



RAQUEL ROMANO PALMEIRA GONÇALVES

**ACARICIDAL ACTIVITY AND REPRODUCTIVE EFFECTS OF
ACETYLCARVACROL ON *Rhipicephalus microplus* TICKS
(CANESTRINI, 1888) (ACARI: IXODIDAE)**

LAVRAS-MG

2019

RAQUEL ROMANO PALMEIRA GONÇALVES

**ACARICIDAL ACTIVITY AND REPRODUCTIVE EFFECTS OF
ACETYLCHOLINE ON *Rhipicephalus microplus* TICKS (CANESTRINI, 1888)
(ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof (a). Dr (a). Ana Paula Peconick

Orientadora

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio

Coorientador

LAVRAS-MG

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados
pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Gonçalves, Raquel Romano Palmeira.

Acaricidal Activity And Reproductive Effects Of
Acetylcarvacrol On *Rhipicephalus Microplus* Ticks
(Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) / Raquel Romano
Palmeira Gonçalves. - 2019.

70 p.

Orientador(a): Ana Paula Peconick.

Coorientador(a): Rafael Neodini Remedio, Sérgio
Scherrer Thomasi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal
de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Controle do carrapato-do-boi. 2. Produtos naturais. 3.
Acetilcarvacrol. I. Peconick, Ana Paula. II. Remedio, Rafael

RAQUEL ROMANO PALMEIRA GONÇALVES

**ACARICIDAL ACTIVITY AND REPRODUCTIVE EFFECTS OF
ACETYL CARVACROL ON *Rhipicephalus microplus* TICKS (CANESTRINI, 1888)
(ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de julho de 2019

Dr. Rafael Neodini Remedio UFLA

Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante UFLA

Dra. Elizangela Guedes UNIFENAS

Dra. Ana Paula Peconick

Orientadora

LAVRAS-MG

2019

Dedico este trabalho aos meus pais.

Sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de concluir este trabalho e por todas as misericórdias concedidas diariamente para que eu pudesse chegar onde estou.

Aos meus pais José Carlos e Fernanda Romano por todo suporte concedido.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus queridos orientadores Ana Paula Peconick e Rafael Neodini Remedio por terem me dado a chance de participar desse maravilhoso projeto de pesquisa e por todos os seus ensinamentos, dedicação, carinho e incentivos depositados em mim durante toda minha caminhada.

Ao Samuel Lucas Gomes por todas as coletas de carrapatos de sua fazenda, sem os quais este projeto de pesquisa não teria sido se quer iniciado e a todos os outros amigos que também realizaram esse serviço com a única motivação de me ajudar.

Aos meus amigos de projeto, núcleos de estudos, colegas de disciplinas que tornaram essa etapa da minha vida mais tranquila, engraçada e leve.

Aos demais membros da minha banca, Joziana Muniz de Paiva Barçante e Elizangela Guedes por terem aceitado de bom grado o convite de banca proposto.

Enfim, só tenho de agradecer a todos que contribuíram não só apenas para a conclusão deste trabalho, mas também para meu crescimento pessoal e profissional!

Se eu pudesse, ainda voltava no tempo só para viver todas as felicidades que esta etapa da minha vida me propôs.

Mestrado UFLA, foi tudo muito, muito bom! OBRIGADA!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

RESUMO

Rhipicephalus microplus, conhecido como carrapato-do-boi, é responsável por grandes prejuízos em seus hospedeiros preferenciais, estando associado a perdas de produtividade no setor agropecuário. Sua principal forma de controle é realizada por meio da utilização de produtos acaricidas químicos sintéticos convencionais. O uso destes impacta negativamente a saúde dos trabalhadores do setor, podendo afetar também os consumidores de carne e leite e o ecossistema devido a contaminação de solos e rios. Além disso, o uso indiscriminado desses produtos tem acelerado o processo de seleção de espécies resistentes, cujo relato de resistência às principais bases químicas está presente em diversos locais do mundo. Diante de todas as dificuldades encontradas no seu controle, é imprescindível realizar pesquisas sobre alternativas ecologicamente adequadas e práticas com a finalidade de proporcionar estratégias que estejam alinhadas com o conceito de Saúde única. As pesquisas sobre o carvacrol, um princípio ativo extraído de óleos essenciais presente em diversas famílias de plantas, têm demonstrado seu potencial acaricida, bem como a elevação de suas atividades biológicas após a realização de alterações em sua estrutura molecular. Neste contexto, o acetilcarvacrol, um derivado semissintético do carvacrol, se apresenta como uma alternativa promissora. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial acaricida do acetilcarvacrol, diluído em DMSO a 3% em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como avaliar seus efeitos na reprodução destes carrapatos. Para isto, as fêmeas foram submetidas ao acetilcarvacrol mediante o Teste de Imersão em Adultos (TIA) e a mortalidade foi avaliada durante 7 dias. Ao final deste período, foi determinada a concentração letal média (CL50) por meio da análise de Probit. Para verificar os efeitos no desempenho reprodutivo, as fêmeas foram submetidas novamente ao TIA e foram divididas em 5 grupos experimentais: dois grupos controle (C1 e C2), nos quais as fêmeas foram expostas à água destilada e ao solvente (DMSO a 3%) respectivamente, e 3 grupos de tratamento (T1, T2, T3), nos quais os parasitos foram expostos às concentrações de 3,7 μ L/mL, 4,62 μ L/mL e 5,0 μ L/mL de acetilcarvacrol diluído em DMSO a 3%. Os seguintes parâmetros foram analisados: peso das fêmeas, peso total da massa de ovos para cada fêmea, período pré-oviposição, período de incubação, taxa de eclosão. A partir desses valores foram determinados: o índice de produção de ovos, a taxa de fecundidade, a reprodução estimada, as porcentagens de redução da oviposição e eclosão, bem como a eficácia do produto. A CL50 determinada foi de 4,62 μ L/mL e o grupo tratamento de 5,0 μ L/mL apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo exposto à água destilada quanto ao peso médio da massa de ovos, índice de produção de ovos, taxa de eclosão, taxa de fecundidade e período de pré-oviposição. A eficácia dos grupos T1, T2 e T3 foi de 60,56%, 55,81% e 91,69%, respectivamente, demonstrando, assim, que o composto além de apresentar potencial acaricida, afeta a reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em concentrações subletais.

Palavras-chaves: Produtos Naturais. Controle. Ectoparasito. Eficácia. Acetilação. Bovinos

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus, known as cattle tick, is responsible for important injuries in its preferred hosts, being associated with productivity losses in the agricultural sector. The use of conventional synthetic chemical acaricides is the primary way to control this tick. However, their application negatively impacts the health of workers in this sector and may also affect meat and milk consumers and the ecosystem due to contamination of soils and rivers. In addition, the indiscriminate use of these products has accelerated the selection of resistant species, and reports of resistance to the main chemical bases are present in several countries. Given all the difficulties found in control of ticks, it is essential to conduct research on ecologically appropriate and practical alternatives in order to provide strategies aligned with the concept of unique health. Research on carvacrol, an active ingredient extracted from essential oils found in several plant families, has demonstrated its acaricidal potential as well as the elevation of its biological activities after making changes in its molecular structure. In this context, acetylcarvacrol, a semi-synthetic derivative of carvacrol, is considered a promising alternative. Thus, the aim of this study was to evaluate the acaricidal potential of acetylcarvacrol diluted in 3% DMSO in engorged females of *R. microplus* as well as to analyze its effects on reproduction. For this, females were submitted to acetylcarvacrol by the Adult Immersion Test (AIT) and mortality was evaluated for 7 days. At the end of this period, the median lethal concentration (LC50) was determined by Probit analysis. In order to verify the effects on reproductive performance, females were submitted again to AIT and were divided into 5 experimental groups: two control groups (C1 and C2), in which females were exposed to distilled water and solvent (3% DMSO) respectively, and 3 treatment groups (T1, T2, T3), in which the parasites were exposed to 3.7 μ L/mL, 4.62 μ L/mL and 5.0 μ L/mL of acetylcarvacrol diluted in 3% DMSO. The following parameters were analyzed: female weight, total egg mass weight for each female, pre-oviposition period, incubation period and hatching rate. From these values, the following parameters were determined: egg production index, fecundity rate, estimated reproduction, percentages of reduction in oviposition and hatching and product efficacy. The LC50 determined was 4.62 μ L/mL and the treatment group of 5.0 μ L/mL showed significant differences ($p < 0.05$) regarding the average egg mass weight, egg production index, hatching rate, fecundity rate and pre-oviposition period, when compared to the group exposed to distilled water. The product efficacies for groups T1, T2, T3 were 60.56%, 55.81%, 91.69% respectively, thus demonstrating that this compound affects the reproduction of *R. microplus* engorged female ticks at sublethal concentrations, besides having acaricidal potential.

Keywords: Natural Products. Control. Ectoparasite. Efficiency. Acetylation. Cattle

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema simplificado de <i>Rhipicephalus microplus</i> . Fase parasitária: 1) larva infectante realizando a fixação no bovino; 2) ninfa; 3) teleógena em estágio final de ingurgitamento. Fase de vida livre: 4) teleógena logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5) ovos, no solo, em período de incubação; 6) larva, no solo, em período de incubação.....	21
Figura 2 - Processo de acetilação do carvacrol por meio da reação com anidrido acético e hidróxido de sódio.....	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Atividades identificadas de acetilcarvacrol em suas respectivas espécies alvos encontradas na literatura em ordem cronológica de publicação.....	29
Quadro 2 - Atividades acaricidas de acetilcarvacrol em <i>Rhipicephalus microplus</i> encontradas na literatura em ordem cronológica de publicação.....	30
Quadro 3 - Atividades de acetilcarvacrol em camundongos encontradas na literatura em ordem cronológica de publicação.....	31

LISTA DE GRÁFICO

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 2

Gráfico 1 - Eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C), e porcentagens de redução da oviposição e eclosão (%Rovip e %Reclo) nos grupos tratados com o solvente (DMSO 3%) e com diferentes concentrações subletais de acetilcarvacrol, em comparação ao grupo controle água.....64

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Table 1 - Percentage of dead *Rhipicephalus microplus* engorged female ticks exposed to different concentrations of carvacrol acetate (n = 350).....46

Table 2 - Mean percentage of mortality and knockdown (\pm standard deviation) of *Rhipicephalus microplus* engorged female ticks treated with carvacrol acetate in the three replicates.....47

ARTIGO 2

Tabela 1- Peso médio das fêmeas antes da oviposição (PF), peso da massa de ovos (PM), índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE), taxa de fecundidade (TF), período pré-oviposição (PPO), período de incubação (PI), porcentagem de redução da oviposição e da eclosão (%Rovip e %Reclo), e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) do acetilcarvacrol diluído em DMSO 3% e aplicado em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em concentrações subletais.....63

LISTA DE SIGLAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
ABDI	Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
AIT	Adult Immersion Test
CL50	Concentração Letal para 50%
CL90	Concentração Letal para 90%
DL10	Dose Letal 10%
DL50	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMBRAPA	Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPO	Índice de produção de ovos
LC50	Lethal Concentration for 50%
LC90	Lethal Concentration for 90%
LC99	Lethal Concentration for 99%
OP	Organofosforados
PF	Peso da fêmea
PI	Período de incubação
PIB	Produto Interno Bruto
PM	Peso da massa de ovos
PPO	Período de Pré-oviposição
RE	Reprodução Estimada

LISTA DE SIGLAS

SP	Piretróides Sintéticos
TE	Taxa de eclosão
TF	Taxa de fecundidade
TIA	Teste de Imersão em Adultos
USDA	United States Department Of Agriculture Foreign Agricultural Service
%C	Eficácia ou Porcentagem de Controle
%Reclo	Porcentagem de Redução da Eclosão
%Rovip	Porcentagem de Redução da Oviposição

Sumário

PRIMEIRA PARTE.....	15
REFERENCIAL TEÓRICO DE <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 O setor de bovinocultura no Brasil.....	18
2.2 <i>Rhipicephalus microplus</i> , o carrapato-do-boi	19
2.3 Prejuízos econômicos causados pelo carrapato-do-boi	21
2.4 Acaricidas como método de controle	22
2.5 Fitoterápicos e sua atividade acaricida	24
2.6 Carvacrol.....	25
2.7 Acetilcarvacrol	27
2.8 O solvente Dimetilsulfóxido (DMSO).....	32
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
4. REFERÊNCIAS.....	33
SEGUNDA PARTE.....	40
ARTIGO 1	40
Acaricidal activity and effects of acetylcarvacrol on <i>Rhipicephalus microplus</i> (Canestrini, 1888) engorged female ticks (Acari: Ixodidae).....	41
1. Introduction	42
2. Material and methods	43
3. Results	45
4. Discussion	47
5. References	50
ARTIGO 2.....	55
Baixas concentrações de acetilcarvacrol resultam em elevada eficácia no controle do carrapato-do-boi, <i>Rhipicephalus microplus</i> (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)	56
1. Introdução	58
2. Material e métodos	59
3. Resultados	61
4. Discussão	64
5. Referências	67

PRIMEIRA PARTE

REFERENCIAL TEÓRICO DE *Rhipicephalus microplus*

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os ectoparasitos de bovinos, o carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) é o principal causador de perdas econômicas no setor pecuário do Brasil (GRISI et al., 2014), sendo considerado uma das principais pragas que assolam os bovinos no país (PEREIRA; SOUZA; BAF, 2010). Esta espécie de carrapato está amplamente distribuída no mundo, causando grandes prejuízos no setor pecuário em países de clima tropical e subtropical (FERRAZ et al., 2010; EVANS et al., 2000). Por apresentar a maior parte do seu território localizado na zona tropical, o Brasil possui características climáticas que permitem o desenvolvimento e sobrevivência desse ectoparasito (EVANS, 1992; GRISI et al., 2014).

Os prejuízos econômicos gerados estão relacionados principalmente a menor produtividade dos bovinos tanto na produção de leite como na de carne e também com perdas associadas a depreciação do couro. Aos custos que se elevam quando se consideram as mortes dos animais devido aos patógenos transmitidos por esses carrapatos e aos custos relacionados aos tratamentos veterinários (JONSSON, 2006; TIRLONI et al., 2014).

Devido às perdas econômicas consideráveis, os acaricidas químicos sintéticos são amplamente utilizados como método de controle (PETERMANN et al., 2016). No entanto, os organofosforados (OP) e os piretroides sintético (SP), que representam classes de acaricida químico sintético mais comumente utilizadas (CETIN et al., 2010; SILVA; MOREIRA; PERES, 2012), são também considerados os que apresentam mais efeitos tóxicos (SILVA; MOREIRA; PERES, 2012). Além disso, já foram relatados casos de resistência a essas duas classes em *R. microplus* em diversos países da África, Oceania, América do Norte e Latina (GEORGE et al., 2004).

