



Marcos Vinicius Silva de Oliveira

**EFICÁCIA DO COMPOSTO SEMI-SINTÉTICO
ACETILCARVACROL NO CARRAPATO *Rhipicephalus
sanguineus* lato sensu (LATREILLE, 1806) (ACARI:
IXODIDAE).**

Lavras - MG

2019

Marcos Vinicius Silva de Oliveira

**EFICÁCIA DO COMPOSTO SEMI-SINTÉTICO
ACETILCARVACROL NO CARRAPATO *Rhipicephalus*
sanguineus lato sensu (LATREILLE, 1806) (ACARI:
IXODIDAE).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Relação Parasito-hospedeiro e Controle de Vetores, para obtenção do título de Mestre.

Dr. Rafael Neodini Remedio

Orientador

Dra. Ana Paula Peconick

Coorientadora

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).

Oliveira, Marcos Vinicius Silva de.

EFICÁCIA DO COMPOSTO SEMI-SINTÉTICOACETILCARVACROL NO CARRAPATO *Rhipicephalussanguineus* lato sensu (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE). / Marcos Vinicius Silva de Oliveira. - 2019.

64 p. : il.

Orientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Coorientador(a): Ana Paula Peconick.

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

Bibliografia.

1. Controle. 2. Acaricida. 3. Carrapato-marrom-do-cão. I. Remedio, Rafael Neodini. II. Peconick, Ana Paula. III. Título.

Marcos Vinicius Silva de Oliveira

**EFICÁCIA DO COMPOSTO SEMI-SINTÉTICO
ACETILCARVACROL NO CARRAPATO *Rhipicephalus*
sanguineus lato sensu (LATREILLE, 1806) (ACARI:
IXODIDAE).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Relação Parasito-hospedeiro e Controle de Vetores, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 26 de abril de 2019

Dr. Rafael Neodini Remedio

Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães

Dr. Fernando Antônio Frieiro Costa

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio

Orientador

LAVRAS – MG

2019

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e à Universidade Federal de Lavras (UFLA) por prover recursos estruturais para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao técnico de laboratório de histologia e mestrando Isaac Filipe Moreira Konig pela ajuda e boa vontade nesse trabalho.

À minha esposa que tanto amo, Vanessa Alvarenga Silva, pela paciência, ajuda e companhia em laboratórios durante vários fins de semana.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Peconick, minha coorientadora, sempre prestativa e sorridente.

À Prof^a. Dr^a. Raquel Silva de Moura por sua imensa gentileza e colaboração ao ceder os animais para os experimentos desse trabalho, sem os quais não seria possível desenvolver a pesquisa e obter os resultados.

Ao Prof. Dr. Antônio Marcos Guimarães pela cortesia em ceder o Laboratório de Doenças Parasitárias.

Ao Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi por sua colaboração importante na acetilação do produto.

À Prof^a. Dr^a. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha, a quem tive a grande sorte de conhecer e com quem tenho uma dívida de gratidão, pois diante do meu maior obstáculo neste trabalho, em nosso primeiro contato, sem hesitar se propôs a ajudar prontamente.

Ao Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio, meu orientador, sem exageros, falta-me palavras para descrever seu extraordinário profissionalismo. Confesso que nunca antes me foi transmitido tanto conhecimento em tão pouco tempo de convívio e ao meu sentir, como professor que também sou, espero um dia chegar ao seu nível, para pode passar adiante seus conhecimentos com tamanha destreza e sapiência tal qual me foram apresentados, pois acredito piamente que a maior satisfação de um educador é observar a evolução de seu pupilo na busca pelo conhecimento.

“O fato de a gente não entender
alguma coisa não significa que ela
precisa ser explicada de uma forma
sobrenatural. A ciência vive da dúvida.
E a gente não precisa entender tudo
Para ter uma vida feliz e completa.
Prefiro viver com a dúvida do que ser
enganado por uma ilusão”

(Marcelo Gleiser)

RESUMO

Rhipicephalus sanguineus lato sensu (s.l.), também conhecido como carrapato-marrom-do-cão, está entre as principais espécies de carrapatos envolvidas na transmissão de patógenos a outros animais e ao homem. Por isso, é alvo de diferentes métodos de controle, como o uso de acaricidas sintéticos, por exemplo. Os compostos sintéticos, contudo, são responsáveis por efeitos tóxicos em hospedeiros e no meio ambiente, além de induzirem resistência em virtude de seu uso contínuo e indiscriminado. Isso tem levado à procura por métodos alternativos de controle, como o uso de extratos, óleos e princípios ativos oriundos de plantas. O acetilcarvacrol pode ser obtido a partir da acetilação do carvacrol, um monoterpene aromático extraído de plantas com reconhecida ação carrapaticida. Este processo proporciona um perfil farmacológico melhorado e maior eficácia ao composto. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial acaricida do acetilcarvacrol em fêmeas em jejum de carrapatos *R. sanguineus*, bem como determinar sua eficiência em doses subletais no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato-marrom-do-cão. A susceptibilidade de *R. sanguineus* ao acetilcarvacrol, diluído em solução de dimetilsulfóxido a 3% (DMSO 3,00%), foi avaliada por meio da determinação da concentração letal para 50,00 e 90,00% dos carrapatos, após Teste de Imersão de Adultos. A eficácia do acetilcarvacrol, por sua vez, foi determinada a partir da análise do desempenho reprodutivo de fêmeas ingurgitadas expostas a diferentes concentrações do produto. Para isso, as fêmeas alimentadas foram distribuídas em nove grupos: dois controles (água destilada e DMSO 3%) e sete tratamentos (1,40; 2,10; 2,80; 3,50; 5,00; 6,50 e 8,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Foram avaliados, então, os seguintes parâmetros para cada grupo: índice de produção de ovos (IPO), taxa de eclosão (TE), taxa de fecundidade (TF), período de pré-oviposição, período de incubação, taxa de reprodução estimada (RE), porcentagem de redução da oviposição e da eclosão, e eficácia do produto ou porcentagem de controle (EP). As concentrações letais obtidas para 50,00 e 90,00% dos animais foram, respectivamente, 2,83 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 7,16 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Com relação ao desempenho reprodutivo, os animais expostos a 8,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do produto mostraram os menores valores de IPO, TE, TF e RE. A EP na maior concentração (8,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$) foi de 90,90%, com redução de 51,73% e 83,27% na oviposição e na eclosão, respectivamente. Sendo assim, os resultados demonstraram que o acetilcarvacrol possui atividade acaricida sobre *R. sanguineus* s.l., além de afetar sua reprodução, quando aplicado em concentrações subletais.

Palavras-Chave: Controle, Acaricida, Fitoterápico, Carrapato-marrom-do-cão.

ABSTRACT

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.), also known as the brown dog tick, is among the major tick species involved in the transmission of pathogens to animals and humans. Therefore, it is subject to different control methods, such as the use of synthetic acaricides, for example. Synthetic compounds, however, are responsible for toxic effects on hosts and the environment and induce resistance because of their continuous and indiscriminate use. This has led to the search for alternative methods of control, such as the use of extracts, oils and active ingredients from plants. Acetylcarvacrol can be obtained from the acetylation of carvacrol, an aromatic monoterpene extracted from plants with recognized acaricidal action. This process provides an improved pharmacological profile and greater efficacy to the compound. In this context, this work aimed to evaluate the acaricidal potential of acetylcarvacrol in unfed *R. sanguineus* female ticks, as well as to determine their efficiency in sublethal doses in the control of engorged females of the brown dog tick. The susceptibility of *R. sanguineus* to acetylcarvacrol, diluted in 3,00% dimethylsulfoxide solution (3,00% DMSO), was evaluated by determining the lethal concentration for 50,00 and 90,00% of ticks after Adult Immersion Test. The efficacy of acetilcarvacrol, in turn, was determined from the analysis of the reproductive performance of engorged females exposed to different concentrations of the product. For this, engorged females were divided into nine groups: two controls (distilled water and 3,00% DMSO) and seven treatments (1,40; 2,10; 2,80; 3,50; 5,00; 6,50 and 8,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$). The following parameters were then evaluated for each group: egg production index (EPI), hatching rate (HR), fecundity rate (FR), pre-oviposition period, incubation period, estimated reproduction rate (ER), oviposition and hatch reduction percentage, and product efficacy or percentage of control (PE). The lethal concentrations obtained for 50 and 90% of the animals were, respectively, 2.83 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 7.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Regarding reproductive performance, the animals exposed to 8.00 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the product showed the lowest values of EPI, HR, FR and ER. The PE at the highest concentration (8,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$) was 90.90%, with reduction of 51.73% and 83.27% in oviposition and hatching, respectively. Thus, the results showed that acetylcarvacrol has acaricidal activity on *R. sanguineus* s.l., and affects its reproduction when applied in sublethal concentrations.

Keywords: Control, Acaricide, Phytotherapy, brown dog tick.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média \pm desvio padrão (mg) dos pesos das fêmeas em jejum, número de indivíduos utilizados (n), mortalidade e % de mortalidade de carrapatos *R. sanguineus* s.l. submetidos ao primeiro bioensaio do teste de imersão de adultos, para determinação da concentração letal do acetilcarvacrol diluído em DMSO a 3%.

Tabela 2. Média \pm desvio padrão (mg) dos pesos das fêmeas em jejum, número de indivíduos utilizados (n), mortalidade e % de mortalidade de carrapatos *R. sanguineus* s.l. submetidos ao segundo bioensaio teste de imersão de adultos, para determinação da concentração letal do acetilcarvacrol diluído em DMSO a 3%.

Tabela 3. Média \pm desvio padrão (g) dos pesos das fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. completamente ingurgitadas (PF) e da massa de ovos (PM), após tratamento com acetilcarvacrol em diferentes concentrações subletais.

Tabela 4. Média \pm desvio padrão do índice de produção de ovos, taxa de eclosão (%) e taxa de fecundidade de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. submetidos ao teste de desempenho reprodutivo, após tratamento com acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

Tabela 5. Média \pm desvio padrão do período de pré-oviposição (dias), período de incubação (dias) e reprodução estimada de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. submetidos ao teste de desempenho reprodutivo, após tratamento com acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resultado da análise Probit, demonstrando a previsão de mortalidade (Predicted) de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. em jejum após exposição a diferentes concentrações de acetilcarvacrol, diluído em DMSO 3% (Concentration).

Gráfico 2: Porcentagem da redução da oviposição (%Rovip), com base no IPO, de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. expostas ao acetilcarvacrol em diferentes concentrações subletais.

Gráfico 3: Porcentagem da redução da eclosão (%Reclo) das larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. expostas ao acetilcarvacrol em diferentes concentrações subletais.

Gráfico 4: Eficácia do produto (EP) nos diferentes grupos, em comparação ao grupo controle (C1).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* e as vias de transmissão de patógenos.

Figura 2: Síntese de acetilcarvacrol a partir da reação do carvacrol com anidrido acético e hidróxido de sódio. Além do acetilcarvacrol, água e acetato de sódio são formados na reação.

Figura 3: Métodos para manutenção de colônia experimental de carrapatos.

Figura 4: Parte interna da câmara alimentadora em coelho New Zeland White, contendo machos e fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l..

Figura 5: Fêmeas de *R. sanguineus* s.l em processo de postura de ovos.

LISTA DE SIGLAS

BCSTM - Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology

BIOPAR - Laboratório de Biologia Parasitária

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CL50 - Concentração Letal 50%

CL90 - Concentração Letal 90%

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMV - Departamento de Medicina Veterinária

DQI - Departamento de Química

IPO - Índice de Produção de Ovos

PF - Peso da Fêmea

PI - Período de Incubação

PM - Peso da Massa de Ovos

PPO - Período de Pré-Oviposição

RE - Reprodução Estimada

TE - Taxa de Eclosão

TF - Taxa de Fecundidade

TIA - Teste de Imersão de Adulto

UFLA - Universidade Federal de Lavras

UNESP - Universidade Estadual Paulista

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. O <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. (Latreille, 1806).	16
2.1. Controle.....	20
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Locais de estudo.....	26
4.2. Carrapatos	26
4.3. Substância química	28
4.4. Susceptibilidade de <i>R. sanguineus</i> s.l. ao acetilcarvacrol	28
4.4.1. Determinação das concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₀).....	28
4.4.2. Avaliação da ação do acetilcarvacrol em concentrações subletais.....	29
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO	51
8. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são de porte pequeno em torno de 0,25 mm de diâmetro quando não alimentados ou pouco alimentados, achatados dorsoventralmente, com a extremidade ovalada ou em elipse e a superfície dorsal moderadamente convexa. Seu aparelho bucal é muito quitinizado, com uma única estrutura denominada capítulo ou gnatosoma, que se divide em base do capítulo, palpos, hipostômio e quelíceras. Os dois últimos formam as peças bucais (NEVES et al., 2016).

Na parte dorsal do idiossoma (corpo) dos carrapatos ixodídeos encontra-se o escudo, que nos machos cobre praticamente todo o dorso, enquanto nas larvas, ninfas e fêmeas reveste aproximadamente um terço da região anterior dorsal. Na parte ventral do idiossoma estão as pernas, dipostas em quatro pares em ninfas e adultos, e apenas três pares em larvas. A abertura anal e os orifícios genitais, ausentes em larvas em ninfas, podem ser encontrados na porção posterior do ventre. Em todos os grupos de carrapatos, o ciclo de vida consiste em quatro estágios de desenvolvimento: o ovo e três fases parasitárias ativas, larva, ninfa e adulto. Os adultos podem ser divididos em macho e fêmea (SONENSHINE; ROE; 2014). Entre os ixodídeos, os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* apresentam grande importância médico-veterinária, sendo reconhecidos transmissores de microorganismos como *Ehrlichia canis*, causador da erliquiose monocítica canina, e *Babesia canis*, causadora da babesiose canina (PAZ et al., 2008; BLAGBURN; DRYDEN, 2009). Embora tenham os cães como seus hospedeiros preferenciais, casos de parasitismo em humanos têm sido ocasionalmente descritos (CARPENTER et al., 1990; MANFREDI et al., 1999; USPENSKY, IOFFE-USPENSKY, 2002).

Os defensivos químicos, principalmente sintéticos, são a forma de controle mais utilizada comercialmente, embora provoquem danos generalizados ao atacar tanto organismos alvos quanto não alvos. Isso pode promover a seleção de populações resistentes após utilização de longa duração, além de ocorrer bioacumulação em toda a cadeia alimentar (FURTADO et al., 2013).

Fugir dos produtos convencionais em busca de uma solução alternativa é um pensamento que vem evoluindo (FLAMINI, 2003). Um país como o Brasil dispõe de uma vasta biodiversidade em nível de flora, o que oferece uma grande oferta em extratos de plantas, óleos essenciais e seus princípios ativos. Isso pode reduzir os custos de aplicação, em comparação aos compostos sintéticos. Além disso, estes produtos apresentam rápida degradação e geram baixa contaminação ao meio ambiente (BORGES et al., 2011).

