvas ingurgitadas, com aproximadamente 15 dias após eclosão e ecdise, respectivamente.

3.3 Obtenção e diluição das substâncias

O carvacrol utilizado nos testes foi adquirido comercialmente, da empresa Sigma-Aldrich®, com 99.9% de pureza. Para a diluição da substância foi utilizado solução hidroetanólica 70% e DMSO 3% para realização de testes com larvas e ninfas não ingurgitadas de *A. dubitatum*, respectivamente. A solução hidroetanólica 70% possui baixa toxicidade para larvas não ingurgitadas de *A. cajennense* s.l. (REZENDE *et al.*, 2012) enquanto DMSO 3% possui baixa toxicidade para ninfas não ingurgitadas de *A. cajennense* (CALMON *et al.*, 2013). Foram definidas as concentrações a serem testadas 2,5; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/mL, conforme utilizado por Senra *et al.*, (2013a) em testes com larvas e ninfas de *A. cajennense* s.l.

3.4 Testes

Para a realização dos bioensaios foi utilizado o teste de pacote de larvas (STONE & HAYDOC, 1962), adaptado por Monteiro *et al.*, (2012). Foram colocadas aproximadamente 100 larvas não ingurgitadas de *A. dubitatum* no centro de papel de filtro (Figura 1A) com dimensões 6 cm x 6 cm, e em seguida, foi dobrado ao meio e fechado nas laterais com clipe binder (Figura 1B). Posteriormente, cada lado do papel filtro foi umedecido com 90 µL das soluções com as concentrações a serem testadas (Figura 1C). Foi formado um grupo controle tratado com água e com solvente (etanol 70%); sendo que para cada tratamento foram feitas dez repetições. Após essa etapa, os envelopes contendo os carrapatos foram acondicionados em câmara climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$ com separação da câmara usada para substância e grupo controle (Figura 1D).

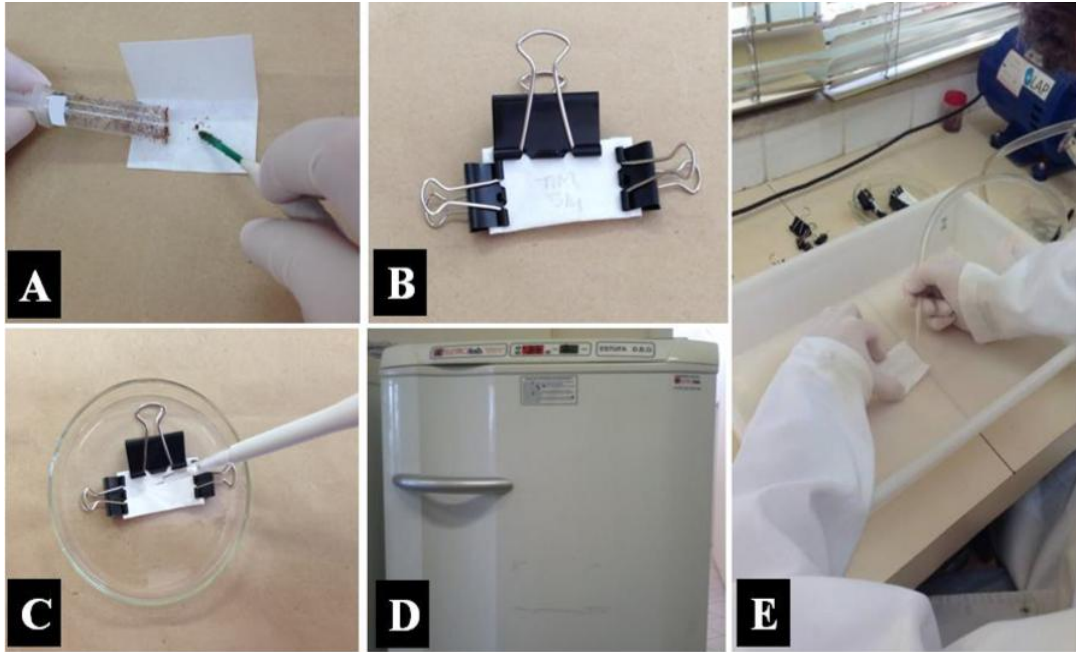


Figura 1. Realização do teste de pacote de larvas: Larvas não ingurgitadas sendo colocadas no centro de papel filtro com dimensão 6 cm x 6 cm; B: Papel filtro dobrado ao meio e fechado nas laterais com cliques binder; C: Papel filtro sendo umedecido com 90 μ L da solução testada em cada lado; D: Câmara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

Os mesmos procedimentos foram adotados para o teste com ninfas, sendo utilizadas cinco ninfas por pacote, conforme Senra *et al.*, (2013b). O acondicionamento das ninfas foi idêntico ao realizado com larvas. Foi formado um grupo controle tratado com água e com solvente (DMSO 3%); sendo realizadas sete repetições por grupo tratado.