O uso intensivo desses compostos no controle de carrapato no gado gera centenas de galões de resíduo, pois são utilizados 3 a 4 litros de solução por animal (GROMBONI et al., 2007). Além do mais, constantemente, os resíduos são descartados de forma indiscriminada (GROMBONI et al., 2007). Portanto, é evidente que o uso de acaricidas químicos sintéticos ocasiona contaminação de solos e água. Ademais, estes produtos ameaçam a saúde humana quando presentes como resíduo na carne e no leite ou devido ao contato direto com trabalhadores rurais que os utilizam (LEAL et al., 2003).

Para o controle de artrópodes a comunidade científica enfatiza estratégias que estejam alinhadas com o conceito de *One Health*, ou seja, são aquelas que priorizam a saúde humana e animal e o meio ambiente de forma que nenhum deles sejam prejudicados (BENELLI;

DUGGAN, 2018). Portanto, é necessário desenvolvimento de alternativas que estão de acordo com os princípios de uma agricultura sustentável (LAING et al., 2018).

Devido aos problemas enfrentados no controle dos carrapatos, o uso de produtos obtidos a partir de plantas se tornou uma alternativa viável, pois possuem rápida degradação quando comparados aos acaricidas químicos sintéticos e apresentam reduzido impacto ambiental (JORGE et al., 2008). As plantas como acaricidas podem, inclusive, ser uma alternativa para o controle de cepas resistentes (ADENUBI et al., 2016).

A pesquisa sobre extratos de plantas com atividade acaricida a fim de substituir os químicos sintéticos tem crescido nos últimos anos (ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Mais especificamente tem se estudado o uso de óleos essenciais de vegetais, como os óleos oriundos das plantas da espécie *Derris floribunda* (AMARAL et al., 2017), *Lippia sidoides* (CAVALCANTI et al., 2010), *Allium sativum* L (MOSSA et al., 2017) entre outras (ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Ainda, outros estudos demonstraram efeito acaricida de extratos de plantas em *R. microplus* (FERREIRA et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2018; LAGE et al., 2013; MONTEIRO et al., 2017; PEREIRA-JUNIOR et al., 2019).

Quando se utiliza extratos de plantas em um experimento, a concentração de seus princípios ativos pode apresentar grandes variações em decorrência das condições sazonais e geográficas (FERRAZ et al., 2010; LIMA et al., 2017). Além do mais, a metodologia de extração dos seus compostos não é padronizada e em muitos trabalhos não se sabe quais dos compostos secundários possuem atividade acaricida (ADENUBI et al., 2016; ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Desse modo, o uso de princípios ativos puros já extraídos de plantas torna-se uma alternativa mais viável para controle de carrapatos, considerando o fato de refletirem uma maior veracidade quanto a atividade acaricida nos experimentos.

Pesquisas com o princípio ativo carvacrol, presente nos óleos essenciais de diversas famílias de plantas, e seu derivado, acetilcarvacrol, comprovaram seu potencial acaricida em *R. microplus* (SENRA et al., 2013; NOVATO et al., 2018), e também a capacidade de afetar o desempenho reprodutivo desses parasitos (PEREIRA JUNIOR et al., 2019). Em busca de melhorar a atividade biológica de produtos naturais e reduzir sua toxicidade em hospedeiros mamíferos, pesquisadores tem modificado esses compostos (MESQUITA et al., 2018). Nesse contexto, diversos trabalhos compararam o carvacrol e o seu derivado acetilcarvacrol em *R. microplus* em busca de averiguar possível aumento da atividade acaricida (NOVATO et al., 2018; RAMÍREZ et al., 2013; RAMÍREZ et al., 2016).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial acaricida do acetilcarvacrol diluído em DMSO a 3% em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e seus efeitos subletais no desempenho reprodutivo destes parasitos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O setor de bovinocultura no Brasil

O Brasil é o maior exportador e segundo maior produtor de carne bovina do mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES-ABIEC, 2018; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE - USDA, 2019). A produção de carne bovina elevou-se em 4,05 vezes nos últimos 42 anos (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA, 2019). Este aumento é consequência do resultado dos avanços tecnológicos na cadeia produtiva e no sistema de produção do setor (GOMES et al., 2017). No primeiro trimestre de 1997 foram abatidos cerca de 3,51 milhões de cabeças de gado e, no primeiro trimestre de 2019, esse número aumentou para 7,89 milhões. Houve um aumento de 3,4% no número de cabeças bovinas abatidas em 2018 em relação à 2017, representando a segunda alta consecutiva na série histórica anual (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2019). Com relação à economia nacional, a exportação de carne bovina representa cerca de 3% das exportações nacionais e gera um rendimento de 6 bilhões de reais por ano. Além disso, este setor representa cerca de 6% do Produto Interno Bruto (PIB) ou 30 % do PIB do agronegócio (GOMES et al., 2017).

Nos últimos anos, a atividade leiteira no país desenvolveu-se de forma consistente, refletindo no aumento de sua produção. Consequentemente o país se posicionou em lugar de destaque no mundo (ROCHA; CARVALHO, 2018). A produção de leite no Brasil também aumentou de 5 vezes nas últimas décadas, pois os valores de litros de leite foram de 7,1 bilhões para mais de 35,1 bilhões no período de 1974 a 2014 respectivamente (ROCHA; CARVALHO, 2018). No entanto, em 2018, a aquisição de leite manteve um crescimento de 0,5% em relação à 2017 e os laticínios sob inspeção sanitária produziram cerca de 24,45 bilhões de litros (IBGE, 2019). Com relação a produção de couro, o país possui um papel relevante na produção mundial (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL- ABDI, 2011) e sua

aquisição nacional cresceu 3% em 2018 em relação a 2017, alcançando um número de 1,03 milhões de peças inteiras de couro (IBGE, 2019).

Devido à expansão do mercado consumidor de carne bovina e seus derivados no país, pode-se inferir que o setor de bovinocultura exerce extrema relevância para economia nacional. Além disso, outro fator que contribui para essa expansão do setor no Brasil é a grande área territorial nacional (CHAGAS et al., 2016).

2.2 *Rhipicephalus microplus*, o carrapato-do-boi

A nomenclatura do carrapato-do-boi foi modificada em 2002, pois o gênero *Rhipicephalus* foi considerado parafilético ao gênero *Boophilus*, dessa forma, este foi incluso como um subgênero de *Rhipicephalus* (BARKER; MURRELL, 2002). Estes parasitos são hematófagos obrigatórios, pertencentes à família Ixodidae, sendo classificado como carrapatos duros devido a presença de um escudo na região anterodorsal (BRITES-NETO; RONCATO; MARTINS, 2015; SENBILL et al., 2018). As fêmeas adultas possuem formato oval e alongado, o seu comprimento é de aproximadamente 1,9-2,5mm e na região anatômica de maior largura medem aproximadamente 1,1-1,6mm. Apresentam 8 coxas subtriangulares e um *esculptum* longo com superfície granular e na região ventral há presença de cerdas densas que se distribuem uniformemente (LONDT; ARTHUR, 1975). O carrapato-do-boi possui uma excelente adaptação ao seu hospedeiro preferencial, o bovino, acompanhando-o durante o seu movimento natural ou induzido pelo homem (BARRÉ; UILENBERG, 2010; EVANS et al., 2000). No entanto, podem parasitar com menor frequência os equinos, os animais domésticos e os silvestres (BARRÉ; UILENBERG, 2010; JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Segundo Labruna et al. (2009), existe a hipótese de que, no mínimo, há duas espécies diferentes que são nomeadas como *R. microplus*, pois o cruzamento entre cepas australianas, moçambicanas e argentinas foram inférteis enquanto que o cruzamento entre as argentinas e moçambicanas foram férteis. Ainda, a análise genética do DNA mitocondrial aponta que, possivelmente, as cepas australianas diferem das asiáticas, africanas e americanas. Os autores sugerem que as linhagens americanas e africanas devem ser redefinidas como *R. microplus* (Canestrini, 1888) e as linhagens australianas como *R. australis* (Fuller, 1899). Supõe-se que *R. microplus* de origem indiana e do Nepal foram importados para a África e para as Américas. Já *R. australis*, originário da Indonésia, foram transferidos para Austrália e posteriormente para Nova Caledônia. Atualmente, o complexo *R. microplus* está presente no sul e leste da Ásia, leste e sul da África, América central e do sul, norte e leste da Austrália, sendo a espécie de

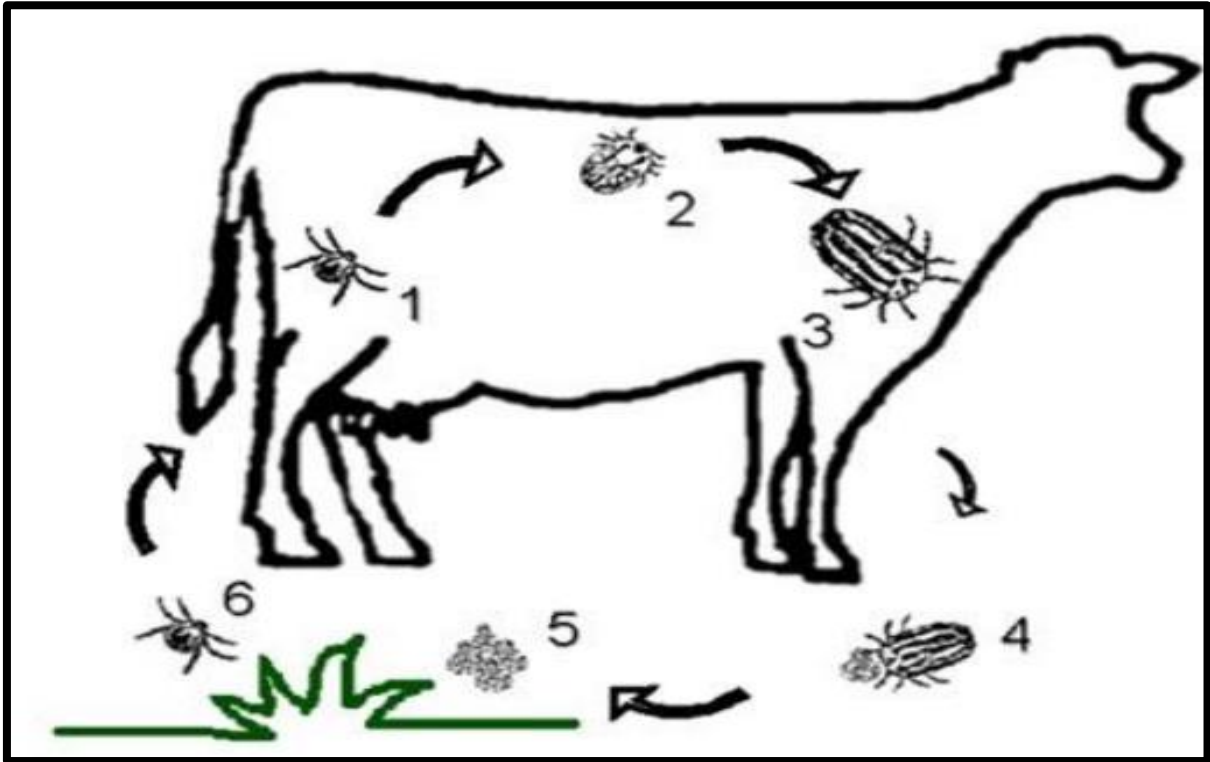
carrapato mais amplamente distribuída no mundo (BARRÉ; UILENBERG, 2010). No Brasil este parasito está presente o ano inteiro na região Central, Sudeste e Centro-Oeste devido às condições ótimas de temperatura e umidade (FURLONG; SOUZA; AZEVEDO, 2003).

Seu ciclo de vida pode ser dividido em duas fases, a não parasitária; relacionada ao período de vida fora do hospedeiro (não alimentar) e a parasitária que consiste na fase de vida no hospedeiro (alimentar) (SENBILL et al., 2018). O ciclo monoxênico dura cerca de três semanas - desde larvas em jejum a fêmeas ingurgitadas (FIGURA 1) (ANDREOTTI et al., 2002; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Quando a fêmea ingurgitada se desprende do seu hospedeiro, busca um ambiente que seja protegido da luz solar direta a fim de realizar a oviposição (PEREIRA; SOUZA; BAF, 2010). A fêmea produz grandes quantidades de ovos (cerca de 3.000), e logo em seguida morre (FURLONG; SOUZA; AZEVEDO, 2003; JONGEJAN; UILENBERG, 1994; OLIVER, 1989).

Após aproximadamente 4 semanas ocorre a eclosão. A larva, que possui geotropismo negativo, garante seu lugar nas extremidades das folhas da pastagem a procura de um hospedeiro. Antes, precisam permanecer 3 a 5 dias no local de eclosão para o endurecimento da quitina. Ao encontrar o bovino, o parasito migra em direção à região posterior das coxas, perineal, perianal, perivulvar e face interna das “pinas”. Então, a larva, ao se alimentar do sangue do bovino, realiza a ecdise para ninfa, após 7 dias. Posteriormente, decorridos mais 7 dias, após a alimentação, realiza mais uma ecdise, na qual ocorre a diferenciação sexual em macho e fêmea. Quando adulta, a fêmea após a cópula aumenta o consumo sanguíneo, chegando ao limite máximo de ingurgitamento. Ao atingir esse limite, desprende-se do seu hospedeiro, e após 2 a 3 dias metabolizando os nutrientes adquiridos no sangue, inicia-se a oviposição e o ciclo se repete (FURLONG; SOUZA; AZEVEDO, 2003; PEREIRA; SOUZA; BAF, 2010). Quanto aos machos, estes permanecem mais tempo no animal onde continuam se reproduzindo (JONGEJAN; UILENBERG, 1994).

Em condições laboratoriais padronizadas, utilizando-se coelhos como animal experimental, as médias em dias do período pré-oviposição, oviposição e pré-eclosão das fêmeas ingurgitadas foram de 4,1, 8,6, 21 respectivamente e a taxa de eclosão de 83,5% (SENBILL et al., 2018). Alguns parâmetros reprodutivos como taxa de eclosão, número de ovos por fêmeas e peso da massa de ovos apresentam diferenças significativas entre fêmeas alimentadas em bovinos e em coelhos (MA et al., 2016).

Figura 1: Esquema simplificado do ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*. Fase parasitária: 1) larva infectante realizando a fixação no bovino; 2) ninfa; 3) teleógena em estágio final de ingurgitamento. Fase de vida livre: 4) teleógena logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5) ovos, no solo, em período de incubação; 6) larva, no solo, em período de incubação.