Em geral, os óleos e essências vegetais que possuem as mais efetivas propriedades pesticidas contêm uma grande porcentagem de carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), um monoterpeno aromático oxigenado com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ (KOC et al., 2013). Sua acetilação ou processo de substituição nucleofílica acílica (PUB CHEM, 2018) possibilita a obtenção do acetilcarvacrol (5-isopropil-2-metilfenol acetato), um composto semissintético com atividade anti-helmíntica (ANDRE et al., 2016), antiesquistossômica (DE MORAES et al., 2013) e carrapaticida (RAMIREZ et al., 2013, 2016), além de atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante e potencial ansiolítico (ALVARENGA *et al.*, 2017; DAMASCENO *et al.*, 2014).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do acetilcarvacrol sobre fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* lato sensu (s.l.), por meio da determinação da concentração letal deste composto, bem como da avaliação dos parâmetros reprodutivos e determinação de sua eficácia em concentrações subletais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos pertencentes ao Domínio Eucariota, Reino animal, Sub-Reino Metazoa, Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida. Estão distribuídos em três Famílias: Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae (REY, 2013).

Os carrapatos ixodídeos, conhecidos popularmente como “carrapatos duros”, apresentam uma estrutura esclerotizada na região dorsal, conhecida como escudo, que garante resistência para seu corpo. Já os argasídeos são chamados de “carrapatos moles” por não possuírem um escudo dorsal. Os Nuttalliellidae, por sua vez, contam com apenas uma espécie descrita, *Nuttalliella namaqua*, conhecida como “fóssil vivo” pois apresenta características exclusivas dos carrapatos duros e moles, o que a coloca em uma posição basal na árvore evolutiva dos carrapatos (SONENSHINE; ROE; 2014).

Os carrapatos estão entre os maiores transmissores de microrganismos patogênicos tanto para animais domésticos ou selvagens quanto para humanos, quando comparados a qualquer outro grupo de artrópodes vetores em todo mundo (RAOULT e ROUX, 1997; JONGEJAN; UILENBERG, 2004; LABUDA e NUTTALL, 2004). O gênero *Rhipicephalus* compreende aproximadamente 79 espécies (BARKER e MURRELL, 2004; GUGLIELMONE, et al., 2010), incluindo *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu (s.l.), também conhecido como o carrapato-marrom-do-cão.

2.1. O *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille, 1806).

Os carrapatos *R. sanguineus* são capazes de transmitir uma grande variedade de microrganismos causadores de doenças como, por exemplo: *Ehrlichia canis*, bactéria causadora da erliquiose monocítica canina (GROVES et al. 1975; MORAES-FILHO et al., 2015); *Babesia canis vogeli*, protozoário causador da babesiose canina (REGENDANZ, MUNIZ 1936; MGHIRBI, BOUATTOUR, 2008); *Hepatozoon canis*, protozoário causador da hepatozoonose canina (NORDGREN e CRAIG, 1984; BANETH et al., 2001); *Rickettsia conorii*, bactéria causadora da Febre Maculosa do Mediterrâneo (BRUMPT, 1932; MATSUMOTO et al., 2005). Ademais, são prováveis vetores de *R. rickettsi*, causadora da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (PARKER et al. 1933; DEMMA et al., 2005), além de serem capazes de transmitir mais de um microrganismo concomitantemente em um mesmo

repasto sanguíneo, possibilitando que o animal hospedeiro adquira mais de uma doença ao mesmo tempo (VAIRAMUTHU et al., 2012). Particularmente em suas fases de larva e ninfa, esta espécie é capaz de se alimentar em humanos em maior frequência do que se julgava previamente (CARPENTER et al., 1990; HARRISON et al., 1997; MANFREDI et al., 1999), sendo potencial vetor de *R. conorii* e *R. rickettsi* (PALMAS et al., 2001).

Em 1806, Pierre André Latreille descreveu o carrapato *R. sanguineus* como “vermelho sangue, pontuado, posteriormente com três linhas impressas, e nenhuma mancha distinta torácica anterodorsalmente”. Era uma descrição simples, mas aceitável para a época, visto que a taxonomia estava em seu início. Originalmente descrito como "*Ixodes sanguineus*" por Latreille, este carrapato foi posteriormente reclassificado como pertencente ao gênero *Rhipicephalus* (KOCH, 1844).

Entretanto os conflitos de nomenclatura ainda continuavam. O chamado *R. sanguineus* passou, então, a ser considerado como um grupo de 17 espécies diferentes, sendo chamado de *R. sanguineus* lato sensu (CAMICAS et al., 1998). Mais recentemente, foi reclassificado como um complexo de 16 espécies (NAVA et al., 2015). Outros estudos descreveram a possível existência de duas linhagens divergentes dentro de *R. sanguineus* s.l.: a chamada "linhagem temperada" ou “linhagem do sul”, que inclui carrapatos presentes na Argentina, Uruguai e Chile; e a “linhagem tropical” ou “linhagem de norte”, incluindo carrapatos do Brasil, Paraguai, Colômbia e de duas localidades do norte da Argentina (OLIVEIRA et al., 2005; SZABÓ et al., 2005; NAVA et al., 2012). Carrapatos identificados como *R. sanguineus* s.l. da chamada "linhagem do norte" foram encontrados exclusivamente em cães, enquanto *R. turanicus* apresentou maior variedade de hospedeiros, sendo encontrados em bovinos, caprinos, equinos, cães, gatos e lebres da Córsega. Os carrapatos *R. sanguineus* s.l. foram também identificados em outros continentes, em pelo menos 11 países: Austrália, Brasil, Colômbia, Costa Rica, França, Guatemala, Honduras, Índia, África do Sul, Tailândia e Vietnã. Uma alta convergência genética foi detectada dentro e entre as populações de carrapatos identificados como *R. sanguineus* s.l. independentemente de sua origem geográfica (DANTAS-TORRES et al., 2013).

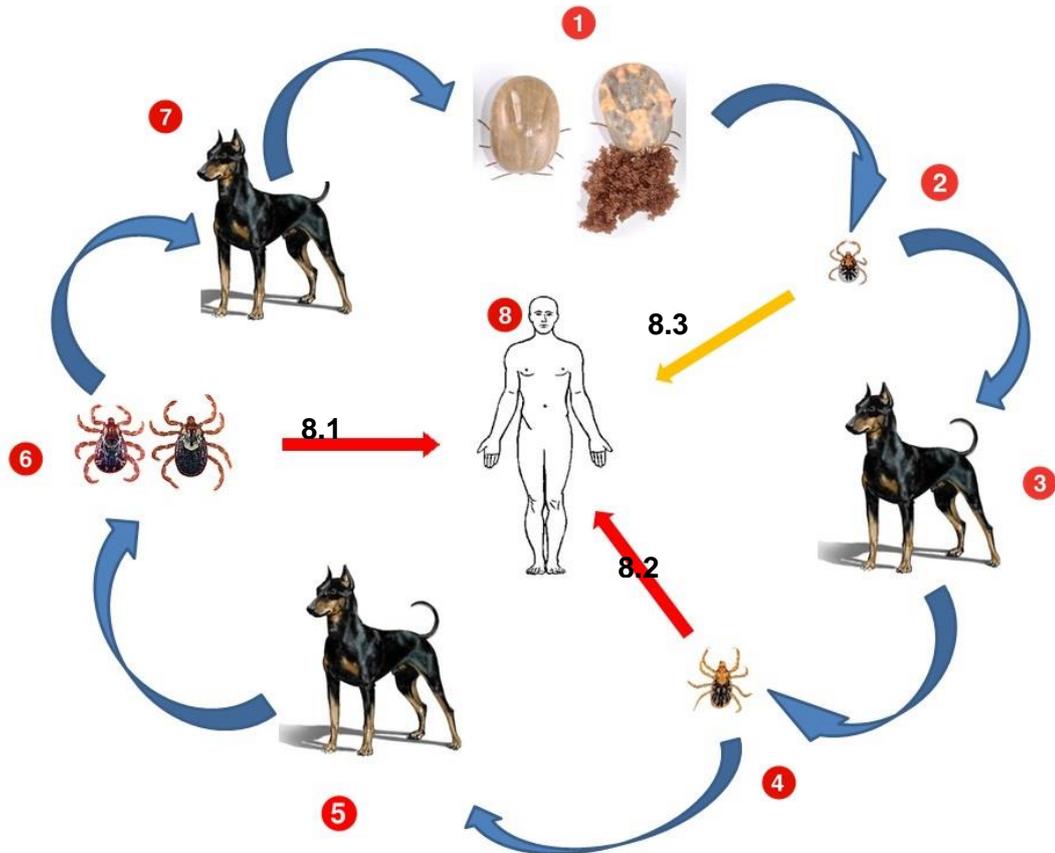
Quando realizadas análises moleculares, biológicas e morfométricas, foi confirmada a existência das duas linhagens, e variações dentro de uma mesma linhagem foram também observadas devido a um alto nível de polimorfismos intraespecíficos, tornando a classificação morfológica dessas espécies uma tarefa difícil (SANCHES, et al., 2016). Definitivamente, até que a espécie seja redescrita com base em um consenso entre taxonomistas, o uso do nome *R. sanguineus* sensu stricto deve ser evitado (DANTAS-TORRES et al., 2013).

O ciclo de vida de todos os carrapatos duros consiste em quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto. Cada estágio ativo se alimenta apenas uma vez na vida, embora as fêmeas separadas à força de seus hospedeiros sejam capazes de refixar e continuar a ingestão de sangue. No entanto, após atingir uma massa crítica, as fêmeas desprendidas não conseguem se reconectar ao hospedeiro, embora possam produzir alguns ovócitos. É interessante notar que, após um determinado período de tempo de alimentação e o consumo de certa quantidade de sangue, as fêmeas separadas de seus hospedeiros podem realizar a oviposição (BALASHOV, 1998; SZABO, BECHARA, 1999).

Em condições laboratoriais padronizadas, o tempo para ingurgitamento completo de fêmeas adultas de *R. sanguineus* varia de 7 a 12 dias. Já o período de pré-oviposição tem duração de 8 a 23 dias, enquanto o de incubação varia 28 a 35 dias. O ciclo de vida completo de *R. sanguineus* tem, portanto, entre 162 e 177 dias (TROUGHTON; LEVIN, 2007). No entanto, a comparação de parâmetros biológicos de *R. sanguineus* de duas regiões diferentes do Brasil e Argentina mostrou menor tempo de ingurgitamento e peso reduzido das fêmeas ingurgitadas obtidas em território brasileiro (SZABÓ et al., 2005), reforçando a possível existência de diferenças entre carrapatos da mesma espécie, em regiões diferentes.

A grande maioria dos carrapatos ixodídeos é caracterizada por um ciclo vida trioxeno (Figura 1), ou seja, necessita de três hospedeiros para completar seu processo de alimentação e reprodução (KOSHY et al., 1983; PEGRAM et al., 1987). As larvas caem do hospedeiro após a alimentação e mudam para o estágio de ninfa; subsequentemente, as ninfas não alimentadas buscam um novo hospedeiro e podem se ligar ao mesmo ou a um vertebrado diferente, alimentando-se nele e abandonando-o com o objetivo de fazer a muda para o estágio adulto no ambiente. Os adultos, então, encontram seu hospedeiro, as fêmeas alimentam-se e acasalam e, após estarem completamente ingurgitadas, desprendem-se do seu local de fixação e se deslocam ao ambiente. As fêmeas ingurgitadas colocam todos os seus ovos continuamente durante um período de vários dias, morrendo em seguida (OLIVER, 1982). Uma única fêmea de *R. sanguineus* pode fazer a oviposição de, em média, 4 mil ovos. Dependendo da temperatura, período de alimentação e tempo de oviposição, este número pode ultrapassar 7 mil (KOCH, 1982). O acasalamento e a cópula ocorrem no hospedeiro, depois que o macho é alimentado (PAPPAS; OLIVER, 1971). A quantidade de volume de sangue consumida pelos machos é consideravelmente menor do que a consumida pelas fêmeas, e a massa corporal dos machos aumenta apenas cerca de 1,50 a 2,00 vezes (SONENSHINE; ROE; 2014).

Figura 1: Ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* s.l. e as vias de transmissão de patógenos.



1- Fêmeas adultas deixam o hospedeiro após o ingurgitamento completo para a realização da oviposição. **2-** Larvas eclodem dos ovos. **3-** As larvas se alimentam no primeiro hospedeiro do ciclo trioxeno. **4-** As larvas fazem a muda para o estágio de ninfa no ambiente, logo após deixarem o primeiro hospedeiro. **5-** As ninfas infestam o segundo hospedeiro. **6-** As ninfas descem para o ambiente realizarem a muda para o estágio adulto. **7-** Os adultos buscam o terceiro hospedeiro para alimentação e acasalamento. **8-** O ser humano pode adquirir patógenos de qualquer fase do ciclo de vida do carrapato. Carrapatos adultos (**8.1**) e ninfas (**8.2**) infectadas podem se alimentar de humanos e transmitir grande diversidade de patógenos. Em larvas (**8.3**), existe a possibilidade de transmissão de patógenos para humanos, embora seja necessária investigação adicional. Fonte: do autor

2.1. Controle

O controle de ectoparasitas por meio do uso de produtos químicos ainda é a forma mais utilizada e eficaz de tratamento, tanto no meio agropecuário, quanto em animais domésticos, desde que aplicado de forma adequada (GOMES et al., 2011). Quando utilizados incorretamente e de forma indiscriminada, estes produtos podem acelerar a seleção de populações de carrapatos resistentes aos diferentes tipos de defensivos químicos (FREITAS et al., 2004; JUNIOR et al., 2005), gerando a necessidade de dosagens maiores e aplicações em intervalos menores (KLAFKE et al., 2017). Além disso, estes produtos podem gerar efeitos tóxicos em animais, plantas e seres humanos, bem como contaminar o solo e a água (TSABOULA et al., 2016).

Com um pensamento mais ecológico e sustentável, iniciou-se uma busca por produtos não convencionais para controlar infestações de carrapatos. Como o Brasil possui uma grande diversidade de plantas, os seus derivados vêm ganhando espaço no controle populacional destes animais (ALVES et al., 2012). Óleos essenciais e extratos vegetais se ofertam como possibilidade esperançosa no controle desses parasitos devido à ampla variedade de espécies de plantas com propriedade antiparasitária, grande abundância e baixo custo (BENELLI et al., 2016).