A mortalidade foi avaliada após 24 horas com a contagem do número de larvas e ninfas vivas e mortas com a utilização de bomba de vácuo (Figura 1E). A porcentagem de mortalidade de cada pacote foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade (\%)} = (\text{total de indivíduos mortos} / \text{total indivíduos}) \times 100.$$

Em seguida foi feito o cálculo da média do percentual de mortalidade das repetições obtido em cada tratamento.

3.5 Análise estatística

Para a realização da análise estatística foi utilizado o software Biostat versão 5.0 (AYRES *et al.*, 2007). Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco}}$

seno x. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição paramétrica segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias entre as concentrações foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Student-Newman-Keulls, considerando significância de 5% ($P < 0,05$).

Para o cálculo das doses letais foi realizada a análise Probit, (FINNEY, 1971) utilizando o programa POLOPC[®] (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA, USA).

4 RESULTADOS

A mortalidade de larvas não ingurgitadas de *A. dubitatum* tratadas com a menor concentração de carvacrol foi 45,7%, sendo estatisticamente similar ($p>0,05$) para o grupo controle (Tabela 1). Observa-se que houve diferença estatística ($p<0,05$) a partir da concentração de 7,5 mg/mL em relação ao grupo controle. O percentual de mortalidade de 100% foi obtido a partir da concentração de 15 mg/mL, porém foi estatisticamente similar ($p>0,05$) a concentração de 7,5 mg/mL e 10 mg/mL. Já para ninfas não ingurgitadas, a menor concentração não resultou em mortalidade, alcançando percentual de mortalidade de 65,7% na concentração de 20 mg/mL (Tabela 1). À partir da concentração de 10 mg/mL houve diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao grupo controle.

Tabela 1 - Mortalidade de larvas e ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma dubitatum* tratadas com carvacrol em condições controladas ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{RH}>80\pm 10\%$).

Tratamentos	Larva não ingurgitada	Ninfa não ingurgitada
Controle H ₂ O	2,3 ^a \pm 3,15	2,90 ^a \pm 7,60
Controle Etanol 70%	9,27 ^a \pm 2,45	-
Controle DMSO 3%	-	5,7 ^{ac} \pm 9,8
2,5 mg/mL	45,70 ^{ac} \pm 35,50	0,00 ^a \pm 0,00
7,5 mg/mL	90,36 ^{bc} \pm 16,61	11,40 ^{ad} \pm 15,70
10 mg/mL	84,96 ^{bc} \pm 37,51	48,60 ^b \pm 36,30
15 mg/mL	100,00 ^b \pm 0,00	42,90 ^{bcd} \pm 43,90
20 mg/mL	100,00 ^b \pm 0,00	65,70 ^b \pm 25,10

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5% teste Kruskal-Wallis.

Na determinação da CL50, nos experimentos realizados com larvas e ninfas não ingurgitadas de *A. dubitatum*, foram observados valores de 2,81 mg/mL e 14,57 mg/mL, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentrações letais de 50% (CL50) de carvacrol sobre larvas e ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma dubitatum* em condições controladas ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$).

Estágios	Substância	CL50 (mg/mL)	Intervalo de confiança (95%)	Slope
Larvas não ingurgitadas	carvacrol	2,81	2,07-3,82	2,69
Ninfas não ingurgitadas	carvacrol	14,57	12,34-17,19	3,12

Slope = inclinação da reta.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a menor concentração de carvacrol apresentou similaridade ao resultado encontrado por Senra *et al.*, (2013a) para larvas de *A. cajennense* s.l.. Já para larvas de *R. sanguineus*, *R. microplus* e *D. nitens* a concentração de 2,5 mg/mL provocou mortalidade de 100%, respectivamente, conforme Senra *et al.*, (2013a,b). Estas discrepâncias deixam claro a diferença de susceptibilidade das diferentes espécies de carrapatos ao carvacrol.