Fonte: Adaptado de Andreotti et al. (2002)

2.3 Prejuízos econômicos causados pelo carrapato-do-boi

O lucro das atividades pecuárias no Brasil pode ser reduzido consideravelmente devido à presença de ectoparasitos no gado, sendo o carrapato-do-boi o maior responsável por essa redução (GRISI et al., 2014). A maioria da população de bovinos no mundo está exposta a doenças causadas por carrapatos o que pode ocasionar prejuízos (LEW-TABOR;VALLE, 2016). Segundo Lew-Tabor e Valle (2016), levando em consideração as taxas inflação (52,3%) entre 1996 a 2015, é provável que, atualmente, essa estimativa alcance US\$ 22-30 bilhões por ano.

Apesar de apresentarem peças bucais curtas, os danos causados por *R. microplus* na pele de seus hospedeiros são consideráveis. Em regiões anatômicas relevantes para o aproveitamento do couro, por exemplo, podem causar danos consideráveis, visto que essas são as regiões de sua predileção (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Ademais, existem outras implicações no hospedeiro, como a transmissão de hemoparasitoses (*Babesia spp.* e *Anaplasma*

marginale) devido aos seus hábitos alimentares (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Além disso, o aparecimento de anemia, perda de peso, morte de animais susceptíveis, debilitação devido à perda de sangue e lesões na pele que predispõem até 4 vezes mais ao desenvolvimento de miíases também podem ser observadas (JONSSON, 2006; RECK et al., 2014). Segundo o experimento de Jonsson et al. (1998), vacas sem a presença de carrapatos produziram 2,86 litros de leite e 0,14kg de manteiga diários a mais do que aquelas infestadas. Os autores estimaram que cada fêmea ingurgitada de *R. microplus* foi responsável pela perda de 8,9 ml de produção diária de leite e 1,0 grama de peso corporal durante as quinze semanas de teste.

Já no Brasil, segundo Grisi et al. (2014), as perdas potenciais esperadas na ausência de alguma medida de controle do parasito foram estimadas em mais de 3,24 bilhões de dólares anualmente. Os autores consideraram o número de animais susceptíveis e os dados disponibilizados sobre perdas de produtividade leiteira e ganho de peso de bovinos de corte.

Dentre todos os grupos de vetores artrópodes, os carrapatos possuem a maior capacidade de transmitir uma variedade de micro-organismos patogênicos, como protozoários, rickettsias, espiroquetas e vírus (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). No caso de *R. microplus*, este possui o principal papel na cadeia epidemiológica da babesiose bovina pois é o transmissor exclusivo de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* na América Latina, que é endêmica na grande parte do território do Brasil (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005). O carrapato também é responsável pela transmissão de *Anaplasma marginale*, patógeno causador da Anaplasmosse Bovina (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). O complexo dessas duas enfermidades denomina-se Tristeza parasitária, doença que gera grandes prejuízos do ponto de vista sanitário na pecuária bovina no Brasil, pois é responsável por morte dos animais, aborto, menor produtividade de carne e leite, e por perdas econômicas associadas a tratamento e diagnóstico médico veterinário (SACCO, 2001).

Pode-se inferir que o carrapato-do-boi é o principal causador de perdas econômicas na bovinocultura. Esses prejuízos se tornam um obstáculo para criação de gados em área de climas tropicais e subtropicais (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

2.4 Acaricidas como método de controle

A principal forma de controle dos carrapatos baseia-se no uso de acaricidas sintéticos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Os principais carrapaticidas utilizados na pecuária nacional pertencem à classe das Arilformamidina (Amitraz), Benzoiluréia (Diflubenzuron, Fluazuron), Pirazol (Fipronil), Avermectinas (Ivermectina), Organofosforados (Clorfenvifós,

Clorpirifós, Coumafós, Diclorvos, Fention, Triclorfom) e Piretroides (Cialotrina, Ciflutrina, Cipermetrina, Deltametrina, Flumetrina) (PEREIRA; SOUZA; BAF, 2010; SILVA; MOREIRA; PERES, 2012).

Os esforços para o controle de *R. microplus* utilizando carrapaticidas sintéticos são voltados principalmente para os bovinos, os quais entram em contato com o produto por meio de banhos de aspersão, duchas, *pour on* ou por meio injetável (BRITO et al., 2006), sendo, divididos em carrapaticidas de contato e sistêmicos. Os de contato incluem os organofosforados os quais representam o grupo mais antigo disponível comercialmente e possuem curto período residual; amidínicos, os quais possuem maior período residual que os organofosforados, podendo ser aplicado então, com maiores intervalos; e os piretroides sintéticos, que apresentam menor toxicidade aos hospedeiros mamíferos bem como ao meio ambiente. Já os sistêmicos, são aqueles os quais o organismo do hospedeiro metaboliza e os distribui para todo o corpo atingindo o carrapato durante seu repasto sanguíneo, e seus principais representantes são as lactonas macrocíclicas e os benzofenilureas (BRITO et al., 2006).

Dentre as principais classes de acaricidas químicos sintéticos, os mais comumente utilizados no gado pertencem ao grupo dos organofosforados (OP) e piretroides sintéticos (SP) (CETIN et al., 2010). No entanto, segundo George et al. (2004), há relatos na literatura de resistência de *R. microplus* aos OP em diversos países, como Austrália e Brasil (1963), Argentina (1964), Colômbia e Venezuela (1967), África do sul (1979), Uruguai (1983) e México (1986). Casos de resistência aos SP também foram relatados na Austrália (1978), Brasil (1989), México (1994), Venezuela (1995), Colômbia (1997) e Argentina (2000). No Brasil, existem 12 estados que já possuem carrapatos da espécie *R. microplus* resistentes aos OP e SP (HIGA et al., 2015). O emprego de acaricidas no controle do carrapato-do-boi provoca a resistência da espécie através da seleção da população, e o uso indiscriminado acelera ainda mais esse evento (GUERRERO; LOVIS; MARTINS, 2012).

Devido as muitas dificuldades em combater este carrapato, há necessidade de novas pesquisas sobre métodos de controle que sejam ecologicamente adequados e práticos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004), pois a expansão no mundo sobre o conceito *One Health* define legislações, pesquisas, implementação de programas cujo principal objetivo é manter a integridade da saúde animal, humana e o meio ambiente (CONSELHO FEDERAL DE MEDICIA VETERINÁRIA- CFMV, 2019). Dentre as alternativas, destacam-se pesquisas que envolvem o aumento da imunidade do gado por meio de vacinas anti *R. microplus* (FREEMAN et al., 2010). Modificação do manejo dos animais, como realizar confinamento destes, rotacionar pastagens, e aumentar a resistência por meio de dietas ou pela genética ou realizar

controle biológico por meio de predadores e parasitos no carrapato (ABBAS et al., 2014; LEAL., 2003; SAMISH, 2006). Além disso, o uso de fitoterápicos no combate a praga, cujas pesquisas tem crescido nos últimos anos apresentam resultados promissores (ADENUBI et al., 2016).

2.5 Fitoterápicos e sua atividade acaricida

A comunidade científica, diante dos desafios do controle de ectoparasitos, visa desenvolver alternativas que não sejam danosos para o meio ambiente e para os seres vivos. Nessa conjuntura os compostos derivados de plantas, mais especificamente os óleos essenciais juntamente com seus respectivos princípios ativos, podem ser considerados como uma alternativa no controle de carrapatos (ADENUBI et al., 2016; JIA et al., 2018).

A eficácia do efeito acaricida de uma única planta pode ser reforçada utilizando outra espécie ou outro ingrediente ativo com propriedades adjuvantes (CHAGAS et al., 2016). Então, o uso de plantas como produto acaricida, devido aos possíveis efeitos aditivos e sinérgicos podem reduzir o desenvolvimento da resistência do parasito em comparação com os acaricidas convencionais (ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Os ingredientes ativos de plantas podem atuar na regulação do hormônio de crescimento, gerar efeitos antialimentação, inibir o desenvolvimento de ovos e a formação da quitina, além de causar alteração na comunicação sexual dos ectoparasitos, entre outros (CHAGAS et al., 2016).

Ao avaliar o potencial acaricida de uma determinada espécie de uma planta obtêm-se concentrações variadas de seus extratos. Isto ocorre devido as diferentes condições sazonais e geográficas que interferem na composição da planta colhida (ADENUBI et al., 2016; FERRAZ et al., 2010). E segundo Rosado - Aguilar et al. (2017), a maioria dos trabalhos publicados não demonstram quais dos compostos secundários das plantas utilizadas possuíam atividade acaricida. Em uma pesquisa realizado por Lima et al. (2017) foi observado que menores atividades acaricidas foram encontradas em óleos de plantas coletadas na estação chuvosa, portanto, pode-se inferir que pesquisas nas quais se utilizam concentrações exatas do princípio ativo extraído de uma planta apresentam resultados mais fidedignos.

Os óleos essenciais são compostos complexos formados por plantas aromáticas como metabólito secundário e desempenham a função de proteção da planta e são caracterizados por serem voláteis e por apresentarem odor forte (BAKKALI et al., 2008; REY et al., 2018). Podem apresentar cerca de 20 a 60 componentes em concentrações bem diversificadas. Os componentes dos óleos são divididos em dois grupos, um formado pelos terpenos e terpenóides

e o outro pelos aromáticos e alifáticos, todos estes com baixo peso molecular. Quando há combinação de várias unidades de 5 bases de carbono (isopreno) são classificados como terpenos, podendo então, ser formados os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) e quando há a presença de oxigênio são classificados como terpenóides. O subgrupo dos monoterpenos, ao qual pertence o carvacrol, é um dos princípios ativos mais representativos dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais possuem grande relevância comercial, pois são utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos e na área de cosmetologia (CETIN et al., 2010). Segundo Bakkali et al. (2008), existem diversos estudos que demonstram os efeitos citotóxicos dos óleos de plantas em bactérias e fungos. Também existem muitos trabalhos que demonstram a eficácia dos óleos como repelentes contra várias espécies de carrapatos (BENELLI; PAVELA, 2018) bem como atividade acaricida em *R. microplus* (BORTOLUCCI et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2018; JIA et al., 2018). Nesse contexto, geralmente, os óleos essenciais de plantas que apresentam atividade acaricida mais potente estão associados a altas porcentagens de carvacrol em sua composição (KOC et al., 2013). Portanto, muitos trabalhos têm destacado a ação acaricida do carvacrol em fêmeas de *R. microplus* nos últimos anos (ARAÚJO et al., 2016; LAGE et al., 2013; PEREIRA-JUNIOR et al., 2019).

2.6 Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um monoterpeno fenólico, líquido, insolúvel em água, mas solúvel em etanol e éter (KIRIMER, 1996; PUB CHEN, 2019a), presente nos óleos essenciais das plantas das famílias Labiatae, Chenopodiaceae, Plantaginaceae, Umbelliferae, Verbenaceae (KIRIMER, 1996; JAYAKUMAR et al., 2012). Este composto é largamente utilizado como alimento ou aditivo alimentar para humanos na indústria há muito tempo. Possui o status “GRAS” (Generally Recognized as Safe) de acordo com a definição da FDA (Food and Drug Administration) (GUARDA et al., 2011). E segundo Andre et al. (2016) no teste de toxicidade em camundongos a CL50 para o carvacrol e seu análogo acetilcarvacrol foram consideradas como seguras e não foram observados qualquer alteração de comportamentos de camundongos durante o teste.

Nos últimos anos suas diversas propriedades foram bem investigadas em vários campos (YU et al., 2012). Estudos demonstraram atividade neuroprotetora em camundongos (YU et al., 2012), antitumoral *in vivo* (JAYAKUMAR et al., 2012), nematicida (NASIOU; GIANNAKOU,

2017), atividades pulicida e mosquicida (ANDERSON; COATS, 2012), antimicrobiana (SCAFFARO et al., 2018), antidepressiva em camundongos (MELO et al., 2011) e maior eficiência alimentar em peixes (GIANNENAS et al., 2012).

Recentemente, muitos trabalhos têm demonstrado a atividade acaricida de plantas *in vitro*, as quais possuíam quantidades relevantes de carvacrol, como *Lippia gracilis* e *Lippia triplinervis* em larvas e fêmeas adultas de *R. microplus* (CRUZ et al., 2013; LAGE et al., 2013), *Lippia graveolens* em larvas de *R. microplus* (MARTINEZ-VELAZQUEZ et al., 2011), *Origanum minutiflorum* em adultos de *R. turanicus* (CETIN et al. 2009; KOC et al., 2013) e *Satureja thymbra L* em adultos de *Hyalomma marginatum* (CETIN et al., 2010). Outro estudo constatou que o extrato puro de carvacrol aplicado na vegetação suprimiu a população de ninfas de carrapatos das espécies *Ixodes scapularis* e *Amblyomma americanum* (DOLAN et al., 2009). Desta forma, pode-se sugerir que o uso do carvacrol como método de controle de carrapatos poderá ser realizado tanto no hospedeiro como no meio ambiente (SENRA et al., 2013).

Outros estudos demonstraram a atividade acaricida do carvacrol em larvas de *R. microplus* (SENRA et al., 2013; NOVATO et al., 2018) e em adultos da mesma espécie submetidos a doses subletais (PEREIRA JUNIOR et al., 2019), em *Dermacentor nitens* apresentando resultados com 100% de mortalidade na concentração de 2,5 µl/ml (SENRA et al., 2013), em larvas de *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *R. sanguineus* (ARAÚJO et al., 2016; NOVATO et al., 2015). Além de atividade ovicida e larvicida em *Ixodes ricinus* (TABARI et al., 2017) e atividade acaricida e repelente em adultos da espécie *Dermanyssus gallinae* (BARIMANI; YOUSSEFI; TABARI, 2016; MASOUMI; YOUSSEFI; TABARI, 2016; TABARI et al., 2015). Recentemente, foi demonstrado que o carvacrol é capaz de modificar a morfofisiologia dos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus*, alterando a morfologia de oócitos e das vesículas germinais e gerando vacuolização citoplasmática (SOUZA et al., 2019)

Os mecanismos de ação do carvacrol em carrapatos ainda não foram bem elucidados (GROSS et al., 2017). Segundo Gross et al. (2017) possivelmente o carvacrol estimulam os receptores de tiramina presentes em *R. microplus*. Outros trabalhos demonstraram que o monoterpene inibe a enzima acetilcolinesterase *in vitro* (JUKIC et al., 2007) em *Drosophila melanogaster* (ASKIN et al., 2017) em *Periplaneta americana*, *Musca domesticae* em *Dermacentor variabilis* (ANDERSON; COATS, 2012). No entanto, não se pode afirmar que este é o seu principal mecanismo de ação pois o carvacrol não foi capaz de inibir a enzima em *Aedes aegypti* (ANDERSON; COATS, 2012).