Inúmeros experimentos com extratos vegetais, óleos essenciais e princípios ativos isolados de diversas espécies de plantas têm sido realizados em todo mundo, na tentativa de controlar populações de carrapatos em diferentes estágios de vida. Estes métodos de controle podem ocorrer por meio da mortalidade quanto da redução do potencial reprodutivo dos parasitos, tendo demonstrado resultados significativos (KHODADAD; MEHDI, 2007; ANDREOTTI, et al., 2013; CAMPOS, et al., 2015; PAZINATO, et al. 2016)

Para que se realize o controle de *Rhipicephalus sanguineus* em ambiente urbano ou na vegetação, ou seja, durante suas fases de vida livre, deve ser levado em conta o comportamento deste ectoparasita, bem como de seu hospedeiro vertebrado. Isso porque, após repasto sanguíneo, tanto ninfas quanto adultos, se desprendem e caem no ambiente no período noturno. Isso sugere que a identificação dos locais frequentados por seus hospedeiros é essencial, já que, provavelmente, nestes lugares estará presente a maior parte da população de vida livre do carrapato-marrom-do-cão. Assim, pode-se garantir maior sucesso na aplicação de um tratamento com carrapaticidas (PAZ et al., 2008).

2.1. Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um monoterpene fenólico com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$. Está presente em várias espécies de plantas medicinais e aromáticas, especialmente tomilho (*Thymus* sp.) e orégano (*Origanum* sp.) (KULISIC et al., 2004). É utilizado, há bastante tempo e em grande escala, como aditivo alimentar pela indústria alimentícia, por ser capaz de conservar os alimentos (BASER, 2008; GUARDA et al., 2011).

O carvacrol demonstrou ação antiviral contra Herpes Simplex tipo 1, com efeito inibitório, provavelmente devido a uma interação direta entre o composto e a membrana do vírus, pertinente a composição do grupo hidrofílico no anel de benzeno da molécula. Isso sugere que a aplicação tópica de carvacrol para o tratamento de infecções por vírus Herpes Simplex tipo 1 pode ser uma alternativa potencialmente menos dispendiosa para indústria de medicamentos antivirais (LAI et al., 2012).

Este princípio ativo também se mostrou bem sucedido em sua ação antioxidante, quando comparado com óleos essenciais. Os antioxidantes têm a capacidade de proteger as células dos danos causados por radicais livres, servindo como agentes quimiopreventivos que inibem a geração de novos radicais livres e desempenham papel importante na neutralização do dano oxidativo causado por esses compostos. Estas propriedades os tornam importantes na manutenção da saúde humana e proteção de doenças (ANTHONY et al., 2012).

Quando testado para em diferentes cepas de *Candida albicans*, causadoras da candidíase, o carvacrol exibiu atividade fungicida, enquanto o fluconazol, utilizado como controle positivo, apresentou atividade fungistática. Os efeitos antifúngicos do carvacrol foram atribuídos à sua capacidade de inibir a biossíntese do ergosterol e tornar a membrana citoplasmática do fungo porosa (AHMAD et al., 2011).

Onze espécies de bactérias patogênicas humanas (*Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Micrococcus flavus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* e *Staphylococcus aureus*) foram expostas a vários princípios ativos de óleos essenciais de plantas aromáticas, entre eles o carvacrol, utilizando-se como controle positivo a estreptomicina, uma aminoglicosídeo antibiótico. Entre os compostos com atividade antibacteriana, o carvacrol demonstrou ação muito mais forte e ainda superior à estreptomicina. Esta propriedade antimicrobiana do carvacrol está relacionada à sua estrutura fenólica, possivelmente interferindo na atividade de enzimas da parede celular da bactéria, como a quitina sintetase ou a quitinase (SOKOVIC et al., 2010),.

As propriedades biológicas de dezenove óleos essenciais e sete de seus princípios ativos foram testadas contra parasitas *Leishmania chagasi* nas formas promastigota e amastigota, e *Trypanosoma cruzi* nas formas epimastigota e amastigota. O carvacrol demonstrou atividade contra a forma de vida amastigota de *T. cruzi* em concentração letal média (CL₅₀) e apresentou atividade moderada contra a forma de vida promastigota para *L. chagasi*, também em concentração letal média (CL₅₀) (ESCOBAR, et al., 2010).

Foi demonstrado que os óleos essenciais das plantas *Origanum minutiflorum* e *Origanum onites* L., ricos em carvacrol, possuem propriedades inseticidas para o mosquito *Culex pipiens* L. Uma correlação positiva foi encontrada entre a concentração de carvacrol presente no óleo essencial e sua ação larvicida, que ocorre possivelmente devido ao maior percentual de acúmulo do produto nas plantas testadas (CETIN; YANIKOGLU, 2008).

O uso de óleos essenciais contendo carvacrol foi responsável por mortalidade significativa de carrapatos de diferentes espécies. Em *Rhipicephalus turanicus*, o óleo essencial de *Origanum bilgeri* em concentrações relativamente baixas gerou mortalidade de 73,30% de fêmeas adultas em jejum. O carvacrol puro, por sua vez, foi responsável por resultado semelhante, com mortalidade de 70,00%, também em concentrações reduzidas (KOC et al., 2013). Já as concentrações letais de carvacrol, diluído em álcool etílico 96,00%, para 50,00% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) de *R. turanicus* foram de 2,34% e 7,12% respectivamente. O composto puro (100,00%) gerou mortalidade total após seis horas de exposição (COSKUN et al., 2008).

O óleo essencial de *Lippia triplinervis*, na concentração de 5,00 mg/mL, foi suficiente para matar 100,00% de larvas de *Rhipicephalus microplus*, enquanto a concentração de 50,0 mg/mL resultou em 98,00% de eficácia em fêmeas ingurgitadas (LAGE et al., 2013). A exposição destes animais ao óleo essencial de *Lippia gracilis*, por sua vez, gerou mortalidade de 50,00% da população de larvas e fêmeas ingurgitadas nas concentrações de 1,31 mg/mL (genótipo LGRA-201) e 4,66 mg/mL (genótipo LGRA-106), respectivamente. Contudo, as concentrações de 0,22 mg/mL e 4,46 mg/mL de carvacrol isolado foram capazes de gerar mortalidade em metade da população de larvas e fêmeas ingurgitadas, respectivamente (CRUZ et al., 2013). O carvacrol diluído em etanol também apresentou um bom desempenho no controle reprodutivo de *R. microplus*. Na dosagem de 100,00% da CL₅₀ (20,11 mg/mL), o produto manifestou capacidade de diminuir expressivamente a porcentagem de oviposição (61,59% de redução na massa de ovos), gerando 61,10% de eficácia. Desta forma, pode afetar diretamente no ciclo de vida do carrapato-do-boi, reduzindo o número de indivíduos das gerações futuras (PEREIRA JÚNIOR et al. 2019). Já em larvas não ingurgitadas de *R.*

microplus, as CL₅₀ e CL₉₀ do carvacrol foram, respectivamente, 0,83 mg/mL e 2,02 mg/mL. Além disso, este composto ocasionou mortalidade de 100,00% dos animais na concentração de 2,50 mg/mL (NOVATO et al., 2018).

O carvacrol diluído em etanol 50,00% (2,50 µL/mL) também apresentou ação tóxica contra larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense*, causando mortalidade 45,00% e 64,60% respectivamente. Nesta mesma concentração, 100% de mortalidade foi observada em larvas e ninfas de *R. sanguineus* (SENRA et al., 2013).

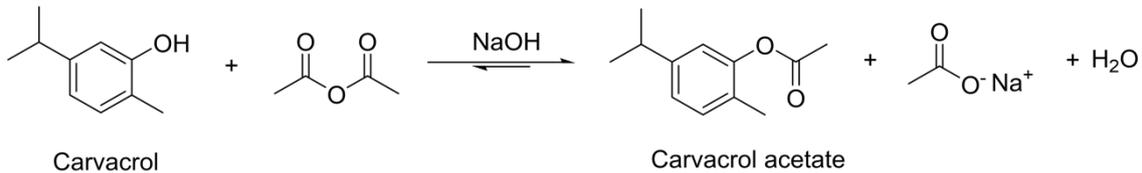
Plantas medicinais como *Lippia origanoides* têm em seu óleo essencial o carvacrol como a substância de maior concentração. Teste feito com este óleo essencial para avaliar sua toxicidade em ratos Wistar não mostrou alterações significativas nos parâmetros bioquímicos, histopatológicas e hematológicos, como também não houve alteração no peso e no comportamento dos animais (ANDRADE et al., 2014).

O óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* que contém carvacrol em sua composição e o carvacrol isolado foram comparados quanto a sua toxicidade, em células e organelas de diferentes mamíferos como rato, camundongo e boi. O carvacrol mostrou uma toxicidade significativamente menor que o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (MONZOTE et al., 2009). Também não houve alterações no comportamento de camundongos albinos suíços submetidos ao teste de toxicidade aguda, nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2000 mg/ml de carvacrol e observado por 15 dias (ANDRE et al., 2016).

2.3. Acetilcarvacrol

O acetilcarvacrol (5-isopropil-2-metilfenol acetato), obtido pelo processo de acetilação ou substituição nucleofílica acídica do carvacrol (PUB CHEM, 2018), tem se mostrado uma promissora alternativa ao uso de seu composto de origem. A presença de um grupo éster em vez do grupo hidroxila, presente no carvacrol, pode proporcionar características de segurança, bem como aumentar sua eficácia, conferindo maior estabilidade ao composto pela conversão da hidroxila fenólica, mais susceptível à oxidação, em um grupamento éster (SOLOMONS et al., 2016). Por este motivo, este composto tem sido sintetizado a fim de se obter um derivado com perfil farmacológico melhorado e menor toxicidade aos organismos não-alvos (DAMASCENO et al., 2014).

Figura 2: Síntese de acetilcarvacrol a partir da reação do carvacrol com anidrido acético e hidróxido de sódio. Além do acetilcarvacrol, água e acetato de sódio são formados na reação.



Fonte: KONIG et al., 2019.

O acetilcarvacrol, diluído em Tween 80, mostrou atividade biológica antinematódeos gastrointestinais de ovelhas (*Haemonchus contortus*). Apesar de terem sido utilizadas concentrações maiores que as do carvacrol, foi verificada a inibição na conversão lavar, bem como maior mortalidade para larvas à medida que a concentração foi elevada. Além disso, no mesmo experimento, o composto acetilado mostrou ser menos tóxico em camundongos mesmo quando aplicado o dobro da concentração do carvacrol (ANDRE et al., 2016).

O composto acetilado, dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO) a 0,05%, mostrou com pioneirismo ação anti-helmíntica, interferindo na atividade motora e causando mortalidade de 100% em indivíduos adultos da espécie *Schistosoma mansoni*, a partir da concentração 10,00 µg/mL. Além disso, demonstrou efeito inibitório na produção diária de ovos, com resultado significativo a partir da concentração de 3,12 µg/mL em todo tempo de observação (MORAES et al., 2012).

Quatro espécies diferentes de bactérias (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus megatium*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis*) foram expostas ao acetilcarvacrol na concentração de 20,00 mg/mL e diluídos em acetona, que demonstrou eficácia biológica antibacteriana, com bioatividade superior à do seu precursor carvacrol (NIKUMBH et al., 2003).

Tanto o carvacrol quanto o acetilcarvacrol foram testados em diferentes estágios de vida do carrapato-do-boi, *R. microplus*. Para o estágio larval, o acetilcarvacrol apresentou um maior percentual de mortalidade; já na fase adulta, tanto para o teste de redução da oviposição quanto para inibição da eclosão, ambos apresentaram efeitos semelhantes e proporcionais. Os demais resultados para adultos de carrapato-do-boi demonstraram que o derivado

acetilcarvacrol apresentou uma melhor eficácia carrapaticida (RAMÍREZ et al., 2016). Em outro estudo o acetilcarvacrol e o carvacrol foram colocados em prova, em larvas não ingurgitadas de *R. microplus*. O acetilcarvacrol mostrou ser menos letal, sendo necessária uma dosagem 50,00% maior de acetilcarvacrol para obter a mesma taxa de 100,00% mortalidade do carvacrol. Segundo os autores, isso pode estar relacionado à ausência do grupo hidroxila na molécula do composto acetilado, que confere menor atividade em carrapatos neste estágio de desenvolvimento (NOVATO, et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade acaricida do composto semi-sintético acetilcarvacrol em fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s.l., em jejum, bem como determinar sua eficácia em doses subletais após ingurgitamento completo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade de fêmeas em jejum de carrapatos *R. sanguineus* s.l. ao acetilcarvacrol, diluído em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 3,00% (DMSO 3,00%), por meio da determinação da concentração letal para 50,00 e 90,00% dos indivíduos (CL₅₀ e CL₉₀).
- Analisar, após o tratamento de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. com concentrações subletais de acetilcarvacrol, diluído DMSO a 3,00%, o desempenho reprodutivo (índice de produção de ovos, taxa de fecundidade, taxa de reprodução estimada e porcentagens de redução na oviposição e eclosão) destes animais, bem como a eficácia do produto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de estudo

O desenvolvimento do trabalho foi realizado mediante utilização dos equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Biologia Parasitária (BIOPAR) e Laboratório de Doenças Parasitárias, do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), da Universidade Federal de Lavras (UFLA, Lavras/MG, Brasil).

4.2. Carrapatos

Machos e fêmeas de carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae), originários do banco de carrapatos do Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM), localizado no Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP, Rio Claro/SP, Brasil), foram mantidos em colônias experimentais para a obtenção dos espécimes utilizados neste trabalho. Os animais foram liberados em câmaras alimentadoras especiais, acopladas ao dorso de coelhos da raça New Zealand White (Figura 3), sem exposição prévia a carrapatos, segundo metodologia descrita

por Bechara et al. (1995). As câmaras foram presas ao dorso dos animais por meio do uso da Pasta Unna (FACCINI et al., 2006), uma substância adesiva atóxica produzida em laboratório a partir de água destilada, gelatina em folha, glicerina e óxido de zinco, segundo modificação da técnica de NEITZ et al. (1971). Todos os procedimentos experimentais envolvendo a utilização de animais vertebrados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (Protocolo 043/18 de 24/05/2018).

Figura 3: Métodos para manutenção de colônia experimental de carrapatos. **(A)** Coelho antes da tosa; **(B)** Coelho tricotomizado; **(C)** Câmara fixada no local da tosa; **(D)** Colar de proteção; **(E)** Infestação com fêmeas e machos em jejum; **(F)** Fêmeas fixadas ingurgitando e fêmeas ingurgitadas desprendidas naturalmente.