No estudo de Senra *et al.*, (2013a) com *A. cajennense* s.l., a partir da concentração 5,0 µl/mL de carvacrol foi verificado percentual de mortalidade de 100%, em contraste com o resultado obtido no presente estudo a partir da concentração 7,5 mg/mL. A metodologia utilizada em ambos os estudos foi semelhante, porém a solubilização do carvacrol no presente trabalho foi em etanol 70°GL, enquanto Senra *et al.*, (2013 a) solubilizaram em etanol 50°GL. Uma vez que o grupo controle do presente trabalho, apresentou mortalidade de 9%, é plausível supor que o solvente tenha potencializado o efeito deletério do carvacrol sobre larvas de *A. dubitatum*, o que impede de fazer uma comparação mais precisa.

Na determinação da CL50 para larvas não ingurgitadas de *A. dubitatum* foi observado valor similar (3,49 mg/mL) para larvas de *A. sculptum*, com sobreposição dos intervalos de confiança registrado por Novato *et al.*, (2015).

Para os experimentos realizados com ninfas, a partir da menor concentração, Senra *et al.*, (2013a) registraram que o percentual de mortalidade de ninfas de *A. cajennense* s.l. foi superior a 60%, enquanto para *R. sanguineus* foi de 100%. No presente trabalho, a menor concentração não apresentou mortalidade, enquanto a maior concentração apresentou percentual de mortalidade de 65%, indicando que ninfas de *A. dubitatum* apresentam elevado grau de resistência à substância.

Uma vez que torna-se inviável realizar o controle de *A. dubitatum* sobre os hospedeiros primários, por serem semiaquáticos, é relevante que as pesquisas que objetivam investigar a atividade carrapaticida de substâncias de origem vegetal em aplicações no ambiente de pastagem se tornem realidade.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Carvacrol apresenta atividade carrapaticida sobre larvas e ninfas não ingurgitadas de *A. dubitatum* porém, a atividade carrapaticida foi mais eficiente sobre larvas não ingurgitadas.
- ✓ Os estágios imaturos de *A. dubitatum* são mais resistentes a atividade de carvacrol em comparação aos estágios imaturos de *A. cajennense* s.l..

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AYRES, M.; AYRES J. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Bioestat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 364p, 2007.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 31, n. 4, p. 759-845, 1936.

ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P.; ZERINGÓTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D.; SILVA, B. C.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, 30, 377–382, 2016.

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

BALADRIN, N. F.; KLOCKE, J. A.; WURTLE, E. S. & BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. **Science**, 228: 1154–1660, 1985.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Butantan, 223 p., 2006.

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

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

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

CAMARGO-NEVES, V. L. F. (coord). **Manual de vigilância acarológica**. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. São Paulo: A Secretaria, 2004.

CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, 101: 829–832, 2010.

CETIN, H.; CILEK, J. E.; OZ, E.; AYDIN, L.; DEVECI, O.; YANIKOGLU, A. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 170, 287–290, 2010.

CHACÓN, S. C.; FREITAS, L. H. T.; BARBIERI, F. S.; FACCINI, J. L. H. Relação entre peso e número de ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cooperi* Nuttall e Walburton, 1908 (Acari: Ixodidae) a partir de infestações experimentais em coelhos domésticos. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, 13(1): 6–12, 2004.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13(1): 156–160, 2004.

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

DEBÁRBORA, V. N.; MANGOLD, A. J.; OSCHEROV, E. B.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Study of the life cycle of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) based on field and laboratory data. **Experimental and Applied Acarology**, 63:93–105, 2014.

DOLAN, M. C.; JORDAN, R. A.; SCHULZE, T. L.; SCHULZE, C. J.; MANNING, M. C.; RUFFOLO, D.; SCHMIDT, J. P.; PIESMAN, J.; KARCHESY, J. J. Ability of two natural products, nootkatone and carvacrol, to suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme disease endemic area of New Jersey. **Journal of Economic Entomology**, 102(6): 2316–24, 2009.

EHLERS, B. K.; THOMPSON, J. Do co-occurring plant species adapt to one another? The response of *Bromus erectus* to the presence of different *Thymus vulgaris* chemotypes. **Oecologia**, 141: 511–518, 2004.

EHLERS, B. K. Soil microorganisms alleviate the allelochemical effects of thyme monoterpene on the performance of an associated grass species. **PLoS ONE**, 6(11): e26321, 2011.

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

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

GRONDAHL, E; EHLERS, B. K. Local adaptation to biotic effects: Reciprocal transplants of species associated with aromatic *Thymus pulegioides* and *T. serpyllum*. **Journal of Ecology**, 96: 981–992, 2008.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100: 841–845, 2005.

GUEDES, E.; LEITE, R. C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 17(S1): 78–82, 2008.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. In: International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases. **Atlanta**, Houten, 173 p., 2003.

HORTA, M. C; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 71:93–97, 2004.