Diante de todos os estudos referentes a este composto, pode-se dizer que o carvacrol, por se tratar de um produto natural é uma alternativa ecologicamente aceitável para o controle de *R. microplus*, já que os produtos naturais não contaminam os alimentos e o ambiente, pois possuem compostos bioativos que são biodegradáveis (ADENUBI et al., 2016; CRUZ et al., 2013). Ademais, segundo Pereira-Junior et al. (2019), doses subletais de carvacrol foram capazes de alterar o desempenho reprodutivo do carrapato-do-boi, comprometendo a perpetuação da espécie no ambiente e no hospedeiro, assim, evidenciando de fato o potencial acaricida do carvacrol no controle dessa espécie.

2.7 Acetilcarvacrol

Os produtos naturais apresentam propriedades notáveis para desenvolvimento de novos medicamentos. Então, com o objetivo de desenvolver novos compostos com maior atividade biológica, menores efeitos colaterais e toxicidade, modificações moleculares têm sido realizadas em substâncias naturais (MESQUITA et al., 2018). A avaliação comparativa de produtos sintéticos e o seu originário carvacrol foram realizadas nos últimos anos (ANDRE et al., 2016; BEN ARFA et al., 2006; MESQUITA et al., 2018; NIKUMBH et al., 2003; NOVATO et al., 2018; RAMÍREZ et al., 2016).

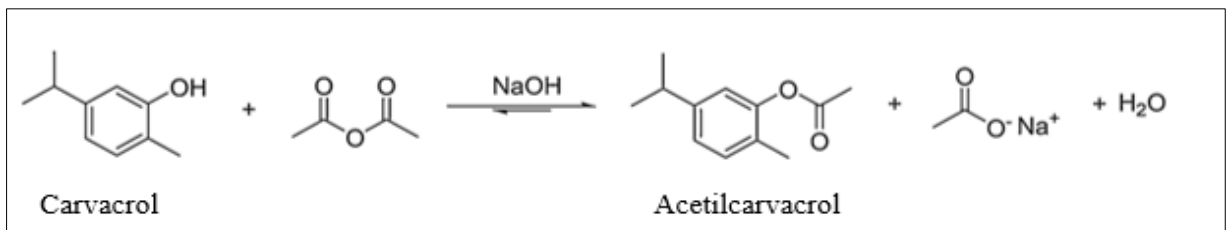
O acetilcarvacrol (5-isopropil-2-metilfenol acetato) é um derivado semissintético do carvacrol, e por meio do processo de acetilação, possui um grupo éster em substituição ao grupo hidroxila presente (FIGURA 2) (KONIG et al., 2019; PUB CHEM, 2019b). Conseqüentemente, possui características distintas relacionadas à sua eficácia e segurança em comparação com o monoterpene originário, incluindo um perfil farmacológico melhor, maior lipossolubilidade e menor toxicidade demonstrada em camundongos (ANDRE et al., 2016; DAMASCENO et al., 2014).

Estudos evidenciaram as diferentes ações biológicas benéficas do acetilcarvacrol (QUADRO 1, 2, 3), como, por exemplo, atividade antinociceptiva (DAMASCENO et al., 2014, anti-inflamatória e antioxidante (ALVARENGA et al., 2017), anticonvulsivante (PIRES et al., 2015) e potencial ansiolítico (PIRES et al., 2013). Experimentos na área de parasitologia ressaltando o potencial promissor do composto também já foram realizados. Segundo Andre et al. (2016), o acetilcarvacrol (0,5 a 8 mg/ml), dissolvido em bicarbonato de sódio a 5% demonstrou atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Além disso, apresentou menor toxicidade em camundongos e inibiu de

modo mais eficaz a motilidade de parasitos adultos em comparação ao carvacrol (ANDRE et al., 2016). Outro trabalho avaliou a atividade anti-helmíntica contra *Schistosoma mansoni* do acetilcarvacrol (6,25 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dissolvido em DMSO a 0,5%, e como resultado demonstrou que houve interferência na reprodução, na motilidade e na viabilidade dos parasitos (MORAES et al., 2012). Mesquita et al. (2018) demonstraram que a concentração de $2\text{mg}/\text{ml}^{-1}$ de acetilcarvacrol foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase *in vitro* sendo que seu originário não obteve a mesma ação biológica. Além disso, nesse mesmo estudo foi demonstrado que o composto acetilado dissolvido em 0,3 ml de DMSO possui atividade larvicida em *Aedes aegypti*.

Com relação ao efeito carrapaticida, um experimento comparou o carvacrol com o seu análogo acetilcarvacrol ambos nas concentrações de 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,065% (p/v), diluído em tricloroetileno e óleo extravirgem (2:1). O composto acetilado causou maior mortalidade em larvas de *R. microplus* (RAMÍREZ et al., 2013; RAMÍREZ et al., 2016) e menores valores de concentração letal para 50% dos indivíduos (CL50 – $5,01\mu\text{mol}/\text{mL}$ para o acetilcarvacrol e $59,72\mu\text{mol}/\text{mL}$ para o carvacrol) (RAMÍREZ et al., 2016). Além disso, no mesmo experimento o acetilcarvacrol apresentou melhor efeito acaricida em adultos de *R. microplus* em comparação ao carvacrol. Ambos foram testados nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 ppm/ml diluídos em DMSO a 4% em água (RAMÍREZ et al., 2016), no entanto, segundo o experimento de Novato et al. (2018) o produto acetilado, diluído em etanol a 100%, apresentou menor atividade acaricida em comparação ao carvacrol em larvas de *R. microplus* (CL50 - $2,49\text{mg}/\text{ml}$ para acetilcarvacrol e $0,83\text{mg}/\text{ml}$ para o carvacrol) (NOVATO et al., 2018). Recentemente, König et al. (2019) demonstraram que o composto acetilado é capaz de danificar a morfologia dos oócitos em *R. microplus*. A concentração de $4,5\mu\text{L}/\text{mL}$ de acetilcarvacrol em DMSO a 3% nessa espécie ocasionou irregularidades na superfície celular, bem como vacuolização citoplasmática e alterações nucleolares nos ovócitos.

Figura 2 – Processo de acetilação do carvacrol por meio da reação com anidrido acético e hidróxido de sódio.



Fonte: Adaptado de König et al. (2019)

Quadro 1 - Atividades identificadas de acetilcarvacrol em suas respectivas espécies alvos encontradas na literatura em ordem cronológica de publicação.

Atividade biológicas avaliadas	Espécies ou condições laboratoriais	Valores avaliados	Solvente	CL50	Autores
Anti-helmíntica	Adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	6,25 a 25 µg/mL	DMSO a 0,5%	*	(MORAIS et al., 2013)
Anti-helmíntica	Ovos, larvas e adultos de <i>Haemonchus contortus</i>	0,5 a 8 mg/ml	Bicarbonato de sódio a 5%	*	(ANDRE et al., 2016)
Larvicida	<i>Aedes aegypti</i>	1, 2, 5, 10 mg	0,3 ml de DMSO	CL50 de 100,70 ppm	(MESQUITA et al., 2018)
Inibição da acetilcolinesterase	<i>in vitro</i>	2mg/ml ⁻¹	*	*	(MESQUITA et al., 2018)

*Autor não apresentou resultados ou não utilizou o solvente

Quadro 2 – Atividades acaricidas de acetilcarvacrol em *Rhipicephalus microplus* encontradas na literatura em ordem cronológica de publicação.

Atividades biológicas avaliadas	Estádio	Concentrações avaliadas	Solvente	CL50	Autores
Acaricida	Larvas	1,0, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 % (w/v)	Tricloroetileno extravirgem 2:1	*	(RAMÍREZ et al., 2013)
Acaricida	Fêmeas ingurgitadas	250, 200, 150, 100, 50 ppm/ml	DMSO a 4% em água	*	(RAMÍREZ et al., 2016)
Acaricida	Larvas	1,0, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 % (w/v)	Tricloroetileno extravirgem 2:1	CL50 5,1 μmol/ml	(RAMÍREZ et al., 2016)
Acaricida	Larvas	0,312, 0,625 1,25, 2,5, 5,0 7,5, 10,0, 15,0 mg/ml	Etanol a 100%	CL50 2,51 μL/mL	(NOVATO et al., 2018)
Alterações em oócitos	Fêmeas ingurgitadas	3,0, 3,5, 4,0, 4,5 μL/mL	DMSO a 3%	*	(KONIG et al., 2019)

*Autor não apresentou resultados

Quadro 3 – Atividades de acetilcarvacrol em camundongos encontradas na literatura em ordem cronológica de publicação.

Atividade biológicas avaliadas	Concentrações avaliadas	Solvente	Dose letal	Autores
Ansiolítica	25, 50, 75 e 100 mg/kg	*	*	(PIRES et al., 2013)
Antinociceptiva e Anti-inflamatória	75 mg/kg	*	*	(DAMASCENO et al., 2014)
Anticonvulsivante	100 mg/kg	0,05% Tween 80	*	(PIRES et al., 2015)
Toxicidade	*	*	DL10 e DL50 566, 7 mg/kg e 1544, 5 mg/kg, respectivamente	(ANDRE et al., 2016)
Anti-inflamatória e Antioxidantes	25, 75, 150 mg/kg	*	*	(ALVARENGA et al., 2017)

*Autor não apresentou resultados ou não utilizou o solvente

2.8 O solvente Dimetilsulfóxido (DMSO)

Os compostos naturais geralmente possuem baixa solubilidade em água, portanto é necessário utilizar solventes que sejam orgânicos como o Dimetilsulfóxido (DMSO) (GONÇALVES et al., 2007). Ademais, para escolha do solvente orgânico mais adequado ao produto, deve ser avaliada sua toxicidade para o hospedeiro e sua solubilidade nos compostos manuseados (GONÇALVES et al., 2007; RAVINDRAN et al., 2011).

O DMSO a 1% demonstrou ser um solvente adequado para bioensaios em que se utilize *R. microplus*, devido sua baixa toxicidade (BRAYTON, 1986; GONÇALVES et al., 2007). Esse fármaco apresenta uma boa permeabilidade tecidual, facilita a penetração de outras substâncias através de membranas biológicas e possui propriedades anti-inflamatórias (BALICKI, 2012; BRAYTON, 1986; VASCONCELLOS et al., 2018).

Este químico ainda pode remover a camada cerosa epicuticular dos carrapatos devido a sua lipofilicidade, permitindo então a entrega dos ingredientes ativos no tegumento do parasita (RAVINDRAN et al., 2011). Ademais, existem trabalhos que demonstraram o potencial acaricida do carvacrol e seus derivados dissolvidos em DMSO (KONIG et al., 2019; PEREIRA JUNIOR et al., 2019; RAMÍREZ et al., 2016). Portanto, a utilização de acetilcarvacrol diluído em DMSO é uma alternativa promissora para o controle de *R. microplus*.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os prejuízos ocasionados pelo carrapato-do-boi geram um grande impacto econômico no setor agropecuário brasileiro, somado ao fato de que no país há casos de resistência da espécie às principais classes de acaricidas comercializadas. É necessário buscar alternativas para o controle de *R. microplus*. Sendo que a comunidade científica deve prezar por uma alternativa que esteja alinhada ao conceito de *One Health* no qual o impacto na saúde humana, animal e no meio ambiente deve ser levado em consideração. O acetilcarvacrol tem apresentado potencial para se tornar essa alternativa devido ao efeito acaricida demonstrado utilizando reduzidas concentrações. Além disso, concentrações subletais do acetilado juntamente com solvente DMSO a 3% demonstrou afetar o desempenho reprodutivo das fêmeas, interferindo, desse modo, na perpetuação da espécie. Pode-se inferir, que este estudo poderá contribuir para futuras formulações acaricidas.

4. REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z. et al. **Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play**. *Veterinary Parasitology*, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.
- ADENUBI, O. T. et al. **Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review**. *South African Journal of Botany*, v. 105, p. 178–193, 2016.
- AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, A. **Relatório de Acompanhamento Setorial: Indústria de Couro**. p. 44, 2011.
- ALVARENGA, E. M. et al. **Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 69, n. 12, p. 1773–1785, 2017.
- AMARAL, A. C. F. et al. **Acaricidal activity of *Derris floribunda* essential oil and its main constituent**. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7, n. 9, p. 791–796, 2017.
- ANDERSON, J. A.; COATS, J. R. **Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods**. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 102, n. 2, p. 124–128, 2012.
- ANDRE, W. P. P. et al. **Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice**. *Veterinary Parasitology*, v. 218, p. 52–58, 2016.
- ANDREOTTI, R; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; TANAKA, A. S. **Controle do carrapato por meio de vacina - situação atual e Perspectivas**. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, p.13, 2002.
- ARAÚJO, L. X. et al. **Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus***. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 30, n. 4, p. 377–382, 2016.
- ASKIN, H.; YILDIZ, M.; AYAR, A. **Effects of Thymol and Carvacrol on Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster***. v. 132, n. 3, p. 720–722, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Exportações brasileiras de carne bovina fecham 2018 com recorde histórico**. v. 11, 2018.
- BAKKALI, F. et al. **Biological effects of essential oils - A review**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BALICKI, I. **Clinical study on the application of tacrolimus and DMSO in the treatment of chronic superficial keratitis in dogs**. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 15, n. 4, p. 667–676, 2012.
- BARIMANI, A.; YOUSSEFI, M. R.; TABARI, M. A. **Traps containing carvacrol, a biological approach for the control of *Dermanyssus gallinae***. *Parasitology Research*, v. 115, n. 9, p. 3493–3498, 2016.
- BARKER, S. C.; MURRELL, A. **Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: A review of recent progress**. *Experimental and Applied Acarology*, v. 28, n. 1–4, p. 55–68, 2002.