Fonte: do autor

4.3. Substância química

O acetilcarvacrol (5-isopropil-2-metilfenil acetato, CAS 6380-28-5), um monoterpene aromático de fórmula molecular $C_{12}H_{16}O_2$, foi obtido a partir do processo de acetilação do carvacrol (obtido da empresa Sigma-Aldrich, com 99,00% de pureza) nas dependências do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para isso, 5,00 mL de carvacrol foram adicionados a um frasco contendo 25,00 mL de solução de hidróxido de sódio a 10,00% em temperatura ambiente. Posteriormente, 5,50 mL de anidrido acético foram adicionados ao frasco sob refrigeração. A mistura foi levada à agitação por 15 minutos. O óleo obtido foi separado da solução e classificado de acordo com seu ponto de fusão e por espectroscopia de infravermelho (SOLOMONS et al., 2016).

4.4. Susceptibilidade de *R. sanguineus* s.l. ao acetilcarvacrol

4.4.1. Determinação das concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀)

Os testes para a determinação das concentrações letais do acetilcarvacrol em *R. sanguineus* s.l. foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Roma et al. (2009). A fim de determinar o intervalo de mortalidade dos carrapatos, foram estabelecidos 11 grupos experimentais: dois Grupos Controle, no qual as fêmeas foram expostas à água destilada (C1) e apenas ao solvente (DMSO a 3,00% em água destilada - C2); e nove Grupos de Tratamento (T1-T9), nos quais os animais foram submetidos às concentrações de 0,625, 1,00, 1,25; 2,00; 2,50; 4,00; 5,00; 6,50 e 10,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de acetilcarvacrol diluído em DMSO 3,00%, com base em dados prévios obtidos em experimento-piloto. Para cada grupo experimental foram utilizadas 10 fêmeas em jejum, que seria o carrapato fêmea adulto, após a ecdise e não alimentado.

Antes do início dos testes, os carrapatos foram lavados em água corrente em uma peneira, secos em papel absorvente macio e pesados em balança analítica. O protocolo de imersão seguiu os procedimentos propostos por Drummond et al. (1973). Cada grupo de fêmeas (C1, C2 e T1-T9) foi imerso nas substâncias a serem testadas durante 5 minutos em um béquer de vidro de 20,00 mL. Em seguida, os carrapatos foram secos em papel absorvente, e colocados em placas de Petri identificadas em temperatura ambiente, sendo observados diariamente, sempre no mesmo período no turno matutino, próximo 10h00min, durante 7 dias interruptos. Este período de tempo foi sugerido por Oliveira et al. (2008) em estudos com fêmeas de *R. sanguineus* s.l. submetidas ao fipronil, ao considerar que a maioria

dos efeitos dos acaricidas não são imediatos. Fêmeas que não apresentaram algum movimento após estimulação com pinça ou CO₂ foram consideradas mortas.

Após a detecção do intervalo de mortalidade, o acetilcarvacrol foi novamente diluído em solvente e testado em uma nova série de diluições, dentro do intervalo de mortalidade previamente determinado. Os mesmos procedimentos previamente relatados foram realizados, e os carrapatos foram mantidos em temperatura ambiente, também durante 7 dias. Para cada concentração, foram utilizadas 10 fêmeas em jejum. Os resultados de mortalidade foram submetidos à análise Probit, por meio do software Statistica (v.7.0), a fim de se calcular as concentrações letais para 50,00 e 90,00% dos indivíduos (CL₅₀ e CL₉₀), bem como seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95,00%.

4.4.2. Avaliação da ação do acetilcarvacrol em concentrações subletais

a) Delineamento experimental

Foram estabelecidos nove grupos experimentais: dois Grupos Controle (C1 e C2), nos quais os carrapatos foram expostos, respectivamente, à água destilada e ao solvente (DMSO 3,00%); e sete Grupos de Tratamento (T1-T7), nos quais os carrapatos foram expostos às concentrações subletais de 1,40; 2,10; 2,80; 3,50; 5,00; 6,50 e 8,00 µL/mL de acetilcarvacrol diluído em DMSO 3,00%. Foram utilizadas, no total, 112 fêmeas completamente ingurgitadas.

Os carrapatos foram lavados em uma peneira em água corrente e, logo depois, secos em papel absorvente macio. O protocolo experimental foi baseado no teste de imersão de adultos proposto por Drummond et al. (1973). Em cada grupo (C1, C2, T1-T7), as fêmeas foram imersas nas substâncias a serem testadas durante 5 minutos. Em seguida, foram novamente secas em papel absorvente, e colocadas individualmente em placas de Petri identificadas em temperatura ambiente.

b) Avaliação dos parâmetros reprodutivos de *R. sanguineus* s.l.

A avaliação dos efeitos subletais do acetilcarvacrol foi realizada por meio da análise do desempenho reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l., após o teste de imersão segundo o protocolo de Drummond et al. (1973). Foram considerados e analisados os seguintes parâmetros: a) peso das fêmeas ingurgitadas (PF), realizado imediatamente após se destacarem dos hospedeiros; b) peso total da massa de ovos de cada

fêmea (PM), tendo sido os ovos coletados diariamente até a morte do carrapato; c) período de pré-oviposição (PPO), que corresponde ao número de dias contados desde o momento em que os carrapatos se destacam do hospedeiro até o início da oviposição; d) período de incubação (PI), período de tempo contado a partir da oviposição até o início da eclosão das larvas (incubação); e) taxa de eclosão (TE), ou porcentagem de eclosão, determinada visualmente por meio da estimativa da proporção de larvas em relação à proporção de ovos em que não ocorreu eclosão.

A partir destes valores, foi determinado, para cada fêmea, o índice de produção de ovos (IPO), de acordo com Lage et al. (2013) e Matos et al. (2014). Este valor corresponde à proporção de ovos produzidos por cada fêmea em relação ao seu peso, em porcentagem:

$$IPO = \frac{PM}{PF} \times 100$$

A partir do índice de produção de ovos (IPO) e da taxa de eclosão (TE), foi determinada a taxa de fecundidade (TF) de cada fêmea, de acordo com a fórmula a seguir (CASTRO-JANER et al., 2009). Estes dados correspondem à relação entre a proporção de ovos produzidos e sua eclodibilidade:

$$TF = \frac{IPO \times TE}{100}$$

Para cada indivíduo, foi definida a taxa de reprodução estimada (REind), segundo Lage et al. (2013) e Matos et al. (2014), que estima o número de larvas contido em um grama de ovos. Este parâmetro também foi determinado para cada grupo (RE):

$$REind = \frac{PM}{PF} \times TE \times 20000$$

$$RE = \frac{PM \text{ médio}}{PF \text{ médio}} \times TE \text{ média} \times 20000$$

Além disso, para cada grupo, foram determinadas as porcentagens de redução da oviposição (%Rovip) e de redução da eclosão (%Reclo) em relação aos grupos controle, conforme adaptado de Lopes et al. (2013) e Prado-Ochôa et al. (2013):

$$\%R_{\text{OVIPOSIÇÃO}} = \frac{IPO_{\text{CONTROLE}} - IPO_{\text{TRATAMENTO}}}{IPO_{\text{CONTROLE}}} \times 100$$

$$\%R_{\text{ECLOSÃO}} = \frac{TE_{\text{CONTROLE}} - TE_{\text{TRATAMENTO}}}{TE_{\text{CONTROLE}}} \times 100$$

A porcentagem de controle ou eficácia do produto (EP) foi determinada a partir dos valores das taxas de reprodução estimada do grupo controle (RE_{CONTROLE}) e de cada grupo de tratamento ($RE_{\text{TRATAMENTO}}$) de acordo com a equação a seguir (DRUMMOND et al., 1973):

$$EP = \frac{(RE_{\text{CONTROLE}} - RE_{\text{TRATAMENTO}})}{RE_{\text{CONTROLE}}} \times 100$$

A análise estatística foi realizada em software GraphPad Prism (v.5.03). A normalidade foi verificada para os valores obtidos por meio do teste de Shapiro-Wilk. Todos os valores obtidos foram analisados estatisticamente por meio de teste de Kruskal-Wallis, e a comparação das médias foi realizada mediante utilização do teste de Dunns ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

O peso das fêmeas *R. sanguineus* s.l. em jejum, bem como o número de indivíduos utilizados e a porcentagem de mortalidade para cada diluição utilizada na determinação das concentrações letais do acetilcarvacrol diluído em DMSO 3,00% (Bioensaios I e II) foram listados nas Tabelas 1 e 2. A concentração letal média (CL₅₀) do produto foi de 2,83 µL/mL (IC 95%: 2,75-2,91 µL/mL), enquanto a concentração letal para 90% dos indivíduos (CL₉₀) foi de 6,36 µL/mL (IC 95%: 6,20-6,52 µL/mL) (Gráfico 1).

Tabela 1. Pesos das fêmeas em jejum, número de indivíduos utilizados (n), mortalidade e % de carrapatos *R. sanguineus* s.l., submetidos ao primeiro bioensaio do teste de imersão de adultos para determinação da concentração letal do acetilcarvacrol diluído em DMSO a 3,00%.

Grupo	Peso das fêmeas*	n	% de Mortalidade
C2 (DMSO 3,00%)	3,20 ± 0,92 ^a	10	0
T1 (0,625 µL/mL)	2,90 ± 0,57 ^a	10	0
T2 (1,00 µL/mL)	2,20 ± 0,79 ^a	10	0
T3 (1,25µL/mL)	3,00 ± 0,47 ^a	10	40
T4 (2,00 µL/mL)	2,60 ± 0,70 ^a	10	80
T5 (2,50 µL/mL)	2,60 ± 0,52 ^a	10	40
T6 (4,00 µL/mL)	2,40 ± 0,52 ^a	10	80
T7 (5,00 µL/mL)	2,90 ± 0,57 ^a	10	40
T8 (6,50 µL/mL)	2,20 ± 0,42 ^a	10	70
T9 (10,0 µL/mL)	3,10 ± 0,57 ^a	10	100

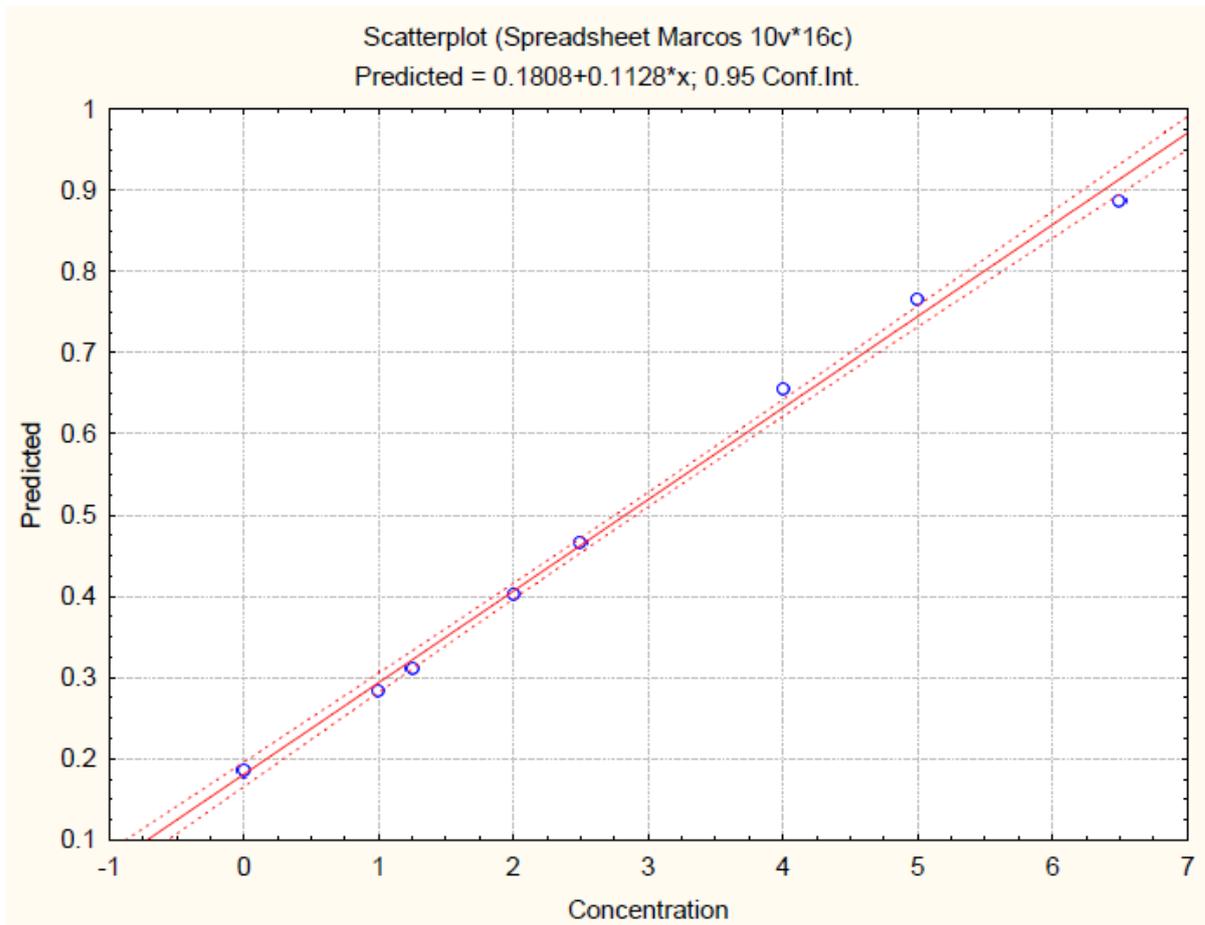
*Não houve diferença significativa

Tabela 2. Pesos das fêmeas em jejum, número de indivíduos utilizados (n), mortalidade e % de carrapatos *R. sanguineus* s.l. submetidos ao segundo bioensaio teste de imersão de adultos para determinação da concentração letal do acetilcarvacrol diluído em DMSO a 3%.

Grupo	Peso das fêmeas*	n	% de Mortalidade
C2 (DMSO 3,00%)	2,60 ± 0,70 ^a	10	0
T1 (1,00 µL/mL)	2,50 ± 0,71 ^a	10	10
T2 (1,25µL/mL)	2,20 ± 0,92 ^a	10	50
T3 (2,00 µL/mL)	2,10 ± 0,57 ^a	10	70
T4 (2,50 µL/mL)	2,00 ± 0,47 ^a	10	70
T5 (4,00 µL/mL)	1,90 ± 0,57 ^a	10	60
T6 (5,00 µL/mL)	2,40 ± 0,70 ^a	10	100
T7 (6,50 µL/mL)	2,10 ± 0,74 ^a	10	90

*Não houve diferença significativa

Gráfico1: Resultado da análise Probit, demonstrando a previsão de mortalidade (Predicted) de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. em jejum após exposição a diferentes concentrações acetilcarvacrol, diluído em DMSO 3,00% (Concentration). As linhas tracejadas representam os intervalos de confiança (IC) de 95%.