JACOBY, C.; COLTRO, E. M.; SLOMA, D. C.; MULLER, J.; DIAS, L. A.; LUFT, M.; BERUSKI, P. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade rural de Guamirim, Município de Irati, PR. **Revista de Ciências Exatas e Naturais**, 4(1): 79–89, 2002.

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

QUADROS, R. M.; LAVINA, M. S.; MARQUES, S. M.; FRANÇA, M.; VERONEZI, W. R.; JÚNIOR, J. A. C. *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* em capivaras atropeladas em rodovias de Santa Catarina, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, 8(3):176–179, 2013.

KOC, S.; OZ, E.; CINBILGEL, I.; AYDIN, L.; CETIN, H. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari:Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 193, 316–319, 2013.

LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; TEIXEIRA, R.H.F. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. **Experimental and Applied Acarology**, 79–88, 2004.

LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti, D. M.; Arzua, M.; Bechara, G. H. (eds) Carrapatos de importância médica veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p. 155–164, 2006.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABO, M. P. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia belli* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(3):869–873, 2007.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M. ; MARTINS, T. F. ; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, 45, p. 1156–1159, 2008.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, 20: 1223–1280, 1994.

LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; SANSEERINO, S. R.; MOURA, A. Primary Isolation of Spotted Fever Group Rickettsiae from *Amblyomma cooperi* Collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 91(3): 273–275, May/Jun. 1996.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari:Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 1, 75–99, 2010.

MARTINS, T.F.; VENZAL, J.M.; TERASSINI, F.A.; COSTA, F.B.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, 62(1): 121–128, 2014.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) on Greenhouse tomato. **Journal of Economic Entomology**, 99: 2015–2023, 2006.

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

NASCIMENTO, E. M.; FORLONG, J.; PIMENTA, D. S.; PRATA, M. C. A. Efeito antihelmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematoides gastrintestinais de bovinos. **Ciência Rural**, 39(3): 817–824, 2009.

NEVES, Ana Paula. **Ensaio sobre controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* através de processos agroecológicos**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, Santa Catarina, 2009.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, 56: 519–523, 2007.

NOVATO, T. P. L.; ARAÚJO, L. X.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; MATOS, R. 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**, 212: 331–335, 2015.

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.

ONOFRIO, V. C., LABRUNA, M. B., PINTER, A., GIACOMIN, F. G., BARROS-BATTESTI, D. M. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. In: BarrosBattesti, 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. 53–113, 2006.

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

PENGELLY, A. The constituents of medical plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. Segunda edição, Allen&Unwin, Austrália, 2004.

RESENDE, J. D. S. A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. ; MATURANO, R. ; PRATA, M. C. A. ; RODRIGUES, A. F. S. F. . Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, 131: 139–142, 2012.

SAKAI, R. K.; COSTA, F. B.; UENO, T. E. H.; RAMIREZ, D. G.; SOARES, J. F.; FONSECA, A. H.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 5, 917–923, 2014.

SAITO, M. L. & SCRAMIN, S. Plantas Aromáticas e seu Uso na Agricultura. Jaguariúna. **Embrapa Meio Ambiente**. 2000.

SIMÕES, C. M. O. & SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre. Ed. da UFRGS; Florianópolis. Ed. Ed. da UFSC. 1999. pp. 387–415.

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

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

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES-NETO, E. J.; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **CIENCIA RURAL**, 36(3): 887–891, 2006.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGREZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S. L.; BORBA, R. C. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, 161: 116–121, 2009.

STAHL-BISKUP, E. Essential oil chemistry of the genus *Thymus* – a global view. In: Stahl-Biskup E, Saez F, eds. Thyme: The genus *Thymus* London: Francis & Taylor. pp 75–124, 2002.

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

SZABÓ, M. P. J.; CASTRO, M. B.; RAMOS, H. G. C.; GARCIA, M. V.; CASTAGNOLLI, K. C.; PINTER, A. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in

the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 143(2): 147–154, 2007.

SZABÓ, M. P. J. Ecologia e biologia dos carrapatos de capivaras: aspectos relevantes para a epidemiologia da febre maculosa. In: **Febre maculosa: dinâmica da doença, hospedeiros e vetores**, p. 95–103, 2013.

TRAVASSOS, J. & VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da Febre Maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Memórias Instituto Butantan**, 15: 73–86, 1942a.

TRAVASSOS, J. & VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. **Memórias Instituto Butantan**, 15: 87–90, 1942b.

VIEIRA, A. M. L.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C.; SOUZA, S. S. L.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Manual de Acarologia do Estado de São Paulo**. São Paulo, SUCEN, 62 p, 2004.