- BARRÉ, N.; UILENBERG, G. **Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick.** *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v. 29, n. 1, p. 149–160, 135–147, 2010.
- BEN ARFA, A. et al. **Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 149–154, 2006.
- BENELLI, G.; DUGGAN, M. F. **Management of arthropod vector data – Social and ecological dynamics facing the One Health perspective.** *Acta Tropica*, v. 182, n. February, p. 80–91, 2018.
- BENELLI, G.; PAVELA, R. **Repellence of essential oils and selected compounds against ticks - A systematic review.** *Acta Tropica*, v. 179, p. 47–54, 2018.
- BORTOLUCCI, W. DE C. et al. **Acaricidal and larvicidal activity of leaves and fractions of rose pepper *Schinus terebinthifolius Raddi*. (Anacardiaceae) essential oil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** *Australian Journal of Crop Science*, v. 12, n. 10, p. 1645–1652, 2018.
- BRAYTON, C. F. **Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review.** *The Cornell veterinarian*, v. 76, n. 1, p. 61–90, 1986.
- BRITES-NETO, J.; RONCATO, K. M. D.; MARTINS, T. F. **Tick-borne infections in human and animal population worldwide.** *Veterinary World*, v. 8, n. 3, p. 301–315, 2015.
- BRITO, L. G. et al. **Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos.** Embrapa, p. 21, 2006.
- CAVALCANTI, S. C. H. et al. **Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae Koch*).** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 2, p. 829–832, 2010.
- CHAGAS, A. C. de S et al. **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.
- CETIN, H. et al. **Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae).** *Veterinary Parasitology*, v. 160, n. 3–4, p. 359–361, 2009.
- CETIN, H. et al. **Acaricidal activity of *Satureja thymbra L.* essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae).** *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 3–4, p. 287–290, 2010.
- CRUZ, E. M. de O. et al. **Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** *Veterinary Parasitology*, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA VETERINÁRIA. **O que é Saúde Única ?.** Disponível em: <http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/FOLDER-SAUDE-UNICA_2019.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2019.
- DAMASCENO, S. R. B. et al. **Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice.** *Life Sciences*, v. 94, n. 1, p. 58–66, 2014.
- DOLAN, M. C. et al. **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, v. 102, n. 6, p. 2316–2324, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Qualidade da carne.** Disponível em <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

EVANS, D. E. **Tick infestation of livestock and tick control methods in Brazil: a situation report.** Insect Science and its Application, v. 13(4), n. 4, p. 629–643, 1992.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. **A Review of the Ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, Their Hosts and Geographic Distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 4, p. 453–470, 2000.

FERRAZ, A. DE. B. F. A. et al. **Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three Piper species.** Parasitology Research, v. 107, n. 1, p. 243–248, 2010.

FERREIRA, F. M. et al. **Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*.** Medical and Veterinary Entomology, v. 32, n. 1, p. 41–47, 2018.

FIGUEIREDO, A. et al. **First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Veterinary Parasitology, v. 252, n. December 2017, p. 131–136, 2018.

FREEMAN, J. M. et al. **Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks.** Parasites and Vectors, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2010.

FURLONG, J.; SOUZA, J. R. de. ; AZEVEDO, M. C. de. **Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras.** Embrapa, 2003.

GEORGE, J. E. et al. **Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides.** Parasitology, v. 129, n. SUPPL., p. 353–366, 2004.

GIANNENAS, I. et al. **Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquaculture, v. 350–353, p. 26–32, 2012.

GOMES, R. DA C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. **Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira.** Embrapa, Nota técnica, p. 4, 2017.

GONÇALVES, K. et al. **Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*.** Parasitology Research, v. 100, n. 6, p. 1267–1270, 2007.

GRISI, L. et al. **Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GROMBONI, C. F. et al. **Avaliação da reação foto-Fenton na decomposição de resíduos de carrapaticida.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 264–267, 2007.

GROSS, A. D. et al. **Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target.** Chemico-Biological Interactions, 2017.

GUARDA, A. et al. **The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol.** International Journal of Food Microbiology, v. 146, n. 2, p. 144–150, 2011.

- GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. **Mecanismos de resistência aos acaricidas em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.
- HIGA, L. O. S. et al. **Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview**. Medicinal Chemistry, v. 5, n. 7, p. 326–333, 2015.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Trimestral do Abate de Animais**. 2019. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9203-pesquisas-trimestrais-do-abate-de-animais.html?=&t=series-historicas>> Acesso em: 12 de jul. 2019.
- JAYAKUMAR, S. et al. **Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats**. Molecular and Cellular Biochemistry, v. 360, n. 1–2, p. 51–60, 2012.
- JIA, M. et al. **Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. Veterinary Parasitology, v. 261, p. 59–66, 2018.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. **Ticks and control methods**. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), v. 13, n. 4, p. 1201–1226, 1994.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. **The global importance of ticks**. Parasitology, v. 129, p. 3–14, 2004.
- JONSSON, N. N.; MAYER, D. G.; MATSCHOSS, A. L. **Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows**. Veterinary Parasitology, v. 78, 1998.
- JONSSON, N. N. **The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses**. Veterinary Parasitology. v. 137, n. 1, p. 1-10, abr. 2006
- JORGE, C. et al. **Citronella oil on the control of cattle ticks**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, p.406-410, mar-abr, 2008.
- JUKIC, M. et al. **In Vitro Acetylcholinesterase Inhibitory Properties of Thymol, Carvacrol and their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone**. v. 261, n. December, p. 259–261, 2007.
- KIRIMER, N. **Chemistry of Natural Compounds**, Vol 31, No. 1, 1995. v. 31, n. 1, p. 37–41, 1996.
- KOC, S. et al. **Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae)**. Veterinary Parasitology, v. 193, n. 1–3, p. 316–319, 2013.
- KONIG, I. F. M. et al. **Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)**. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 10, n. 4, p. 766–774, 2019.
- LABRUNA, M. B. et al. **Allopatric speciation in ticks: Genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. BMC Evolutionary Biology, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2009.

- LAGE, T. C. D. A. et al. **Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** Parasitology Research, v. 112, n. 2, p. 863–869, 2013.
- LAINING, G. et al. **Control of cattle ticks and tick-borne diseases by acaricide in southern province of Zambia: A retrospective evaluation of animal health measures according to current one health concepts.** Frontiers in Public Health, v. 6, n.2, 2018.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; DA SILVA VAZ JR., I. **Perspectives for control of bovine tick.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 31, n. 1, p. 01–11, 2003.
- LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, M. **A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 7, n. 4, p. 573–585, 2016.
- LIMA, S. A. et al. **Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** Parasitology Research, v. 117, n. 1, p. 59–65, 2017.
- LONDT, J. G. H.; ARTHUR, D. R. **The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae).** Journal of the Entomological Society of Southern Africa, v. 38, n. 2, p. 321–340, 1975.
- MA, M. et al. **Biological Parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Fed on Rabbits, Sheep, and Cattle.** Korean Journal of Parasitology, v. 54, n. 3, p. 301–305, 2016.
- MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. et al. **Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).** Journal of Medical Entomology, v. 48, n. 4, p. 822–827, 2011.
- MASOUMI, F.; YOUSSEFI, M. R.; TABARI, M. A. **Combination of carvacrol and thymol against the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*).** Parasitology Research, v. 115, n. 11, p. 4239–4243, 2016.
- MELO, F. H. C. et al. **Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement of dopaminergic system.** Fundamental and Clinical Pharmacology, v. 25, n. 3, p. 362–367, 2011.
- MESQUITA, B. M. DE et al. **Synthesis, larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of carvacrol/ thymol thymol and derivatives.** Química Nova, v. 42, n. 1, p. 28–35, 2018.
- MONTEIRO, I. N. et al. **Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** Veterinary Parasitology, v. 238, p. 54–57, 2017.
- MORAES, J. et al. **Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*.** Parasitology Research, v. 112, n. 2, p. 603–610, 2012.
- MOSSA, A.T. H. et al. **Formulation and characterization of garlic (*Allium sativum* L.) essential oil nanoemulsion and its acaricidal activity on eriophyid olive mites (Acari: Eriophyidae).** Environmental Science and Pollution Research, p. 10526–10537, 2017.

- NASIOU, E.; GIANNAKOU, I. O. **The potential use of carvacrol for the control of *Meloidogyne javanica***. *European Journal of Plant Pathology*, v. 149, n. 2, p. 415–424, 2017.
- NIKUMBH; V. P. et al. **Eco-friendly Pest Management Using Monoterpenoids II. Antifungal Efficacy of Menthol Derivatives**. v. 62, n. November, p. 1086–1089, 2003.
- NOVATO, T. et al. **In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. *Veterinary Parasitology*, v. 260, n. July, p. 1–4, 2018.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. et al. **PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle**. v. 35, p. 105–111, 2005.
- OLIVER, J. H. **Biology and Systematics of Ticks (Acari: Ixodida)**. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 20, n. 1989, p. 397–430, 1989.
- PEREIRA, C. D; SOUZA, G. R. de; BAF, M. A. **Carrapato dos Bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas**. Documentos Embrapa, p. 30, 2010.
- PEREIRA JUNIOR, A. M. et al. **Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction**. *Natural Product Research*, v. 0, n. 0, p. 1–4, 2019.
- PETERMANN, J. et al. **Survey of cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, resistance to amitraz and deltamethrin in New Caledonia**. *Veterinary Parasitology*, v. 217, p. 64–70, 2016.
- PIRES, L. F. et al. **Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice**. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 112, p. 42–48, 2013.
- PIRES, L. F. et al. **Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase activities and amino acids levels in mice hippocampus after seizures**. *Chemico-biological interactions*, v. 226, p. 49–57, 2015.
- PUB CHEM. **Carvacryl** . Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=carvacrol>>. Acesso em: 13 jul. 2019a.
- PUB CHEM. **Carvacryl acetate**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvacryl_acetate#section=top>. Acesso em: 13 jul. 2019b.
- RAMÍREZ, C. L. et al. **In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. *Experimental and Applied Acarology*, v. 61, n. 2, p. 251–257, 2013.
- RAMÍREZ, C. et al. **Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. *Parasite Epidemiology and Control*, v. 1, n. 2, p. 72–77, 2016.
- RAVINDRAN, R. et al. **Toxicity of DMSO, Triton X 100 and Tween 20 against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus***. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 35, n. 2, p. 237–239, 2011.
- RECK, J. et al. **Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle?** *Preventive Veterinary Medicine*, v. 113, n. 1, p. 59–62, 2014.

- REY, C. et al. **Acaricidal effect of *Schinus molle* (Anacardiaceae) essential oil on unengorged larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae)**. *Experimental and Applied Acarology*, n. 0123456789, 2018.
- ROCHA, D. T; CARVALHO, R. G. **Produção brasileira de leite: uma análise conjuntural**. p. 6, 2018.
- ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. **Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks**. *Veterinary Parasitology*, v. 238, n. February, p. 66–76, 2017.
- SACCO, A. M. S. **Controle/Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina**. Comunicado técnico-Embrapa, v. 38, p. 1–3, 2001.
- SAMISH, M. **Biocontrol of Ticks**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, n. 1, p. 172–178, 2006.
- SCAFFARO, R. et al. **Efficacy of poly (lactic acid)/ carvacrol electrospun membranes against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in single and mixed cultures**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 9, p. 4171–4181, 2018.
- SENBILL, H. et al. **Life cycle of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini 1888 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions**. *Systematic and Applied Acarology*, v. 23, n. 6, p. 1169–1179, 2018.
- SENRA, S. de. O. et al. **Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**. *Parasitology Research*, v. 112, n. 4, p. 1461–1466, 2013.
- SILVA, T. P. P. DA; MOREIRA, J. C.; PERES, F. **Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 17, n. 2, p. 311–325, 2012.
- SOUZA, L. DE. et al. **Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae)**. *Micron*, v. 116, p. 66–72, 2019.
- TABARI, M. A. et al. **Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae)**. *Veterinary Parasitology*, v. 245, p. 86–91, 2017.
- TIRLONI, L. et al. **Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females**. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, U. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. p. 21, 2019.
- VASCONCELLOS, J. S. P. et al. **Atividade acaricida de diferentes solventes sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *Rhipicephalus microplus***. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 6, p. 1125–1129, 2018.
- YU, H. et al. **Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice**. *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, 2012.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Acaricidal activity and effects of acetylcarvacrol on *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) engorged female ticks (Acari: Ixodidae)

Abstract

This study aimed to verify the acaricidal potential of acetylcarvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol acetate) in *Rhipicephalus microplus* engorged female ticks, by determining the lethal concentration for 50, 90 and 99% of the ticks (LC₅₀, LC₉₀ and LC₉₉, respectively). The acetylated derivative of carvacrol was obtained from the reaction with acetic anhydride. The final product was identified from its melting point and by infrared spectroscopy. In order to evaluate the acaricidal potential and the lethal concentrations, engorged females were exposed to the adult immersion test at the following concentrations of acetylcarvacrol diluted in 3% DMSO: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 µL/mL. This experiment was performed in triplicate. The LC₅₀, LC₉₀ and LC₉₉ (with 95% confidence intervals) for *R. microplus* females were 4.62 µL/mL (4.45-4.78), 7.97 µL/mL (7.68-8.26) and 8.73 µL/mL (8.39-9.07), respectively. Tegumentary alterations and dorsal circular deformation were observed in some ticks. Moreover, many individuals were considered in a knockdown state, with no ability to move, although still alive. The present study demonstrated that the acetylation of carvacrol enhances its activity on the southern cattle-tick, causing higher mortality rates even at low concentrations, besides numerous physiological and morphological alterations, opening new paths for tick control.

Keywords: semisynthetic; cattle; carvacrol acetate; control.

1. Introduction

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) ticks are widely distributed in the world, causing great losses in livestock from tropical and subtropical countries (Ferraz et al. 2010). The main control strategy for these ectoparasites is based on the use of synthetic acaricides, which can be toxic to tick hosts, leaving residues in meat and milk, besides causing environmental pollution. For this reason, there is a need for new research on ecologically appropriate and practical methods of tick control (Jonjejan and Uilenberg 2004). In addition, several countries have already reported resistance to the most common synthetic acaricides currently available (George et al. 2004). In this context, the market for plant-based acaricides has been extremely favorable. Plants may be an alternative for the control of resistant strains (Adenubi et al. 2016), generating less contamination in food and environment because of their biodegradable bioactive compounds (Cruz et al. 2013; Adenubi et al. 2016). Acetylcarvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol acetate) is a semisynthetic compound derived from carvacrol, a monoterpene present in essential oils of plants belonging to the family Lamiaceae (Jayakumar et al. 2012). The acetylated carvacrol is more liposoluble and has a better pharmacological profile and lower toxicity, probably because it contains an ester group replacing the hydroxyl group (Damasceno et al. 2014). Additionally, the modification of its chemical structure showed to increase its acaricidal potential (Ramírez et al. 2013; Ramírez et al. 2016).

Thus, the aim of this study was to demonstrate the acaricidal potential of acetylcarvacrol, diluted in dimethyl sulfoxide (3% DMSO), in engorged females of *R. microplus* ticks by calculating the lethal concentration (LC) for 50, 90, and 99% of the parasites. The hypothesis of this work is that the increased liposolubility of acetylcarvacrol increases its acaricidal action, reducing costs and toxicity to the environment and to the host.