A Tabela 3 traz os valores de média e desvio padrão dos pesos das fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. ingurgitadas naturalmente, utilizadas na avaliação dos parâmetros reprodutivos após exposição ao acetilcarvacrol, bem como as médias e desvio padrão do peso das massas de ovos para cada grupo. Os indivíduos submetidos aos tratamentos T1 (1,4 µL/mL) e T5 (5,0 µL/mL) demonstraram os menores e maiores valores, respectivamente, tanto para a média do peso das fêmeas (g) como para a média do peso da massa de ovos (g).

Tabela 3. Média \pm desvio padrão (g) dos pesos das fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. ingurgitadas naturalmente (PF) e da massa de ovos (PM), após tratamento com acetilcarvacrol em diferentes concentrações subletais.

	C1	C2	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	(H2O)	(DMSO 3,00%)	(1,40 μL/mL)	(2,10 μL/mL)	(2,80 μL/mL)	(3,50 μL/mL)	(5,00 μL/mL)	(6,50 μL/mL)	(8,00 μL/mL)
Média do peso das fêmeas g	0,257 \pm 0,040a,c	0,243 \pm 0,083a,b	0,127 \pm 0,048b	0,279 \pm 0,041a	0,267 \pm 0,056a	0,193 \pm 0,049b,c	0,313 \pm 0,088a	0,215 \pm 0,044a,b	0,181 \pm 0,051b,c
Média do peso da massa de ovos g	0,157 \pm 0,055a,c	0,147 \pm 0,056a,c	0,051 \pm 0,031b	0,153 \pm 0,041a	0,152 \pm 0,046a	0,093 \pm 0,038b,c	0,160 \pm 0,104a	0,091 \pm 0,055a,b	0,060 \pm 0,050b

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si. A normalidade foi verificada por meio de teste de Shapiro-Wilk e os dados comparados por ANOVA ou Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

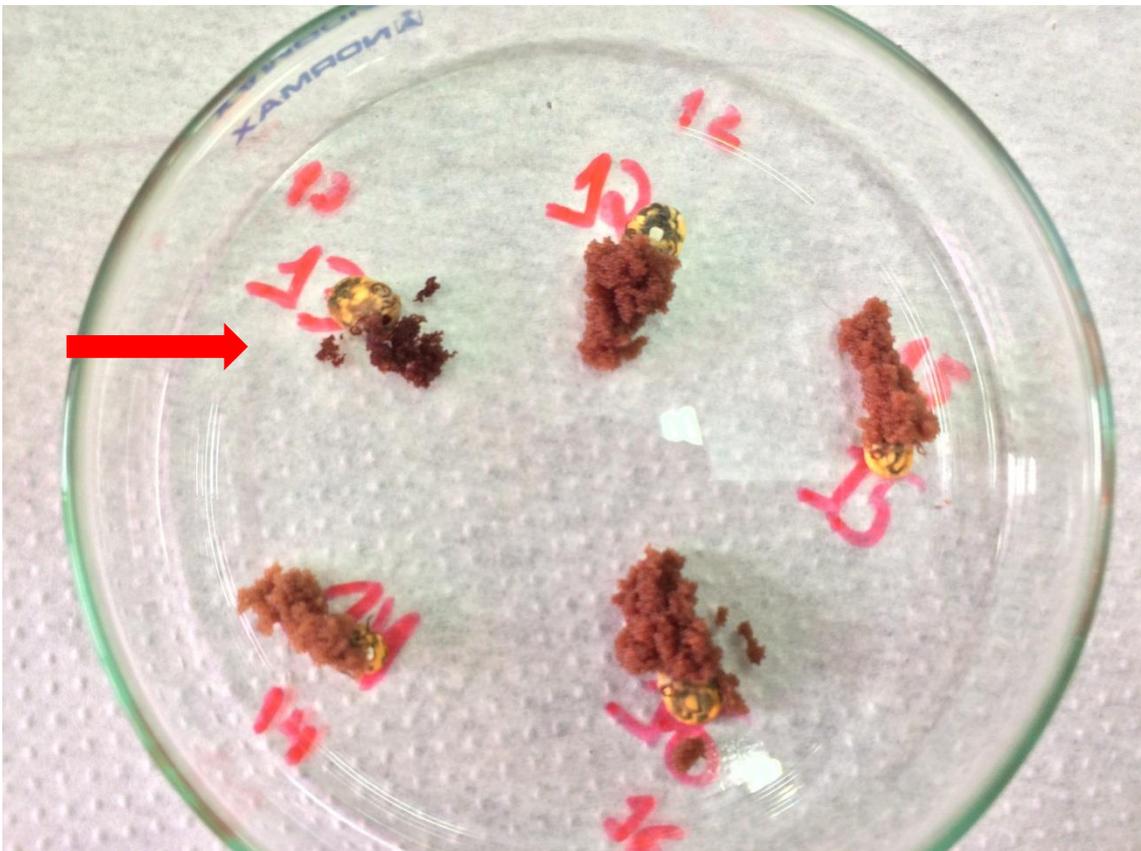
A Figura 4 permite a observação de que, mesmo sendo liberadas concomitantemente na câmara alimentadora, as fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. atingem diferentes tamanhos e ingerem quantidades diferentes de sangue, até seu desprendimento natural do hospedeiro.

Figura 4: Parte interna da câmara alimentadora em coelho New Zeland White, contendo machos e fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l.. As setas vermelhas indicam fêmeas ingurgitadas e desprendidas naturalmente.



Após o tratamento com acetilcarvacrol, o experimento foi monitorado diariamente até o fim do processo de postura. Na figura 5, é possível diferenças na coloração dos ovos, com coloração nitidamente mais escura em alguns grupos de tratamento.

Figura 5: Fêmeas de *R. sanguineus* s.l em processo de postura de ovos. A seta vermelha indica a massa de ovos escurecida da fêmea numero 13, do tratamento T3.



Na Tabela 4 estão listados os valores referentes às médias \pm desvio padrão do índice de produção de ovos (IPO), da taxa de eclosão (TE) e da taxa de fecundidade (TF). Com relação ao IPO, os grupos controles C1 e C2 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p > 0,05$). Também não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle e os tratamentos T2, T3, T4, T5 e T6 ($p > 0,05$). Os grupos T1 e T7 apresentaram IPO menor que grupos C1, C2, T2 e T3 ($p < 0,05$).

Os grupos C1 e C2 não apresentaram diferenças entre si em relação à TE ($p > 0,05$), mas diferiram de T5, T6 e T7, que mostraram TE reduzida. Os valores médios da TE nos tratamentos T1, T2 e T3 também foram estatisticamente diferentes quando comparados com o grupo T7 ($p < 0,05$). Entre os tratamentos T4, T5, T6 e T7 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

A TF não diferiu entre os grupos controles C1 e C2 ($p > 0,05$). Entretanto, o grupo C1 divergiu dos tratamentos T6 e T7, que apresentaram TF reduzida. Além disso, o grupo C2 demonstrou TF mais elevada, quando comparado a T4, T5, T6 e T7 ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre o tratamento T1 e os demais grupos ($p > 0,05$). A TF em T2 foi

significativamente mais elevada que em T7 ($p < 0,05$), enquanto os tratamentos T6 e T7 exibiram TF menor que T3 ($p < 0,05$).

Tabela 4. Média \pm desvio padrão do índice de produção de ovos (%), taxa de eclosão (%) e taxa de fecundidade de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. submetidos ao teste de desempenho reprodutivo após tratamento com acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

TRATAMENTO	ÍNDICE DE PRODUÇÃO DE OVOS (IPO)	TAXA DE ECLOSÃO (TE)	TAXA DE FECUNDIDADE (TF)
C1 (H2O)	59,93 \pm 15,82 a,c	87,25 \pm 11,03 a	51,46 \pm 12,33 a,b
C2 (DMSO 3,00%)	60,28 \pm 5,24 a,c	85,38 \pm 10,11a	51,63 \pm 8,93 a
T1 (1,40 μL/mL)	37,25 \pm 12,88 d	73,75 \pm 11,89 a,b	28,58 \pm 12,97 a,b,c,d
T2 (2,10 μL/mL)	54,48 \pm 12,68 a,c	68,93 \pm 28,50 a,b	38,83 \pm 17,81 a,b,c
T3 (2,80 μL/mL)	57,25 \pm 13,60 c	64,69 \pm 31,75 a,b	39,29 \pm 21,09 a,b
T4 (3,50 μL/mL)	45,80 \pm 13,11 a,b,c,d	47,94 \pm 31,18 a,b,c	23,98 \pm 16,39 b,c,d
T5 (5,00 μL/mL)	47,64 \pm 21,00 a,b,c,d	49,58 \pm 19,12 b,c*	23,05 \pm 12,55 b,c,d
T6 (6,50 μL/mL)	40,36 \pm 22,20 a,b,c,d	22,91 \pm 36,03 b,c*	12,67 \pm 19,82 c,d*
T7 (8,00 μL/mL)	28,93 \pm 20,62 b,d*	14,60 \pm 23,08 c*	6,69 \pm 10,09 d*

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

*diferentes dos controles

Na Tabela 5 estão listados valores referentes às médias \pm desvio padrão do período de pré-oviposição (PPO), período de incubação (PI) e reprodução estimada (RE). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos controle quanto ao PPO ($p>0,05$). Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre o grupo C1 e os tratamentos T1, T4, T5, e T7, e entre o grupo C2 e os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, e T7 respectivamente ($p>0,05$). Também não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos T2 e T3 quando confrontados com T6 ($p>0,05$). Entretanto, o PPO no grupo C1 foi menor que em T2, T3 e T6 ($p<0,05$). Os grupos C2, T1, T4, T5 e T7 mostraram diferença estatística significativa quando comparados com o T6, apresentando um PPO reduzido ($p<0,05$).

Quanto ao PI, os grupos controles C1 e C2 não diferiram entre si ($p>0,05$). Também não houve diferença no PI entre o grupo C1 e todos os tratamentos ($p>0,05$). O PI no grupo C2 também não diferiu dos tratamentos T1, T2, T4, T5, T6 e T7, apresentando diferença estatisticamente significativa apenas quando comparado ao grupo T3 ($p<0,05$). Também não foi observada diferença entre o tratamento de maior concentração (T7) e todos os outros tratamentos ($p>0,05$). As diferenças no PI ocorreram apenas entre os tratamentos T1 e T2, T2 e T5, T2 e T6, T3 e T5, T3 e T6, e T4 e T5 ($p<0,05$).

A taxa de reprodução estimada individual (RE) não diferiu entre os grupos C1 e C2 ($p>0,05$). O grupo C1 também não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparado com os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 ($p>0,05$), embora tenha mostrado RE maior que os tratamentos T6 e T7 ($p<0,05$). O grupo C2 não apresentou diferença na RE quando comparado com os tratamentos T1, T2 e T3 ($p>0,05$), embora tenha apresentado RE mais elevada em relação aos tratamentos T4, T5, T6 e T7 ($p<0,05$). Não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre o grupo T1 e todos os outros tratamentos ($p>0,05$). A RE em T2 foi estatisticamente maior que T7, da mesma forma que o tratamento T3 apresentou valores elevados quando comparado aos grupos T6 e T7 ($p<0,05$).

Tabela 5. Média \pm desvio padrão do período de pré-oviposição (dias), período de incubação (dias) e taxa de reprodução estimada de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. submetidos ao teste de desempenho reprodutivo após tratamento com acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

TRATAMENTO	PERÍODO DE PRÉ- OVIPOSIÇÃO (PPO) dias	PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI) dias	TAXA DE REPRODUÇÃO ESTIMADA (RE) indivíduos
C1 (H₂O)	1,75 \pm 0,71 a,d	37,25 \pm 0,71 a,b,c,d	1029238,28 \pm 246585,12 a,b
C2 (DMSO 3,00%)	3,25 \pm 1,04 a,b,d	37,38 \pm 1,92 a,c,d	1032676,40,78 \pm 178659,82 a
T1 (1,40 μL/mL)	2,42 \pm 1,31 a,b	37,58 \pm 1,73 a,c,d	571565,88 \pm 259462,12 a,b,c,d
T2 (2,10 μL/mL)	4,14 \pm 1,10 b,c	33,77 \pm 2,39 a,b	776647,65 \pm 356221,94 a,b,c
T3 (2,80 μL/mL)	3,81 \pm 0,75 b,c	32,29 \pm 0,91 b	785867,00 \pm 421725,30 a,b
T4 (3,50 μL/mL)	3,00 \pm 1,22 a,b,d	34,69 \pm 3,57 a,b,d	479556,32 \pm 327746,21 b,c,d
T5 (5,00 μL/mL)	3,42 \pm 1,38 a,b,d	39,75 \pm 1,86 c	460913,15 \pm 250930,22 b,c,d
T6 (6,50 μL/mL)	6,64 \pm 1,43 c*	39,50 \pm 2,74 c,d	253310,73 \pm 396373,31 c,d*
T7 (8,00 μL/mL)	3,90 \pm 2,51 b,d	37,40 \pm 2,30 a,b,c,d	133861,12 \pm 201714,89 d*

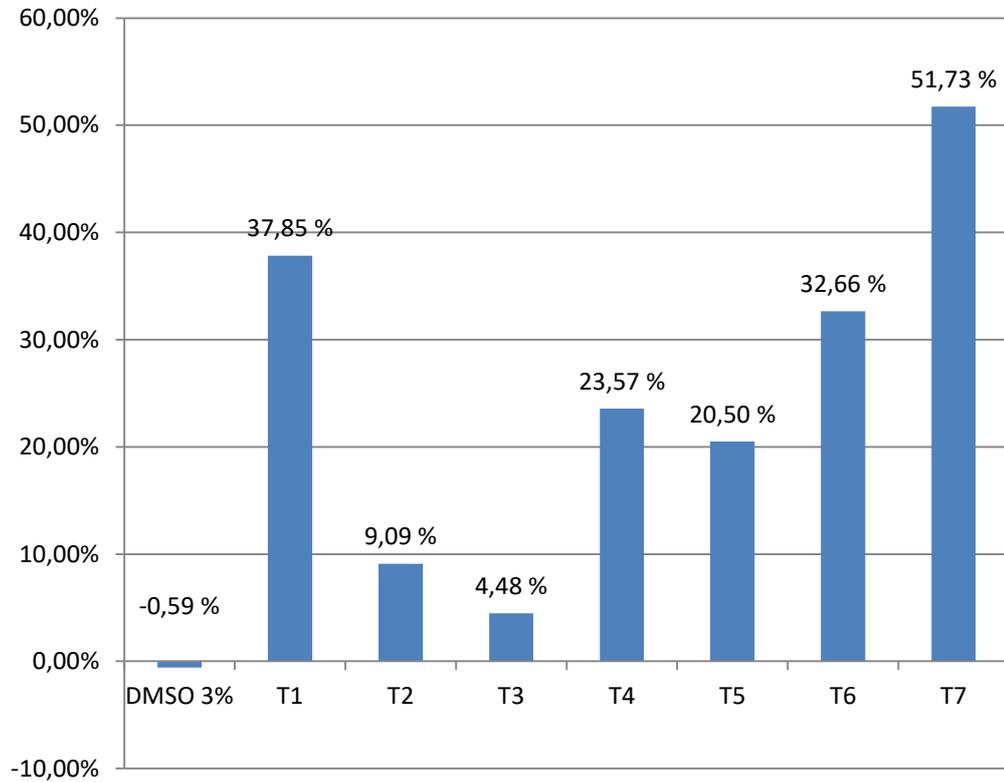
Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

*diferentes dos controles

A porcentagem de redução da oviposição (%Rovip) não demonstrou relação dose-dependente nos diferentes tratamentos (Gráfico 2). O grupo C2 (DMSO 3,00%) apresentou %Rovip de -0,59% quando comparado a C1. Os maiores valores de %Rovip foram observados nos grupos T1 (37,85%) e T7 (51,73%). Nos outros grupos (T2, T3, T4, T5 e T6), a redução da oviposição foi de 9,09%, 4,48%, 23,57%, 20,50%, e 32,66%, respectivamente.