2. Material and methods

2.1 Acetylation of carvacrol

Carvacrol was purchased from Sigma Aldrich (São Paulo/SP, Brazil) with 99% purity. To perform the acetylation process, 25 mL of 10% sodium hydroxide solution and 5 mL of carvacrol were placed in a volumetric flask at room temperature. Then, 5.5 mL of acetic anhydride (97% for analysis, 1000mL, Denmark) was added to the volumetric flask under stirring for 15 minutes. After the appearance of an oily phase, which was collected from the system with a Pasteur pipette, the product was identified according to its melting point and by infrared spectroscopy (Solomons et al. 2016). An Affinity-1 Shimadzu IR Infrared spectrometer was used on the structural characterization, operating in a spectral range of 4000-400 cm^{-1} , resolution 4 and number of scans 4. The absence of an intense broadband between 3000 to 4000 cm^{-1} indicates no residual phenol from the reactant. An intense band at 1753 cm^{-1} is the confirmation of the ester carbonyl structure.

2.2 Ticks

Rhipicephalus microplus engorged females were collected in naturally infested cattle located in the state of Minas Gerais, Brazil. The animals did not come into contact with acaricides for at least 30 days. After the collection, the females were identified in the Laboratory of Parasite Biology (BIOPAR), Federal University of Lavras (UFLA), Lavras/MG, Brazil, and then washed in tap water with a sieve and dried on absorbent paper. All ticks were weighed before experiments.

2.3 Adult immersion test (AIT)

The lethal concentrations of acetylcarvacrol were obtained according to the methodology described by Roma et al. (2009). Ticks with homogeneous body weights ($n = 350$)

were divided into 13 experimental groups: two control groups (CI and CII), in which females were exposed only to distilled water and to 3% DMSO solution (solvent), respectively; and 11 treatment groups (TI-TXI), in which ticks were exposed to the following concentrations of acetylcarvacrol diluted in 3% DMSO solution: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The adult immersion test (AIT) was adapted from the procedures described by Drummond et al. (1973). Each group of ticks was immersed for 5 minutes in the solutions to be tested. Then, the females were dried on absorbent paper and placed in Petri dishes at room temperature, in order to simulate natural conditions. Mortality monitoring was performed by assessing the vital status of females every 24 hours, for a total period of 7 days, as recommended by Oliveira et al. (2008). The females that responded to CO_2 stimulus and to the touch by an anatomical dissecting tweezer were considered alive. Treatment groups in which no mortality was observed (0%) or total mortality occurred (100%) were not used for the statistical determination of lethal concentration values. For groups where partial mortality was detected and control groups, the experiment was performed in triplicate (1 replicate = 10 ticks), totaling 30 individuals per group (Table 1). The mean percentage \pm standard deviation for mortality and knockdown (i.e. ticks which showed no signs of locomotion but moved their legs when stimulated by tweezers or CO_2) in the three replicates were presented in Table 2.

The averages of daily temperature and relative humidity, as well as their respective standard deviations, were provided by the Principal Climatological Station of Lavras, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras/MG, Brazil.

2.4 Statistical analysis

The female weights were subjected to Kolmogorov-Smirnov normality test and, after this, data was compared statistically by means of the one-way ANOVA test, followed by Tukey's *post-hoc* analysis ($\alpha < 0.05$), using GraphPad Prism software (version 7.00). The results

obtained in the mortality tests were submitted to Probit analysis using Statistica software (version 7.00), in order to calculate the lethal concentrations for 50, 90 and 99% of individuals (LC50, LC90 and LC99), as well as their respective 95% confidence intervals.

3. Results

During the experiment, the mean daily temperature and relative humidity were $18.25 \pm 1.10^\circ\text{C}$ and $66.76 \pm 8.03\%$, respectively. The mean weight \pm standard deviation of collected *R. microplus* female ticks was $0.179 \pm 0.068\text{g}$; no statistical differences were observed between groups ($p > 0.05$).

The daily percentages of mortality are listed in Table 1. In the control groups, all ticks remained alive until the end of the observation period in both experiments. For this reason, Abbott correction was not necessary for calculating LC values. No mortality was observed at the concentration of $3.0\mu\text{L}/\text{mL}$, while the concentration of $8.0\mu\text{L}/\text{mL}$ was lethal to all ticks. Thus, the mortality interval (i.e. concentrations in which mortality was greater than 0% and lower than 100%) ranged between 3.0 and $8.0\mu\text{L}/\text{mL}$. The highest mortality rate in the first 24 hours after treatment was observed in the groups exposed to concentrations of 5.5 and $7.0\mu\text{L}/\text{mL}$ (56.67% and 66.67%, respectively). At the seventh day of observation, for groups within the mortality interval, the highest mortality rates were observed in ticks exposed to 7.0 and $7.5\mu\text{L}/\text{mL}$ (86.67% and 80.0%, respectively). The effects of acetylcarvacrol were not dose-dependent.

Increasing mortality values were observed as the amount of acetylcarvacrol raised, when the mean number of dead ticks per concentration was evaluated (Table 2), except for the concentrations of 6.0 and $6.5\mu\text{L}/\text{mL}$. In these groups, a slightly lower percentage of dead individuals was observed. Ticks in the knockdown state were observed from $3.5\mu\text{L}/\text{mL}$, with a higher incidence in the concentrations of 4.0 and $6.0\mu\text{L}/\text{mL}$ (16.67 and 26.67% respectively).

However, the number of ticks considered knockdown did not follow a dose-dependent pattern. Interestingly, taking together the percentages of dead individuals and knockdowns for each concentration, it is possible to observe that at least 70% of the population was somehow affected by the product from 5.0 μ L/mL.

The mean lethal concentration (LC50) of acetylcarvacrol obtained for *R. microplus* was 4.62 μ L/mL (95% confidence interval: 4.45-4.78). The lethal concentrations for 90% (LC90) and 99% of subjects (LC99) were 7.97 μ L/mL (7.68-8.26) and 8.73 μ L/mL (8.39-9.07) respectively (Regression correlation coefficient = 0.974861; chi-square = 75.596; significance level < 0.001; standard error = 0.343430; intercept = 0.419541). In addition, some ticks showed morphological alterations, such as blackening and dryness of the most superficial layer of the integument, as well as the presence of a dorsal circular deformation.

Table 1. Percentage of dead *Rhipicephalus microplus* engorged female ticks exposed to different concentrations of carvacrol acetate (n = 350).

Concentration	Percentage of dead ticks/days of treatment (%)						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Control 1 (n = 30)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Control 2 (n = 30)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.00 μ L/mL (n = 10)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.50 μ L/mL (n = 30)	0.00	0.00	3.33	3.33	3.33	3.33	6.67
4.00 μ L/mL (n = 30)	16.67	36.67	36.67	36.67	36.67	46.67	50.00
4.50 μ L/mL (n = 30)	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	60.00	60.00
5.00 μ L/mL (n = 30)	26.67	46.67	60.00	60.00	60.00	73.33	73.33
5.50 μ L/mL (n = 30)	56.67	73.33	73.33	73.33	73.33	73.33	73.33
6.00 μ L/mL (n = 30)	23.33	50.00	53.33	53.33	56.67	56.67	56.67
6.50 μ L/mL (n = 30)	50.00	60.00	60.00	60.00	60.00	63.33	63.33
7.00 μ L/mL (n = 30)	66.67	80.00	86.67	86.67	86.67	86.67	86.67
7.50 μ L/mL (n = 30)	36.67	53.33	63.33	63.33	76.67	80.00	80.00
8.00 μ L/mL (n = 10)	50.00	50.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
MEAN (only treatments)	34.24	45.45	53.33	53.33	54.85	58.48	59.09

Table 2. Mean percentage of mortality and knockdown (\pm standard deviation) of *Rhipicephalus microplus* engorged female ticks treated with carvacrol acetate in the three replicates.

Concentration of extract (mg/mL)	Mortality	Knockdown
Control 1 (distilled H ₂ O)	0.00	0.00
Control 2 (3% DMSO)	0.00	0.00
3.00 μ L/mL	0.00	0.00
3.50 μ L/mL	6.67 \pm 11.55	3.34 \pm 5.77
4.00 μ L/mL	50.00 \pm 26.46	16.67 \pm 11.55
4.50 μ L/mL	60.00 \pm 36.06	6.67 \pm 5.77
5.00 μ L/mL	73.33 \pm 46.19	10.00 \pm 17.32
5.50 μ L/mL	73.33 \pm 15.28	10.00 \pm 10.00
6.00 μ L/mL	56.67 \pm 5.77	26.67 \pm 11.55
6.50 μ L/mL	63.33 \pm 40.72	6.67 \pm 11.55
7.00 μ L/mL	86.67 \pm 23.09	15.00 \pm 21.21
7.50 μ L/mL	80.00 \pm 20.00	3.34 \pm 5.77
8.00 μ L/mL	100.00	0.00

4. Discussion

In the present study, no mortality was observed in the control groups, even when ticks were exposed to 3% DMSO solution. In *R. microplus* larvae, Chagas et al. (2003) described an average mortality of 45% only when ticks were submitted to DMSO at 25%, while 58% and 24% of the adult females died after exposure to the solvent combined or not with olive oil, respectively. Also, no mortality was observed at the concentration of 5% of DMSO.

Acetylcarvacrol did not exhibit a dose-dependent effect. The slightly reduced mortality at the concentration of 6.0 μ L/mL, however, coincided with higher rates of knockdown individuals at this concentration. Knockdown ticks are those which show no signs of locomotion, but move slightly their legs after being stimulated by anatomical tweezers and CO₂, as described by Dolan et al. (2009) in *Ixodes scapularis* (Say, 1821) and *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758) nymphs exposed to carvacrol. Cetin et al. (2010) also demonstrated a rapid knockdown effect in *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844) ticks subjected to carvacrol.

The seven-day monitoring period used in our study was proposed by Oliveira et al. (2008), since longer evaluation periods could generate higher mortality rates, especially in groups with elevated knockdown percentages. Also, natural mortality could occur, making it difficult to interpret the results. Cruz et al. (2013), for example, used a two-week monitoring period, resulting in higher death rates for carvacrol and, as a consequence, lower lethal concentrations.

In general, mortality was elevated on the first day after treatment in all replicates, although it is not possible to establish a dose-dependent pattern. The highest rates after 24 hours were observed at the concentrations of 5.5 and 7.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, but higher concentrations showed lower mortality. Variations in death percentages on the first day after treatment were also found in the experiment conducted by Roma et al. (2009), in which the use of permethrin at the concentrations of 3840, 25600 and 38400 ppm caused 50, 50 and 30% of mortality, respectively, in *R. sanguineus* (Latreille, 1806) semi-engorged females.

Studies performed under controlled temperature and humidity tend to show smaller variations in mortality rates instead (Fernandes 2001; Ma et al. 2013). However, many natural compounds do not persist in the environment and respond in varying degrees to light, temperature and other parameters, depending on their chemical composition (Turek and Stintzing 2013). For this reason, reduced efficacy of plant products in field conditions becomes a major obstacle to the development of alternative methods for tick control (Adenubi et al. 2016). In our experiment, the range of daily variations in temperature may have been responsible for the absence of a dose-dependent effect. This is of great importance in evaluating the effects of acaricidal products, since field application conditions cannot be controlled. To date, few studies have demonstrated the effect of products under environmental conditions. Pereira Junior et al. (2019), for example, demonstrated the effects of carvacrol on mortality and reproduction of *R. microplus* ticks, with 61.10% efficacy at 20.11 mg/mL. Thus, our results may

be considered closer to a practical application, since all experimental procedures were performed at room temperature and humidity.

In an experiment conducted by Ramírez et al. (2013), acetylcarvacrol dissolved in trichlorethylene and olive oil caused higher death percentage in *R. microplus* larvae than its parent compound. Reduced LC50 values were also observed in *R. microplus* larvae (5.01 μ mol/mL or 0.969 μ L/mL for acetylcarvacrol, and 59.72 μ mol/mL or 9.18 μ L/mL for carvacrol) exposed to acetylcarvacrol diluted in ethanol solution at 8% (Ramírez et al. 2016). It is worth emphasizing that, unlike the results obtained in the present study, Novato et al. (2018) found less acaricidal activity of this acetylated derivative, diluted in ethanol 100%, in *R. microplus* larvae when compared to carvacrol (LC50: 2.49mg/mL or 2.51 μ L/mL for acetylcarvacrol, and 0.83mg/mL or 0.85 μ L/mL for carvacrol). These authors attribute this divergence to the low acaricidal activity of carvacrol found by Ramírez et al. (2013), when compared to other studies (Cruz et al. 2013; Senra et al. 2013). It is possible that such differences, for both carvacrol and its acetylated derivative, rely on the type of solvent used in each experiment.

It is important to note that the LC50 obtained in the present study (4.62 μ L/mL) is below that determined by Pereira Junior et al. (2019) for carvacrol diluted in 50% ethanol (20.11mg/mL or 20.58 μ L/mL), but very close to the LC50 found by Cruz et al. (2013) for carvacrol diluted in 3% DMSO (4.46mg/mL or 4.56 μ L/mL). The proximity between our results and those determined by Cruz et al. (2013) are probably related to different experimental conditions. This reinforces the need for studies at room temperature simulating practical applications in the field.

In our study, hyperpigmentation and dryness of the integument were found in a larger number of individuals as the concentration of acetylcarvacrol increased. Drying of the external surface was also described by Roma et al. (2009) and Ma et al. (2013) for *R. sanguineus* and

Haemaphysalis qinghaiensis(Teng, 1980) ticks treated *in vitro* with pyrethroids, respectively. Such changes possibly reflect the absorption of acetylcarvacrol, which may even damage internal organs of ticks.

The acetylated derivative of carvacrol, diluted in 3% DMSO, showed considerable acaricidal activity in *R. microplus* engorged females, causing high mortality at reduced concentrations, when compared to its parent compound. Due to the great resistance of the southern cattle-tick to the commercially available synthetic chemicals, this study opens the way to new possibilities of control, through the use of semi-synthetic derivatives of natural products. Acetylcarvacrol demonstrated great potential as an acaricidal product, and further studies may provide information on the morphological damage of acetylcarvacrol in ticks, as well as their synergistic effects with other compounds.

Acknowledgments

This research was financially supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais).

5. References

Adenubi OT, Fasina FO, McGaw LJ, Eloff JN, Naidoo V. 2016. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review [Review]. South African Journal of Botany. 105:178-193.

Cetin H, Cilek JE, Oz E, Aydin L, Deveci O, Yanikoglu A. 2010. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 170(3-4):287-290.

Chagas ACS, Leite RC, Furlong J, Prates HT, Passos WM. 2003. Sensibility of *Boophilus microplus* tick to solvents. *Ciência Rural*. 33(1):109-114.

Cruz EMDO, Costa-Junior LM, Pinto JAO, Santos DDA, Araujo SAD, Arrigoni-Blank MDF, Bacci L, Alves PB, Cavalcanti SCDH, Blank AF. 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 195(1-2):198-202.

Damasceno SRB, Oliveira FRAM, Carvalho NS, Brito CFC, Silva IS, Sousa FBM, Silva RO, Sousa DP, Barbosa ALR, Freitas RM et al. 2014. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice [Article]. *Life Sciences*. 94(1):58-66.

Dolan MC, Jordan RA, Schulze TL, Schulze CJ, Manning MC, Ruffolo D, Schmidt JP, Piesman J, Karchesy JJ. 2009. 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 [Article]. *Journal of Economic Entomology*. 102(6):2316-2324.

Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 66(1):130-133.

Fernandes FF. 2001. Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil [Article]. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 53(5):538-543.

Ferraz ABF, Balbino JM, Zini CA, Ribeiro VLS, Bordignon SAL, Von Poser G. 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three Piper species [Article]. *Parasitology Research*. 107(1):243-248.

George JE, Pound JM, Davey RB. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*. 129:353–366.

Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula Dhas K, Kamaraj S, Josephine Divya MG, Devaki T. 2012. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 360(1-2):51-60.

Jonjejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*. 129:S3-S14.

Ma M, Guan G, Liu Q, Dang Z, Liu A, Ren Q, Liu Z, Li Y, Chen Z, Liu J et al. 2013. The in vitro efficacy of deltamethrin and alpha-cypermethrin against engorged female *Haemaphysalis qinghaiensis* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 134(4):405-408.

Novato T, Gomes GA, Zeringóta V, Franco CT, de Oliveira DR, Melo D, de Carvalho MG, Daemon E, de Oliveira Monteiro CM. 2018. In vitro assessment of the acaricidal activity of

carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) [Article]. *Veterinary Parasitology*. 260:1-4.

Oliveira PR, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food and Chemical Toxicology*. 46(7):2459-2465.

Pereira Junior AM, Camargo-Mathias MI, Daemon E, Peconick AP, Lima-Souza JR, Oliveira PR, Braga AS, Lara LJ, Remedio RN. 2019. Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction [Article in Press]. *Natural Product Research*.

Ramírez C, Ibarra F, Pérez HI, Manjarrez N, Salgado HJ, Gonzales Y. 2013. In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 61(2):251-257.

Ramírez C, Ibarra F, Pérez HI, Manjarrez N, Salgado HJ, Ortega L. 2016. Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasite Epidemiology and Control*. 1(2):72-77.

Roma GC, Oliveira PR, Pizano MA, Camargo Mathias MI. 2009. Determination of LC50 of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 123(3):269-272.

Senra TOS, Calmon F, Zeringóta V, Monteiro CMO, Maturano R, Da Silva Matos R, Melo D, Gomes GA, De Carvalho MG, Daemon E. 2013. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) [Article]. *Parasitology Research*. 112(10):3471-3476.

Solomons TWG, Fryhle CB, Snyder SA. 2016. *Organic Chemistry*. 12th ed. John Wiley Sons Inc. Turek C, Stintzing FC. 2013. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12(1):40-53.

ARTIGO 2

Baixas concentrações de acetilcarvacrol resultam em elevada eficácia no controle do carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888)

(Acari: Ixodidae)

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos de concentrações subletais de acetilcarvacrol no desempenho reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, por meio da determinação da eficácia acaricida. O carvacrol foi acetilado pela reação com o anidrido acético, confirmada pela identificação do seu ponto de fusão e por espectroscopia de infravermelho. Com base no valor da concentração letal média (CL50) do acetilcarvacrol, as fêmeas foram expostas às concentrações subletais de 3,7 μ L/mL, 4,62 μ L/mL e 5,0 μ L/mL por meio do teste de imersão de adultos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso das fêmeas antes da oviposição, período pré-oviposição, peso da massa de ovos, índice de produção de ovos, período de incubação, taxa de eclosão, taxa de fecundidade, porcentagem de redução da oviposição, porcentagem de redução da eclosão e eficácia do produto. O grupo tratado com a maior concentração de acetilcarvacrol apresentou a maior eficácia (91,69%) devido à maior redução do peso das massas de ovos e menor taxa de eclosão. Assim sendo, este composto pode ser considerado uma alternativa promissora para o controle de infestações por *R. microplus* pois foi capaz de reduzir sua fecundidade.

Palavras-chaves: produtos naturais; ectoparasito; controle

**Low acetylcarvacrol concentrations result in high efficacy in controlling the
Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)**

Abstract

This study evaluated the effects of sublethal concentrations of acetylcarvacrol on the reproduction of engorged females on *Rhipicephalus microplus*, by determining acaricidal efficacy. The carvacrol was acetylated by reaction with acetic anhydride, confirmed by identifying its melting point and by infrared spectroscopy. Based on the value of the average lethal concentration (LC50) of acetylcarvacrol, females were exposed to concentrations of 3.7 μ L/mL, 4.62 μ L/mL, and 5.0 μ L/mL of acetylcarvacrol by means of the adult immersion test. The following parameters were evaluated: females weight before oviposition, pre-oviposition, egg mass weight, egg production index, incubation period, hatching percentage, fecundity rate, reduction in oviposition and hatching and product efficacy. The group treated with the highest concentration of acetylated product had the highest efficacy (91.69%) due to the large reduction in egg mass weight and lower hatching rates. Therefore, this compound can be considered a promising alternative for the control of infestations by *R. microplus* because it was able to reduce its fecundity.

Keywords: natural products; ectoparasite; control.

1. Introdução

Rhipicephalus microplus, o carrapato-do-boi, é considerado o ectoparasito mais prejudicial para bovinocultura de países de clima tropical e subtropical devido aos impactos econômicos gerados por suas infestação (Ferraz et al. 2010; Rodriguez-Vivas et al. 2018). Estima-se que essas perdas econômicas atinjam entre U\$22 a U\$30 bilhões anualmente no mundo (Lew-Tabor and Valle 2016). Os prejuízos estão associados à redução da produção de leite e carne, danos ao couro, perdas de animais devido a hemoparasitoses, e custos de controle e serviços veterinários (Jonsson 2006; Rodriguez-Vivas et al. 2018). Por este motivo, o controle das infestações pelo carrapato-do-boi é indispensável, sendo o uso de acaricidas químicos sintéticos o principal método utilizado atualmente. No entanto, tais produtos poluem o meio ambiente e seus resíduos podem ser encontrados na carne e no leite (Jonjejan and Uilenberg 2004). Além disso, há relatos de resistência à maioria dos acaricidas químicos sintéticos disponíveis comercialmente (Rodriguez-Vivas et al. 2018).

Entre os compostos naturais, o carvacrol, um monoterpene fenólico com reconhecida ação acaricida (Barimani et al. 2016; Tabari et al. 2017; Lima-Souza et al. 2019), pode ser encontrado em óleos essenciais de plantas aromáticas pertencentes principalmente à família Verbenaceae (*Origanum sp*, *Thymbra sp*, *Thymus sp*, *Satureja sp*, *Coridothymussp*, *Lippia sp*) (Bakkali et al. 2008; Baser 2008). Sua atividade biológica, assim como a de outros compostos, pode ser elevada após modificações em sua estrutura molecular (Mesquita et al. 2018). Nesse contexto, a acetilação do carvacrol permite a obtenção de um composto com maior lipossolubilidade e menor toxicidade para mamíferos, quando comparado ao seu produto de origem (Damasceno et al. 2014) . Ademais, seu efeito acaricida em carrapatos vêm sendo demonstrados nos últimos anos (Ramírez et al. 2013; Ramírez et al. 2016; Novato et al. 2018; König et al. 2019).

Diante dos desafios encontrados no controle de carrapatos, bem como a necessidade desenvolvimento de métodos alternativos que sejam ecologicamente adequados e seguros para os seres humanos e hospedeiros vertebrados, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto de concentrações subletais deste composto sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, a fim de determinar sua eficácia ou porcentagem de controle.

2. Material e métodos

2.1 Acetilação do carvacrol

O processo de acetilação do carvacrol (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil) com 99% de pureza, foi realizado segundo Konig et al. (2019) e a identificação do produto final, após o aparecimento de solução bifásica, foi realizada de acordo com seu ponto de fusão e por espectroscopia de infravermelho (Solomons et al. 2016) em espectrômetro IR Affinity-1 Shimadzu, resolução 4, funcionando em uma faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} . A ausência de banda larga intensa entre 3000 a 4000 cm^{-1} foi utilizada como indicativo de que nenhum fenol residual do reagente estava presente. Além disso, a presença de uma banda intensa a 1753 cm^{-1} foi usada como método de confirmação da estrutura do éster carbonílico.

2.2 Carrapatos

As fêmeas ingurgitadas de carrapatos foram coletadas de bovinos infestados naturalmente, localizados em fazendas da região sul de Minas Gerais, Brasil. Apenas, os bovinos que não entraram em contato com quaisquer variedades de acaricida por pelo menos 30 dias foram selecionados. Após a coleta, os parasitos foram identificados no Laboratório de Biologia Parasitária (BIOPAR), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras/MG, Brasil. Aqueles que apresentaram aparência e locomoção típicas da espécie foram selecionados para o estudo. As fêmeas selecionadas foram, posteriormente, lavadas com auxílio de uma peneira e secas em papel absorvente fino.

2.3 Teste de imersão de adultos (TIA)

Carrapatos com pesos homogêneos ($p > 0.05$) ($n = 87$) foram divididos em 5 grupos experimentais: dois grupos controle (CI e CII), nos quais as fêmeas foram expostas à água destilada e ao solvente (DMSO a 3%) respectivamente, e 3 grupos de tratamento (TI, TII, TIII), nos quais os animais foram expostos às concentrações de $3,7\mu\text{L/mL}$, $4,62\mu\text{L/mL}$ e $5,0\mu\text{L/mL}$ de acetilcarvacrol diluído em DMSO a 3%, com base na concentração letal média (CL_{50}) do produto obtida em experimentos pilotos. Os carrapatos foram, em seguida, submetidos ao TIA, conforme proposto por Drummond et al. (1973). Os parasitos foram imersos por 5 minutos em um béquer contendo as respectivas soluções, e após retirados dos recipientes, foram secos com papel absorvente e dispostos em placas de Petri à temperatura ambiente. As médias diárias e desvios-padrão da temperatura e a umidade relativa durante o experimento foram cedidas pela Estação Climatológica Principal de Lavras da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras / MG, Brasil.

2.4 Avaliação dos parâmetros reprodutivos

Para avaliação dos efeitos do acetilcarvacrol no desempenho reprodutivo de *R. microplus*, os seguintes parâmetros foram avaliados: a) peso da fêmea após destacamento do hospedeiro (PF); b) peso total da massa de ovos para cada fêmea (PM); c) Período pré-oviposição (PPO), correspondente ao número de dias contados desde o momento em que fêmea se destacou do hospedeiro até o início da oviposição; d) período de incubação (PI), intervalo de tempo entre o início da oviposição e o começo da eclosão das larvas; e) taxa de eclosão (TE), determinada visualmente pela estimativa da proporção de ovos em que houve ou não a eclosão das larvas.

A partir desses valores, foi determinado para cada fêmea o índice de produção de ovos (IPO) de acordo com Matos et al. (2014): $IPO = (PM/PF) \times 100$. Após a determinação do IPO e obtenção da TE, foi calculada a taxa de fecundidade (TF) de cada fêmea segundo Castro-Janer

et al. (2010): $TF = (IPO \times TE)/100$. Ademais, para cada grupo experimental, foi calculado a reprodução estimada (RE) (Pereira- Junior et al. 2019), a porcentagem de redução da oviposição (%Rovip) e redução da eclosão (%Reclo) (Lopes et al. 2013) por meio das seguintes fórmulas: $RE = (PM \text{ médio}/PF \text{ médio}) \times TE \text{ média} \times 20000$; $\%Rovip = [(PM \text{ controle} - PM \text{ tratemtno})/PM \text{ controle}] \times 100$; $\%Reclo = [(TE \text{ controle} - TE \text{ tratamento})/TE \text{ controle}] \times 100$. Já a porcentagem de controle ou eficácia do produto (C%) foi determinada com base na fórmula adaptada de Drummond et al. (1973): $\%C = [(RE \text{ controle} - RE \text{ tratamento})/Re \text{ controle}] \times 100$.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5 (v.5.03). Para verificação da normalidade dos dados, foi utilizado o Teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que obtiveram distribuição normal (PF, PM e IPO) foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados não paramétricos (TE, PPO, PI e TF) foram analisados estatisticamente por meio do teste Kruskal-Wallis, com teste *post-hoc* de Dunns.

3. Resultados

No presente trabalho, a aplicação de concentrações subletais de acetilcarvacrol demonstrou modificar significativamente o desempenho reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os valores médios \pm desvio padrão da temperatura e a umidade relativa durante o experimento foram, respectivamente, $22,65 \pm 2,11^\circ\text{C}$ e $73,78 \pm 13,01\%$. Conforme observado na Tabela 1, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos com relação à média do peso das fêmeas antes da oviposição (mg). O tratamento com a maior concentração de acetilcarvacrol (T3) reduziu consideravelmente o peso da massa de ovos (PM) ($p < 0,05$), em comparação ao grupo controle (C1). Não houve diferença entre os tratamentos.

A Tabela 1 lista os valores médios \pm desvio padrão do índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE) e taxa de fecundidade das fêmeas (TF). As médias de IPO foram similares estatisticamente ($p > 0.05$) entre os grupos controle com água destilada e DMSO à 3% (43,01 e 36,84, respectivamente). Também não houve diferença entre estes grupos e os tratamentos de menor concentração (T1 e T2). No entanto, o grupo T3 apresentou IPO significativamente reduzido (23,92) quando comparado aos grupos controle. Diferenças estatísticas foram também observadas quanto à TE e TF no tratamento T3 em comparação ao grupo C1, com eclosão de 7,23% e fecundidade de 2,09% respectivamente.

Ainda na Tabela 1 estão listadas as médias \pm desvio padrão do período pré-oviposição (PPO) e período de incubação (PI). No que se refere ao PPO, não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre os grupos de tratamento, apenas entre estes e ambos os grupos controle ($p < 0,05$), quanto ao PI nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

A porcentagem de redução da oviposição (%Rovip), por sua vez, demonstrou efeitos dose-dependentes (Gráfico 1), com redução de 24,72%, 25,82% e 47,10% para os tratamentos nas concentrações de T1, T2 e T3 de acetilcarvacrol, respectivamente. O grupo C2, tratado apenas com o solvente (DMSO a 3%) demonstrou %Rovip de 15,90% em relação ao grupo C1. A porcentagem de redução da eclosão (%Reclo) foi também elevada nos grupos de tratamento T1, T2, T3, com valores de 44,46%, 39,43% e 84,85%, respectivamente. Também houve redução de 21,15% na eclosão do grupo C2, em comparação ao C1. As porcentagens de controle ou eficácia do produto (%C) nos grupos C2, T1, T2 e T3, em comparação ao grupo C1, foram de 34,80%, 60,56%, 55,81% e 91,69% respectivamente (Gráfico 1).