Gráfico 2. Porcentagem da redução da oviposição (%Rovip), com base no IPO de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. expostas ao acetilcarvacrol em diferentes concentrações subletais. **Legendas:** C2 (DMSO 3,00%); T1 (1,40 µL/mL); T2 (2,10 µL/mL); T3 (2,80 µL/mL); T4 (3,50 µL/mL); T5 (5,00 µL/mL); T6 (6,00 µL/mL); e T7 (8,00 µL/mL).

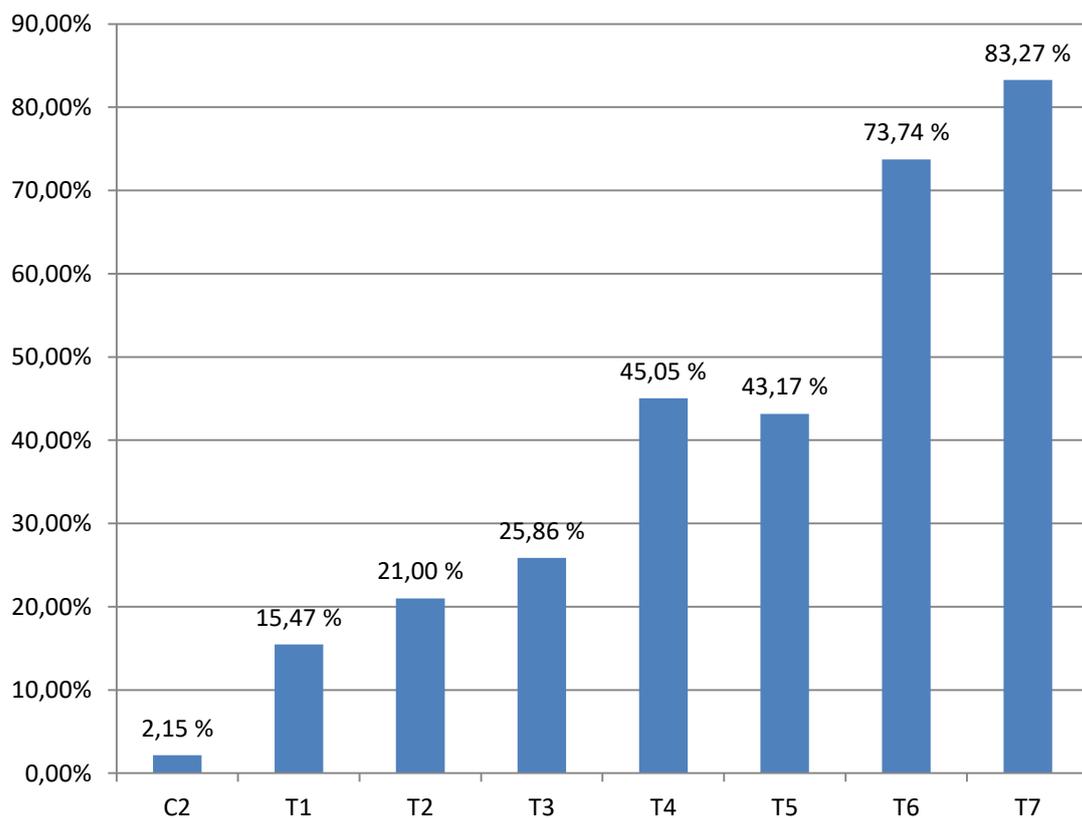
Redução da Oviposição



Exceto pelo grupo T5, em que foi observado pequeno decréscimo na porcentagem de redução da eclosão (%Reclo), os tratamentos apresentaram maior redução na eclosão conforme se elevou a concentração de acetilcarvacrol (Gráfico 3). O grupo C2 mostrou redução de 2,15% em relação ao controle, enquanto os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 exibiram, respectivamente, reduções de 15,47%, 21,00%, 25,86%, 45,05%, 43,17%, 73,74%, e 83,27%.

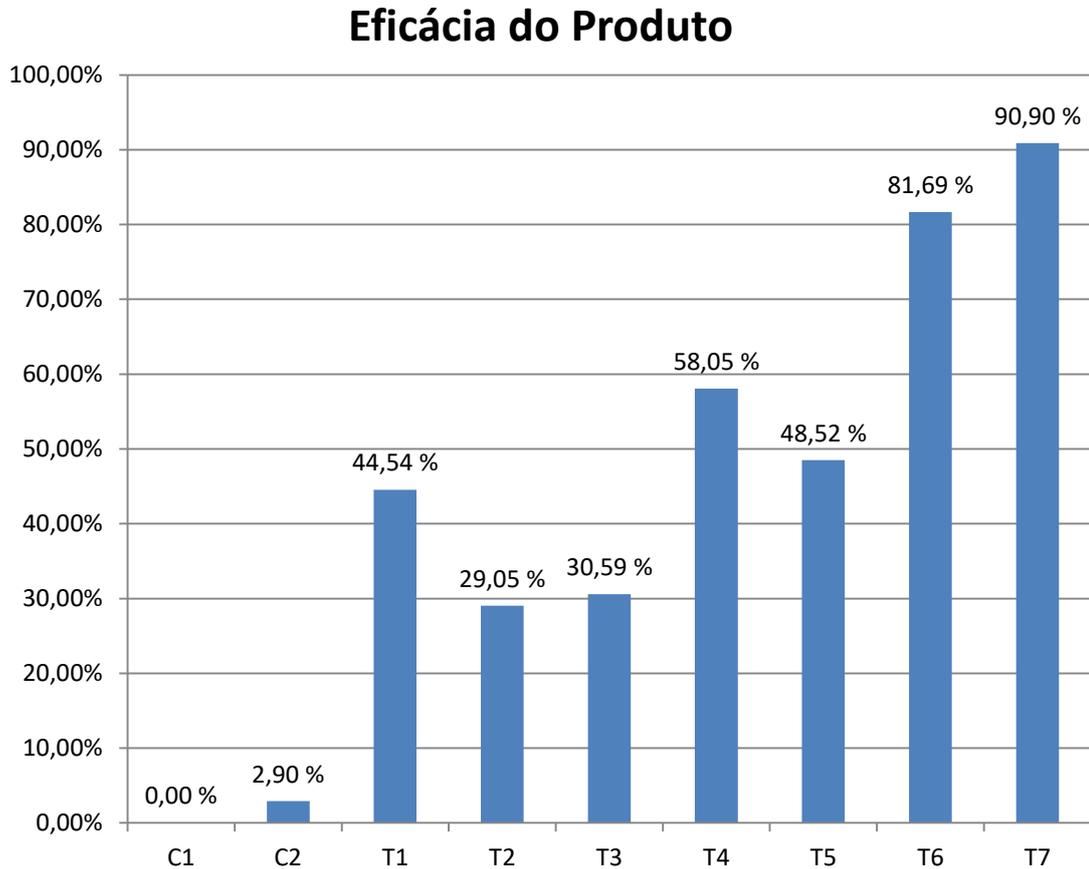
Gráfico 3. Porcentagem da redução da eclosão (%Reclo) das larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. expostas ao acetilcarvacrol em diferentes concentrações subletais. **Legendas:** C2 (DMSO 3,00%); T1 (1,40 $\mu\text{L}/\text{mL}$); T2 (2,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$); T3 (2,80 $\mu\text{L}/\text{mL}$); T4 (3,50 $\mu\text{L}/\text{mL}$); T5 (5,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$); T6 (6,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$); e T7 (8,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Redução da Eclosão



A partir dos resultados obtidos no teste de desempenho reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l., a porcentagem de controle ou eficácia do produto (EP) obtida foi de 2,90 % para o grupo C2 (DMSO 3%), e de 44,54 %, 29,05 %, 30,59 %, 58,05 %, 48,52 %, 81,69 % e 90,90 % tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7, nesta ordem (Gráfico 4).

Gráfico 4. Eficácia do produto (EP) nos diferentes grupos, em comparação ao grupo controle (C1). **Legendas:** C2 (DMSO 3,00%); T1 (1,40 µL/mL); T2 (2,10 µL/mL); T3 (2,80 µL/mL); T4 (3,50 µL/mL); T5 (5,00 µL/mL); T6 (6,00 µL/mL); e T7 (8,00 µL/mL).



6. DISCUSSÃO

Em todo o mundo, por várias décadas, diversos produtos sintéticos de diferentes classes, como piretróides, carbamatos e organofosforados, foram desenvolvidos e utilizados como tentativa para o controle de carrapatos. No entanto, a seleção de gerações resistentes foi inevitável, estando também associada ao alto impacto ambiental devido à contaminação generalizada e bioacumulação (RECK et al., 2014; HIGA et al., 2016; BANDARA; KANUARATNE, 2017).

Por este motivo, a busca por produtos de origem vegetal com ação acaricida e menor toxicidade ao ambiente, aos hospedeiros vertebrados e ao homem tem sido intensificada. Assim, o uso de extratos e óleos vegetais surgiu como uma possibilidade positiva, sendo capaz de controlar populações de carrapatos de forma eficaz (ALVES et al., 2012; BORGES et al. 2011; MATOS et al. 2014). Contudo, variações nas concentrações dos diferentes componentes químicos das plantas podem ocorrer em virtude do método de extração, idade, localização geográfica, natureza do solo e características do clima (KOC et al., 2013). Isso torna o uso de princípios ativos puros mais vantajosos para a obtenção de resultados padronizados. Neste contexto, o carvacrol, produto de origem natural encontrado em uma grande variedade de plantas (PANELLA et al., 2005; DIETRICH et al., 2006; ANDERSON, COATS, 2012; CETIN et al., 2010; LAGE et al., 2013). O processo de acetilação do carvacrol (SOLOMONS et al., 2016), por sua vez, permite a obtenção de um composto com maior eficácia e estabilidade superior, facilmente biodegradável e com toxicidade reduzida em mamíferos (NIKUMBH et al., 2003; DAMASCENO et al; ANDRE et al., 2016; ANDRE et al., 2017)

Cruz et al. (2013), ao avaliar os efeitos do carvacrol, diluído em DMSO 3,00%, sobre fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, obteve uma concentração letal média (CL₅₀) de 4,56 µL/mL (4,46 mg/mL). Pereira Júnior et al. (2019), no entanto, ao dissolver carvacrol em uma solução de etanol e água destilada (1:1), seguindo metodologia semelhante, obteve CL₅₀ de 20,58 µL/mL (20,11 mg/mL) também para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Desta forma, fica evidente que o tipo de solvente utilizado pode estar relacionado à quantidade de produto necessária para gerar mortalidade a uma determinada espécie, bem como aos seus possíveis efeitos subletais. Chagas et al. (2003) demonstraram mortalidade de 24,00% e 45,00% para fêmeas ingurgitadas e larvas em jejum de carrapatos *R. microplus* expostos à concentração de 25,00% de DMSO, respectivamente. Inversamente,

quando expostos ao etanol em concentrações iguais ou menores que 75,00%, nenhuma mortalidade foi observada tanto em fêmeas ingurgitadas e quanto larvas de *R. microplus* (CHAGAS et al., 2003).

No presente estudo, a CL_{50} do acetilcarvacrol diluído em DMSO 3,00% foi de 2,83 $\mu\text{L}/\text{mL}$, para fêmeas adultas em jejum de *R. sanguineus* s.l. A grande diferença observada, em comparação aos resultados obtidos por Cruz et al. (2013) e Pereira Júnior et al. (2019), deve-se, possivelmente, às características inerentes a cada espécie, somadas ao fato de que, em geral, diferentes sensibilidades aos acaricidas são observadas em estágios de vida e de alimentação distintos. Araújo et al. (2016), por exemplo, por meio de teste de pacote de larvas, determinou valores maiores de CL_{50} de carvacrol, diluído em etanol 70%, para *R. sanguineus* em comparação a *R. microplus*, demonstrando que larvas do carrapato-do-boi são mais susceptíveis ao composto do que as larvas do carrapato-marrom-do-cão. Isso poderia explicar as pequenas diferenças observadas entre o presente trabalho e os experimentos de Cruz et al. (2013), ambos utilizando o mesmo solvente, porém em indivíduos adultos. Somado a isso, tanto Cruz et al. (2013) quanto Pereira Júnior et al. (2019) utilizaram fêmeas completamente ingurgitadas, o que aumenta sua resistência em relação a ação do produto. Isso porque quanto maior a fêmea, maior a espessura da cutícula, dificultando a penetração dos compostos acaricidas (FURLONG et al., 2007).

Após diluição do carvacrol em etanol 70%, foi obtida CL_{50} de 3,36 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (3,29 mg/mL) para larvas de *R. sanguineus* (ARAÚJO et al., 2016). Quando comparada aos valores obtidos no presente estudo, pode-se notar que a acetilação do carvacrol foi responsável por aumentar sua atividade acaricida consideravelmente, visto que quantidades menores do produto foram necessárias para gerar mortalidade em adultos em jejum da mesma espécie. O valor é menor ou muito próximo mesmo quando comparado às concentrações letais médias do carvacrol, diluído em etanol 70%, em larvas de outras espécies, como *R. microplus* (1,80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 1,76 mg/mL) (ARAÚJO et al., 2016), *Amblyomma sculptum* (3,57 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 3,49 mg/mL) e *Dermacentor nitens* (3,41 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (3,33 mg/mL) (NOVATO et al., 2015). Tais diferenças, contudo, podem também estar relacionadas ao uso de solventes distintos nos diferentes experimentos realizados.