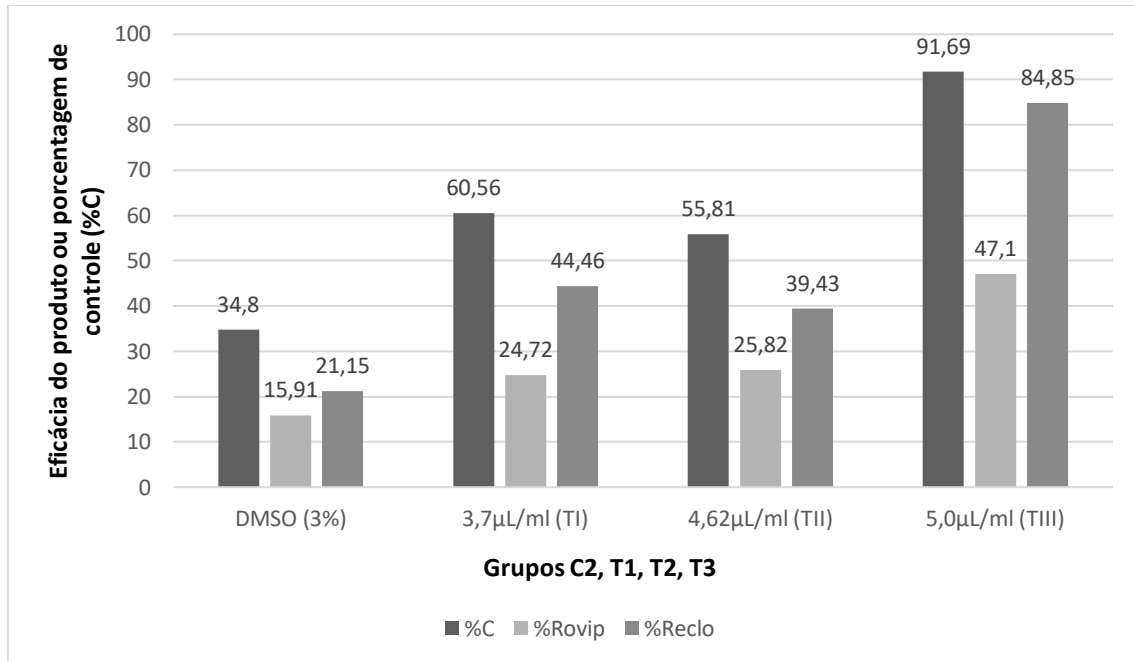
Tabela 1. Peso médio das fêmeas antes da oviposição (PF), peso da massa de ovos (PM), índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE), taxa de fecundidade (TF), período pré-oviposição (PPO), período de incubação (PI), porcentagem de redução da oviposição e da eclosão (%Rovip e %Reclo), e eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C) do acetilcarvacrol diluído em DMSO 3% e aplicado em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em concentrações subletais.

Parâmetros	Tratamentos				
	C1 (água)	C2 (DMSO 3%)	T1 (3,7µL/mL)	T2 (4,60µL/mL)	T3 (5,00µL/mL)
PF (mg)	146,15a ± 0,04	148,64a ± 0,02	154,90a ± 0,02	148,61a ± 0,03	141,00a ± 0,02
PM (mg)	66,00a ± 0,03	55,50ab ± 0,02	49,68ab ± 0,018	48,96ab ± 0,023	34,91b ± 0,016
IPO (%)	43,01a ± 9	36,84a ± 14	31,86ab ± 10	33,37ab ± 13	23,92b ± 9,3
TE (%)	47,69a ± 35	37,61ab ± 35	26,49ab ± 29	28,89ab ± 36	7,23b ± 15
TF (%)	22,78a ± 18	16,23ab ± 16	10,19ab ± 12	11,28ab ± 15	2,09b ± 4,3
PPO (dias)	4,62a ± 0,50	5,00a ± 0,96	6,27b ± 1,51	6,00b ± 0,8	7,25b ± 1,60
PI (dias)	31,85a ± 6,6	30,33a ± 4,1	35,53a ± 7,2	37,33a ± 9,5	35,00a ± 8,2
%Rovip*		15,91	24,72	25,82	47,10
%Reclo*		21,15	44,46	39,43	84,85
C%*		34,80	60,56	55,81	91,69

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

*Dados não estatisticamente analisados

Gráfico 1. Eficácia do produto ou porcentagem de controle (%C), e porcentagens de redução da oviposição e eclosão (%Rovip e %Reclo) nos grupos tratados com o solvente (DMSO 3%) e com diferentes concentrações subletais de acetilcarvacrol, em comparação ao grupo controle água.



4. Discussão

Os efeitos de produtos de origem natural no trato reprodutor de fêmeas de *R. microplus* têm sido avaliados com frequência nos últimos anos (Konig et al. 2019; Lima-Souza et al. 2019) e demonstrado que os indivíduos sobreviventes após a exposição a produtos acaricidas apresentam importantes alterações morfofisiológicas, que podem culminar em um efeito controle em longo prazo resultando em uma potencial forma de controle em longo prazo. No presente estudo, apesar da redução do peso da massa de ovos ter apresentado um padrão dose-dependente nos grupos tratados, apenas o tratamento com a concentração de 5,00 µl/ml foi significativamente diferente de ambos os grupos controle, com IPO de 23,92%. Outros trabalhos também apresentaram resultados semelhantes para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. O carvacrol, por exemplo, quando diluído em etanol 50% nas concentrações de 16,47 µl/ml e 20,58 µl/ml, resultou em IPO de 26,3% e 21,2%, respectivamente (Pereira Junior

et al. 2019). Já o timol, após dissolução em água e DMSO, também foi responsável pela redução da massa média de ovos das fêmeas, gerando IPO de 16,53% e 18,42% para as concentrações de 1,5% (15 µL/mL) e 2,0% (20 µL/mL), respectivamente (Monteiro et al. 2010). Nota-se, portanto, que o acetilcarvacrol pode resultar em efeitos semelhantes na oviposição de *R. microplus*, quando comparado a outros compostos, mesmo em concentrações pelo menos três vezes menores.

Todos os grupos tratados com acetilcarvacrol apresentaram período pré-oviposição estatisticamente maior em comparação aos grupos controle. Pereira Junior et al. (2019) também demonstraram um retardamento da oviposição ao utilizar concentrações subletais de carvacrol (16,48 µL/mL e 20,6 µL/mL) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. No tratamento de maior concentração, o tempo médio para o início da postura foi de 4,7 dias, valor ainda inferior aos 7,25 dias para oviposição observados no tratamento de maior concentração no presente trabalho. Pereira Junior et al. (2019) sugerem que esse prolongamento possa ter prejudicado a oviposição em *R. microplus*, já que foram observados valores reduzidos do peso médio da massa de ovos e da taxa de fecundidade (48,0 mg e 20,6%, respectivamente). O acetilcarvacrol também resultou em valores reduzidos do PM e TF em *R. microplus* (34,91 mg e 2,09%, respectivamente), sugerindo que os efeitos do carvacrol tenham sido intensificados após acetilação.

Não houve diferença entre os grupos tratados em relação ao período de incubação, ou seja, as doses subletais de acetilcarvacrol não prejudicaram diretamente o tempo necessário para o surgimento de novos indivíduos. Contudo, as taxas de eclosão nos grupos de tratamento foram extremamente reduzidas, quando comparadas a outros estudos. No grupo T3, apenas 7,22% de eclosão foi observada em *R. microplus*, valor quase 7 vezes menor que a TE no grupo C1. É provável que esta redução tenha ocorrido devido ao impacto do acetilcarvacrol na ovogênese, já que o composto é capaz de danificar a morfologia dos oócitos em *R. microplus*

(Konig et al. 2019). Konig et al. (2019) demonstraram que a exposição a 4,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de acetilcarvacrol em DMSO a 3% foi capaz de prejudicar o desenvolvimento dos ovócitos do carrapato-do-boi, ocasionando diminuição no tamanho e irregularidades na superfície celular, bem como vacuolização citoplasmática e alterações nucleolares.

As maiores porcentagens de redução da oviposição e de eclosão foram também observadas no grupo T3 (47,09% e 84,85% respectivamente). Isto ocorreu em virtude da redução significativa do peso da massa de ovos e da taxa de eclosão, respectivamente. A %Rovip observada no presente estudo foi superior àquela resultante do tratamento com 12,35 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol (34,30%) em carrapatos *R. microplus* (Pereira Junior et al. 2019). A %Recl, por sua vez, foi ainda maior quando comparada à detectada por Pereira Junior et al. (2019) para *R. microplus* tratados com 20,58 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol diluído em etanol (1.90%).

Em virtude dos reduzidos valores de PM e TE, a porcentagem de controle ou eficácia (%C) do acetilcarvacrol foi elevada, especialmente na concentração de 5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (91,69%). É válido ressaltar que o aumento de apenas 0,4 $\mu\text{L}/\text{ml}$ concentração do produto acetilado neste grupo foi capaz de elevar cerca de 1,8 vezes a %C em comparação ao grupo TII. Pereira Junior et al. (2019) obteve apenas 61,10% de eficácia em *R. microplus* tratados com 20,58 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol diluído em etanol. Ramírez et al. (2016) ao compararem os efeitos do carvacrol em *R. microplus* com os de seus derivados semissintéticos também observaram um aumento da eficácia e das porcentagens de redução da oviposição e eclosão nos compostos modificados, incluindo o acetilcarvacrol. A eficácia obtida por Ramírez et al. (2016) para 250 ppm ou 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de acetilcarvacrol em *R. microplus*, contudo, foi menor (26,33%) do que aquela obtida no presente trabalho. Isso porque, além de tratarem os animais com concentrações muito reduzidas do composto, Ramírez et al. (2016) utilizaram apenas os valores de IPO para o cálculo da eficácia, não considerando a taxa de eclosão, cujos dados poderiam ter contribuído para o aumento dessa porcentagem.

O processo de acetilação, em que o grupo hidroxila fenólica do carvacrol é substituído por um grupo éster, confere maior estabilidade ao composto e menor susceptibilidade à oxidação (Solomons et al. 2016). Diferentemente de seu composto de origem, cuja elevada eficácia se deu em virtude da baixa produção de ovos em *R. microplus* (Pereira Junior et al. 2019), o composto acetilado mostrou maior %C em concentrações muito menores, tanto pela redução no IPO quanto por ocasionar taxas de eclosão extremamente reduzidas nos ovos depositados. O composto acetilado, portanto, pode afetar o desempenho reprodutivo do carrapato-do-boi, podendo ser considerado um potencial método de controle para *R. microplus*.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais)

5. Referências

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2):446-475.
- Barimani A, Youssefi M, Tabari M. 2016. Traps containing carvacrol, a biological approach for the control of *Dermanyssus gallinae*. *Parasitology Research*. 115(9):3493-3498.
- Baser KC. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*. 14(29):3106-3119.

- Castro-Janer E, Martins JR, Mendes MC, Namindome A, Klafke GM, Schumaker TTS. 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Veterinary Parasitology*. 173(3-4):300-306.
- Damasceno SRB, Oliveira FRAM, Carvalho NS, Brito CFC, Silva IS, Sousa FBM, Silva RO, Sousa DP, Barbosa ALR, Freitas RM et al. 2014. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice [Article]. *Life Sciences*. 94(1):58-66.
- Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*. 66(1):130-133.
- Ferraz ABF, Balbino J, Zini C, Ribeiro V, Bordignon S, Poser G. 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. *Parasitology Research*. 107(1):243-248.
- Jonjejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*. 129:S3-S14.
- Jonsson NN. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*. 137(1-2):1-10.
- Konig IFM, Gonçalves RRP, Oliveira MVS, Silva CM, Thomasi SS, Peconick AP, Remedio RN. 2019. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*. 10(4):766-774.
- Lew-Tabor AE, Valle MR. 2016. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7(4):573-585.
- Lima-Souza JR, Oliveira PR, Anholeto LA, Arnosti A, Daemon E, Remedio RN, Camargo-Mathias MI. 2019. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). *Micron*. 116:66-72.

Lopes WDZ, Teixeira WFP, de Matos LVS, Felippelli G, Cruz BC, Maciel WG, Buzzulini C, Fávero FC, Soares VE, Oliveira GPD et al. 2013. Effects of macrocyclic lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. *Experimental Parasitology*. 135(1):72-78.

Matos RS, Melo DR, Monteiro CMO, Zeringóta V, Senra TOS, Calmon F, Maturano R, Prata MCA, Daemon E. 2014. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. *Parasitology Research*. 113(2):669-673.

Mesquita BM, Nascimento PGG, Souza LGS, Farias IF, Silva RAC, Lemos TLG, Monte FJQ, Oliveira IR, Trevisan MTS, Silva HC et al. 2018. Synthesis, larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of carvacrol/thymol and derivatives. *Química Nova*. 41(4):412-416.

Monteiro CMO, Daemon E, Silva A, Maturano R, Amaral C. 2010. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 106(3):615-619.

Novato T, Gomes GA, Zeringóta V, Franco CT, de Oliveira DR, Melo D, de Carvalho MG, Daemon E, de Oliveira Monteiro CM. 2018. In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) [Article]. *Veterinary Parasitology*. 260:1-4.

Pereira Junior AM, Camargo-Mathias MI, Daemon E, Peconick AP, Lima-Souza JR, Oliveira PR, Braga AS, Lara LJ, Remedio RN. 2019. Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction [Article]. *Natural Product Research*.

Ramírez C, Ibarra F, Pérez HI, Manjarrez N, Salgado HJ, Gonzales Y. 2013. In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 61(2):251-257.

Ramírez C, Ibarra F, Pérez HI, Manjarrez N, Salgado HJ, Ortega L. 2016. Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasite Epidemiology and Control*. 1(2):72-77.

Rodriguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C. 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology research*. 117(1):3.

Solomons TWG, Fryhle CB, Snyder SA. 2016. *Organic Chemistry*. 12th ed. John Wiley Sons Inc.

Tabari MA, Youssefi MR, Maggi F, Benelli G. 2017. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 245:86-91.

Vendramini MCR, Camargo Mathias MI, Faria A, Furquim KCS, Souza LP, Bechara GH, Roma GC. 2012. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. *Microscopy Research and Technique*. 75:1745-1754.