As concentrações letais do acetilcarvacrol também foram determinadas para carrapatos *R. microplus*, porém com resultado conflitante entre os estudos. Ramirez et al. (2016) demonstrou que o acetilcarvacrol apresenta poder de ação elevado quando comparado ao carvacrol. Em larvas, os valores obtidos para a CL_{50} , após diluição em tricloroetileno + azeite de oliva (2:1), foram de 59,72 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ e 5,01 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, respectivamente para carvacrol e

acetilcarvacrol, evidenciando o maior potencial acaricida do composto acetilado (RAMÍREZ et al., 2016). No entanto, Novato et al. (2018) obtiveram grandezas de 0,84 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (0,83 mg/mL) para carvacrol e 2,51 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (2,49 mg/mL) para acetilcarvacrol. Provavelmente, estas diferenças podem também estar relacionada ao uso de diferentes solventes.

Quando comparado a produtos sintéticos, como a permetrina, por exemplo (ROMA et al., 2009), o acetilcarvacrol se mostrou promissor. A CL_{50} definida por Roma et al. (2009) para carrapatos *R. sanguineus* semi-ingurgitados foi de 2,062 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (2062 ppm), muito próxima ao valor obtido no presente trabalho (2,83 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Entretanto, este valor ainda é elevado quando comparado a outros compostos sintéticos, como o fipronil ($CL_{50} = 0,0096 \mu\text{L}/\text{mL}$ ou 9,647 ppm) (OLIVEIRA et al., 2011) e selamectina ($CL_{50} = 0,4512 \mu\text{L}/\text{mL}$ ou 451,20 ppm) (ARAÚJO et al., 2012), respectivamente para fêmeas semi-ingurgitadas e ingurgitadas de *R. sanguineus*.

No presente estudo, a menor média de peso das fêmeas ingurgitadas foi observada no grupo T1, enquanto no grupo T5 uma média superior aos outros grupos foi visualizada. Além disso, foi possível constatar que os carrapatos que se fixaram primeiramente ao hospedeiro ingurgitaram mais, atingindo maiores valores de peso. Logo, os indivíduos que se fixaram mais tardiamente ingurgitaram menos e gastaram mais tempo para se desprenderem do hospedeiro. Esta variação pode ter ocorrido em virtude de a coleta dos animais ter sido feita de acordo com seu desprendimento natural dos hospedeiros experimentais. Segundo Dantas-Torres (2008), a duração do processo de ingestão de sangue em *R. sanguineus* tende a variar de acordo com fatores como o tipo de espécie hospedeira, umidade e temperatura. Assim, o tempo de ingurgitamento de *R. sanguineus* pode durar de alguns dias a várias semanas (TROUGHTON; LEVIN, 2007; DANTAS-TORRES, 2010).

Os ovos de carrapatos *R. sanguineus* são muito pequenos, esféricos e de cor castanha (DANTAS-TORRES, 2008). Durante a oviposição, os ovos, uma vez fora do trato genital, são capturados pelo aparelho bucal e pelo Órgão de Gené, que os cobre com uma cera composta de hidrocarbonetos de cadeia longa, ésteres, ácidos graxos e esteroides, conferindo a eles proteção e aderência (SCHOL et al., 2001). No presente estudo, os indivíduos expostos às maiores concentrações de acetilcarvacrol realizaram a postura de ovos escurecidos, que apresentaram taxas de eclosão reduzidas ou nulas. Isso pode estar relacionado à ausência da camada protetora de cera, que evita a desidratação dos ovos. Efeitos semelhantes também foram relatados por Booth et al. (1986), que observaram alterações morfológicas no órgão de Gené em carrapatos *R. microplus* tratados com precoceno, com consequente redução na taxa de eclosão. Em *Haemaphysalis longicornis* (KAKUDA et al., 1992), após prevenção da

eversão do órgão de Gené, observou-se considerável diminuição na taxa de eclosão das lavras (4,90%) em relação ao grupo controle (9,50%). Isso sugere que, de alguma forma, a absorção do acetilcarvacrol pode estar gerando prejuízos neste órgão em *R. sanguineus*, sendo capaz de diminuir a produção de cera ou até mesmo neutralizar esta produção.

Conforme foram elevadas as concentrações de acetilcarvacrol, foi possível notar uma tendência de redução da massa de ovos, proporcionalmente ao peso da fêmea, como pode ser observado a partir do índice de produção de ovos (IPO). Isso, contudo, não se aplica ao grupo T1, que apresentou IPO bastante reduzido e estatisticamente semelhante aos tratamentos de maior concentração. A redução na oviposição foi indiretamente observada por Sousa et al., (2019), que demonstrou alterações morfofisiológicas drásticas nos ovários de *R. sanguineus* s.l. semi-ingurgitados expostos ao carvacrol, incluindo ausência de estágios mais desenvolvidos de ovócitos.

Gomes et al. (2012), ao avaliar os efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides*, composto majoritariamente por timol e com concentração reduzida de carvacrol, detectaram IPO de 24.30% na concentração de 30,00 µL/mL em *R. microplus*. Lage et al. (2013), por sua vez, apuraram a atividade acaricida e eficácia de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia triplinervis*, rico em carvacrol, tendo observado redução no IPO de carrapatos *R. microplus*, à medida que a concentração do produto foi elevada (21,60% na concentração de 50,00 mg/mL). No presente estudo, os valores obtidos para o IPO em *R. microplus* expostos ao acetilcarvacrol foram muito próximos daqueles encontrados por Gomes et al. (2012) e Lage et al. (2013), mesmo em concentração menor (8,00 µL/mL). O mesmo ocorre quando estes valores são comparados àqueles obtidos por Pereira Júnior et al. (2019), que obteve IPO de 21,20% para *R. microplus* expostos à concentração de 20,58 µL/mL de carvacrol em etanol 50,00%. Esta redução na produção de ovos é provavelmente resultado da intensificação dos efeitos do carvacrol após acetilação, embora o tipo de solvente utilizado possa ter interferido nos valores finais.

No grupo T1, contudo, a redução no IPO ocorreu provavelmente devido ao menor tamanho das fêmeas ingurgitadas, em relação aos demais tratamentos. A coleta de carrapatos com diferentes massas pode estar relacionada ao maior tempo decorrido até o destacamento do hospedeiro (TROUGHTON; LEVIN, 2007), que se deve, provavelmente, à demora na fixação do carrapato. Como verificado por Remedio et al. (2014), a espessura da cutícula em *R. sanguineus* aumenta conforme ela se distende durante a alimentação. Assim, indivíduos ingurgitados tendem a apresentar cutícula mais espessa, o que dificulta a penetração de acaricidas (FURLONG et al., 2007). No presente trabalho, o menor tamanho das fêmeas

utilizadas no grupo T1 pode estar relacionado a uma menor espessura cuticular, o que pode ter possibilitado a ocorrência de efeitos mais evidentes em virtude de uma provável maior absorção do produto.

No presente trabalho, o aumento nas concentrações do produto também foi responsável por uma tendência à elevação da %Rovip, embora isso não tenha ocorrido de forma dose-dependente. As maiores taxas de redução da oviposição foram observadas nos grupos T1 e T7, que diferiram estatisticamente do controle em relação ao IPO. As %Rovip destes grupos também foram elevadas quando comparadas a trabalhos com metodologia similar. Em carrapatos *R. microplus*, por exemplo, a exposição à concentração de 16,46 µL/mL de carvacrol (80,00% da CL50) gerou redução de 50,70% na oviposição (PEREIRA JÚNIOR et al., 2019), valor muito similar aos 51,83% obtidos após exposição a apenas 8,00 µL/mL de acetilcarvacrol. O aumento dos efeitos do carvacrol após acetilação também foi demonstrado por Ramirez et al. (2016), que obtiveram 25,80% e 15,71% de redução na oviposição após exposição de *R. microplus* a 0,25 µL/mL de acetilcarvacrol e carvacrol, respectivamente. Vale ressaltar que, embora Ramirez et al. (2016) e Pereira Júnior et al. (2019) tenham baseado sua %Rovip nas massas de ovos, ao invés da IPO, ambos utilizaram fêmeas com massas homogêneas, diferentemente do presente estudo.

As taxas de eclosão foram reduzidas de forma dose-dependente, após exposição ao acetilcarvacrol, conforme análise estatística, chegando a 14,60% na concentração de 8,00 µL/mL. Pereira Júnior et al. (2019), contudo, não observaram diferenças nas taxas de eclosão de *R. microplus* entre os grupos tratados com diferentes concentrações carvacrol e o grupo controle. O mesmo ocorreu em carrapatos *R. sanguineus* tratados com timol, isômero do carvacrol (MONTEIRO, et al., 2009). No entanto, taxas de eclosão reduzidas foram detectadas após tratamento de *R. microplus* com óleos essenciais de *L. sidoides* (47,00% na concentração de 30,00 µL/mL) (GOMES et al., 2012) e *L. triplinervis* (6,20% na concentração de 50,00 mg/mL) (LAGE et al., 2013), que contêm carvacrol em sua composição. Ainda assim, o tratamento com acetilcarvacrol foi capaz de afetar de forma mais eficiente a eclosão em concentrações menores, em comparação aos trabalhos de Gomes et al. (2012) e Lage et al. (2013). No grupo tratado com 8,00 µL/mL de acetilcarvacrol, por exemplo, foi observada porcentagem de redução da eclosão (%Reclo) de 83,27%. Este valor é significativamente elevado se comparado com a redução de apenas 1,90% em *R. microplus* tratados com carvacrol na concentração de 20,58 µL/mL (PEREIRA JÚNIOR et al., 2019).

Foi observada atividade estatisticamente dose-dependente quanto à taxa de fecundidade (TF), que relaciona o índice de produção de ovos e a taxa de eclosão. Desta

forma, quanto maior a concentração, menor a TF. Neste parâmetro, os tratamentos T6 e T7 (6,00 µL/mL e 8,00 µL/mL, respectivamente) diferiram de ambos os grupos controle. O grupo T1 (1,40 µL/mL), mesmo apresentando IPO reduzido em relação aos grupos controle, não apresentou diferenças na TF, devido à sua elevada taxa de eclosão. Redução dose-dependente da TF também foi relatada em carrapatos *R. microplus* expostos ao carvacrol (PEREIRA JÚNIOR et al., 2019). No entanto, a TF obtida por Pereira Júnior et al. (2019) para a maior concentração (100,00% da CL₅₀ ou 20,58 µL/mL) em *R. microplus* foi semelhante ao tratamento com 3,50 µL/mL de acetilcarvacrol, indicando maior influência do composto acetilado sobre a reprodução de carrapatos. Tal disparidade pode, contudo, ser oriunda de diferenças inerentes à fisiologia de cada espécie.

Pereira Júnior et al. (2019) relataram aumento significativo no período de pré-oviposição (PPO) e de incubação (PI) em *R. microplus* expostos ao carvacrol, sugerindo que este retardamento na postura de ovos possa ter influenciado a taxa de fecundidade (TF), por meio da redução no peso da massa de ovos. Já a exposição ao timol, em diferentes concentrações, não gerou nenhum tipo de alteração no tempo para a oviposição de *R. sanguineus* (MONTEIRO et al., 2009). Considerando-se que o PPO de *R. sanguineus* expostos ao acetilcarvacrol no grupo T6 foi maior que em T7, mas que não existem diferenças estatísticas na taxa de fecundidade (TF) e na taxa de reprodução estimada (RE) entre estes dois grupos, pode-se afirmar que um maior tempo para o início da postura de ovos possivelmente não interfere na eficácia do produto. Da mesma forma, as pequenas variações observadas no período de incubação (PI) entre alguns grupos de tratamento provavelmente não foram responsáveis por afetar os valores de TF e RE. A irregularidade nos valores de PPO e PI entre os diferentes grupos pode estar relacionada às variações de temperatura e umidade nas condições ambientais. Isso porque, mesmo em condições laboratoriais controladas, o PPO pode variar de 8 a 23 dias e o PI de 28 a 35 dias para *R. sanguineus* (TROUGHTON e LEVIN, 2007).

A eficácia do produto (EP) apresentou resultados expressivos embora sem efeito dose-dependente, com variações em duas observações, os tratamentos T1 e T5. O tratamento T1 (1,4 µL/mL) alcançou maior eficácia (44,54%) que os tratamentos T2 (29,05%) e T3 (30,59%). Mesmo assim, não foram detectadas diferenças estatísticas entre taxa de reprodução estimada (RE) do grupo T1, em comparação aos outros grupos, ou seja, não se pode afirmar que a origem de novos indivíduos tenha sido afetada pela exposição ao acetilcarvacrol neste tratamento. A EP se baseia em valores médios de RE e, por isso, pode expor de forma mais nítida pequenas diferenças existentes entre os grupos, mostrando

variações nem sempre presentes na análise estatística. O mesmo vale para o grupo T5 (48,52%) em relação a T4 (58,05%). A RE é estatisticamente igual para ambos, mas a eficácia se reduz em T5. Por isso, sugere-se que a EP seja sempre avaliada juntamente com a análise estatística da RE, o que geralmente não é feito na literatura.

Na concentração de 8,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (0,80%) foi atingida eficácia de 90,90%, devido aos valores reduzidos de IPO e TE. Este valor é reconhecidamente elevado, quando comparado a outros trabalhos que testaram isoladamente carvacrol (PEREIRA JÚNIOR et al., 2019), acetilcarvacrol (RAMIREZ et al., 2016) e óleos essenciais contendo carvacrol em sua composição (GOMES et al., 2012; LAGE et al., 2013). A exposição de *R. microplus* a 20,58 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol diluído em etanol 50% foi responsável por eficácia de 61,1%, enquanto o tratamento desta mesma espécie com óleos essenciais de *L. sidoides* (30,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (GOMES et al., 2012) e *L. triplinervis* (50 mg/mL) (LAGE et al., 2013), resultou em eficácia de 72,00% e 98,00%, respectivamente. Nota-se, desta maneira, que valores de concentração reduzidos de acetilcarvacrol geraram porcentagem de controle muito superior ao carvacrol e ao óleo essencial de *L. sidoides*, enquanto quantidades elevadas de *L. triplinervis* foram necessárias para a obtenção de eficácia acima de 90,00%. O aumento da eficácia após acetilação já havia sido, inclusive, demonstrado por Ramirez et al.. (2016), que obtiveram 26,33% de controle de *R. microplus* expostos ao acetilcarvacrol (250 ppm), em comparação aos 16,73% de eficácia do carvacrol, na mesma concentração.

7. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram a atividade acaricida do acetilcarvacrol em carrapatos *R. sanguineus* s.l.. Nas concentrações subletais testadas, o produto mostrou uma eficácia elevada, mesmo em concentrações reduzidas, quando comparado com seu composto de origem, o carvacrol. Na concentração mais elevada, reduziu significativamente o índice de produção de ovos, a taxa de eclosão, a taxa de fecundidade e, taxa de reprodução estimada (RE). Estes efeitos demonstram sua ação sobre o ciclo biológico desta espécie de várias formas. Assim, pode ser considerado capaz de alterar a quantidade de indivíduos da prole seguinte, gerando um efetivo controle reprodutivo a longo prazo. Contudo, experimentos *in vivo* e *in situ* são necessários para oferecer informações a respeito dos efeitos que esta substância pode provocar em fêmeas de *R. sanguineus* s.l. em um ambiente natural.

8. REFERÊNCIAS

ANDRE, W. P. et al. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology, Brazil**, n. 218, p. 52-58, jan. 2016.

ANDRADE, V. A. et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Montes Claros, Brazil, v. 34, n. 12, p. :1153-1161, dez. 2014.

ANDRE, W.P.P. at al., Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Veterinary Parasitology, Brazil**, 26, 323–330, jun. 2017.

ANDREOTTI, R. et al. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, Campo Grande, Brazil, v. 197, p. 341–345, abr. 2013.

AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, India, n. 30, p. 41-50, set. 2010.

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

ANTHONY, K. P. et al. C: Food Chemistry Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Food Science**, USA, v. 77, n. 8, p. 839-843, abr. 2012.

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**, Juiz de Fora, MG, Brazil, v. 30, p. 377–382, mai. 2016.

BALASHOV, YU. S.. **Ixodid ticks as parasites and vectors of infections**. Russian: Nauka, St. Petersburg, 1998.

BANDARA K, KARUNARATNE S. Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in Sri Lanka. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 139:68–72. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.

BANETH, G. et al. Transmission of *Hepatozoon canis* to Dogs by Naturally-Fed or Percutaneously-Injected *Rhipicephalus sanguineus* Ticks. **Journal of Parasitology**, Israel, v. 87, n. 3, p. 606-611, jun. 2001.

BARKER, S. C.; MURRELL, A.. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, Queensland, Australia, v. 129, p. S15–S36, nov. 2004.

BASER, K. HUSNU C. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. **Current Pharmaceutical Design**, Turkey, v. 14, n. 29, p. 3106-3120, out. 2008.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J.; FERREIRA, B.R.; GARCIA, M.V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.4, n.2, p.61-66, 1995.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeitos de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** n.6, p.21–27, 1997.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases. **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2545–2560, 2016.

BOOTH, T. F. et al. The Effects Of Precocene Treatment On Egg Wax Production In Gene's Organ And Egg Viability In The Cattle Tick *Boophilus Microplus* (Acarina Ixodidae): An Ultrastructural Study. **Experimental & Applied Acarology**, London, Great Britain, v. 2, p. 187--198, jan. 1986.

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

BROWN, S. J. Characterization of Tick Antigens Inducing Host Immune Resistance. II. Description of Rabbit Acquired Immunity to *Amblyomma americanum* Ticks and Identification of Potential Tick Antigens by Western Blot Analysis. **Veterinary Parasitology**, Los Angeles, U.S.A., n. 28, p. 245-259, jan. 1988.

BRUMPT, E. Longevité du virus de la fièvre boutonneuse (*Rickettsia conorii*, n. sp.) chez la tique *Rhipicephalus sanguineus*. **C. R. Soc. Biol.** v. 110, p. 1197–1199, 1932.

CAMICAS, J. L. et al. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (Acarida, Ixodida). **Les tiques du Monde, Paris**, v. 1, n. 1, abr. 1998.

CAMPOS, R. N. S. et al. Acaricidal properties of vetiver essential oil from *Chrysopogon zizanioides* (Poaceae) against the tick species *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, São Cristóvão, Brazil, n. 212, p. 324–330, ago. 2015.

CASTRO-JANER, E. et al. *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 120-128, 2009.

CETIN, H.; YANIKOGLU, A. A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey. **BIO One**, Turkey, v. 31, n. 1, p. 118-122, jan. 2006.

CHAGAS, A. C. S. et al. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus* (Boophilus) *Microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Rio de Janeiro, Brazil, v. 110, p. 295–303, jan. 2012.

COSKUN, S. et al. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitol**, Turkey, n. 103, p. 259-261, abr. 2008.

CRUZ, E. M. O. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. **Veterinary Parasitology**, São Cristóvão, Brazil, v. 195, p. 198– 202, jan. 2013.

DAEMON, E. et al. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Juiz de Fora, Brazil, v. 105, p. 495–497, mar. 2009.

DAMASCENO, S. et al. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, Brazil, v. 94, n. 1, p. 58-66, jan. 2014.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Science Direct**, Pernambuco, Brazil, n. 152, p. 173–185, abr. 2008.

DANTAS-TORRES, F. et al. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & Vectors**, Brasil, n. 6, p. 1-17, jun. 2013.

DEMMA, L. J. et al. Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. **The new england journal of medicine**, Massachusetts, USA, v. 6, n. 353, ago. 2005.

DRUMMOND, R.O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

ESCOBARI, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of *Colombian Lippia* spp essential oils and their major components. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Colombia, v. 105, n. 2, p. 184-190, fev. 2010.

FACCINI, J.L.H. et al. Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as experimental hosts for *Amblyomma dubitatum* Neumann (Acari: Ixodidae). **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.58, n.6, p.1236-1239, 2006.

FERNÁNDEZ-SALAS, A. et al. In vitro acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, , Veracruz, Mexico, n. 175, p. 113–118, jan. 2011.

FLAMINI, G. Acaricides of natural origin, personal experiences and review of literature (1990- 2001). **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 28, p. 381-451, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics > databases**. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 28 fev. 2018.

FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; JR., I. S. F.. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **ACTA Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 2, p. 109-117, fev. 2004.

FURLONG, J. et al. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?. **A Hora Veterinária**, Juiz de Fora, BRASIL, v. 27, n. 159, p. 1-7, set. 2007.

FURTADO, F. N. et al. Avaliação in vitro do potencial acaricida do óleo essencial de *Tagetes minuta* frente à *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Biociências**, v. 19, p. 104-110, 2013.

GARCIA, M. V. et al. Colonization and lesions on engorged female *Rhipicephalus sanguineus*, caused by *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1513-1518, set. 2004.

GAZIM, Z. C. et al. Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari; Ixodidae). **Experimental Parasitology**, Maringá, Brazil, v. 129, p. 175–178, jul. 2011.

GODARA, R. et al. Acaricidal activity of extract of *Artemisia absinthium* against *Rhipicephalus sanguineus* of dogs. **Parasitol Res**, Berlin, Germany, n. 113, p. 747–754, jan. 2014.

GOMES, A. et al. Suscetibilidade de *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1447-1452, ago. 2011.

GOMES, G. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, MG, Brazil, v. 111, n. 6, p. 2423–2430, dez. 2012.

GROVES, M.G. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks *Rhipicephalus sanguineus*. **Am. J. Vet. Res.** 36, 937–940, 1975.

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

GUGLIELMONE, A. A. et al. Redescription of the male and description of the female of *Ixodes abrocomae* Lahille, 1916 (Acari: Ixodidae). **Syst Parasitol**, Nunoa, Chile, v. 77, p. 153–160, mai. 2010.

HARRISON, B.A.; ENGBER, B.R.; APPERSON, C.S. Ticks (Acari: Ixodidae) uncommonly found biting humans in North Carolina. **J. Vector. Ecol.**, v.22, p.6-12, 1997.

HIGA L. et al. Evaluation of *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Braz. J. Vet. Parasitol** 25(2):163-171, (2016).

IBGE. **Biblioteca.** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=equinos&searchphrase=all>>. Acesso em: 28 fev. 2018.

JONJEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S3-S14, 2004

JUNIOR, O. A. C.; MURAD, J. C. B. Animais de Grande Porte II. **Recursos Naturais**, Brasília, p. 1-28, jun. 2016.

KAKUDA, H. et al. Functional morphology of GenO's organ in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Experimental & Applied Acarology**, Fukuoka, Japan, n. 16, p. 263-275, set. 1992.

MATSUMOTO, K. et al. Experimental Infection Models of Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* Group with *Rickettsia conorii*. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, [S.L], v. 5, n. 4, p. 363–372, nov. 2005.

KHODADAD, P.; MEHDI, R. Biological activities of chamomile (*Matricaria chamomile*) flowers' extract against the survival and egg laying of the cattle fever tick (Acari Ixodidae). **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, Shahrekord, Iran, v. 8, n. 9, p. 693-696, jul. 2007.

KLAFKE, G. et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2017.

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**, Antalya, Turkey, v. 193, p. 316– 319, jan. 2013.

KOCH CL: Systematische Uebersicht über die Ordnung der Zecken. Arch Naturgesch 1844, 10: 238

KOCH, H. G. Oviposition of the Brown Dog Tick (Acari: Ixodidae) in the Laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 75, n. 5, p. 583–586, set 1982.

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. 1, n. 100, p. 1-9, mar. 2019.

KOSHY, T.J. et al. On the life cycle of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Indian Council of Agricultural Research. Cheiron**, v. 12, p. 337–338, 1983.

KOVAR, L. et al. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of *T. lymphocytes* in human PBMC culture. **J. Parasitol**, České Budějovice, Czech Republic, v. 87, p. 1342–1348, jan. 2001.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633–640, 2004.

LABUDA, M.; NUTTALL, P. A.. Tick-borne viruses. **Parasitology**, Bratislava, v. 129, p. 221-245, jan. 2004.

LAGE, T.C.A. et al. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 863-869, 2013.

LAI, W. et al. Inhibition of *Herpes simplex* Virus Type 1 by Thymol-Related Monoterpenoids. **Planta Med**, n. 78, p. 1636-1638, jul. 2012.

LATREILLE P.A. Genera crustaceorum et insectorum: secundum ordinem naturalem in familias disposita, iconibus exemplisque plurimis explicata. Parisiis et Argentorati: Amand Koenig, **bibliopolam**; 1809.

LOPES, W.D.Z. et al. Effects of macrocyclic lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 72-78, 2013.

MATOS, R.S. et al. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, v. 113, p. 669-673, 2014.

MEJRI, N. et al. Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. **Parasite Immunol**, Neuchâtel, Switzerland, v. 23, p. 61–69, jan. 2001.

MGHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. **Veterinary Parasitology**, Tunis, Tunisia, v. 152, n. 2, p. 1-7, mar. 2008.

MONTEIRO, C. M. O. et al. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Juiz de Fora, Brazil, v. 105, p. 1093–1097, jun. 2009.

MONZOTE, L. et al. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Havana City, Cuba, v. 240, p. 337–347, nov. 2009.

MORAES, J. D. et al. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitol**, Brazil, n. 112, p. 603-610, out. 2012.

MORAES-FILHO, J. et al. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Plos One**, Cruz Alta, Brazil, v. 1, n. 1, p. 1-16, set. 2015.

NAVA, S. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, Argentina, n. 190, p. 547–555, jun. 2012.

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806). **Veterinary parasitology**, Argentina, v.00, n. 208, p. 2-8, jun. 2015.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderstepoort J Vet Res**, v.38, p.215-224, 1971.

NIKUMBH, V. P. et al. Eco-friendly pest management using monoterpenoids – III: antibacterial efficacy of carvacrol derivatives. **Journal of Scientific & Industrial Research**, Maharashtra, v. 62, p. 1086-1089, set. 2003.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 13 ed. São Paulo: Atheneu, 2016. 588 p.

NORDGREN, R.M., CRAIG, T.M. Experimental transmission of the texas strain of *Hepatozoon canis*. **Vet. Parasitol.** v. 16, p. 207–214, 1984.

NOVATO, T. P. L. et al. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, Juiz de Fora, MG, Brazil, v. 212, p. 331–335, mai. 2015.

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**, Brazil, n. 260, p. 1-4, jul. 2018.

NUNES, P. H. et al. Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Acari: Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation. **Experimental and Applied Acarology**, Sao Paulo, Brazil, n. 45, p. 199–209, mai. 2008.

OLIVEIRA, P. R. et al. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.129, n. 1-2, p. 139-147, 2005.

OLIVEIRA, P.R. et al. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2459–2465, 2008.

OLIVER, J. H. **Ticks reproduction**: Sperm development and cytogenetics. 1 ed. Obenchain, F.D. & Galun: Oxford, 1982. 275 p.

PALMAS, C. et al. Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. **Parassitologia**, Cagliari, Itália, v. 43, p. 29–35, 2001.

PAPPAS, P. J.; OLIVER, ; JR., J. H. Mating necessary for complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (acari: ixodidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, Georgia, USA, v. 6, n. 2, p. 122-124, jun. 1971.

PARKER, R.R. et al. Rocky Mountain spotted fever: potentialities of tick transmission in relation to geographical occurrence in the United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 13, p. 341–379, 1933.

PAZ, G. F. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) De Cães Artificialmente Infestados. **Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 139-144, fev. 2008.

PAZINATO, R. et al. In vitro effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Advanced Research**, Chapeco, Brazil, v. 7, p. 1029–1034, abr. 2016.

PEGRAM, R.G. et al. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **Systematic Parasitology**. Uxbridge, England, v. 10, p. 27–44, aug 1987.

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**, Lavras, brasil, v. 1, p. 1-4, fev. 2019.

PRETTE, N. et al. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 855-861, ago. 2005.

PUB CHEM. Carvacryl acetate. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvacryl_acetate#section=top. Acesso em: 10 abr. 2018.

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**, México, n. 1, p. 72-77, mar. 2016.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Marseille, France, v. 10, n. 4, p. 694–719, out. 1997.

REGENDANZ, P., MUNIZ, J. O *Rhipicephalus sanguineus* como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 81–84, 1936.

REMEDIO, R. N. et al. The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. **Acta Zoologica**, Rio Claro, Brazil, v. 1, p. 1-9, abr. 2014.

REY, L. **Parasitologia**: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 351 p.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, Porto Alegre, Brazil, v. 115, p. 351–354, fev. 2008.

ROMA, G.C. et al. Determination of LC₅₀ of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae), **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 269-272, 2009.

ROSADO-AGUILAR, J. et al. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Yucatan, Mexico, v. 168, p. 299–303, jan. 2010.

SANCHES, G. S. et al. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Brasil, n. 215, p. 78–87, jan. 2016.

SCHOL, H. et al. Morphology and structural organization of Gene's organ in *Argas walkerae*. **Medical and Veterinary Entomology**, Munich, Germany, n. 15, p. 422-432, abr. 2001.

SENRA, T. O. S. et al. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Juiz de Fora, Brasil, n. 112, p. 3471–3476, jun. 2013.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. **Molecules**, Netherlands, n. 15, p. 7532-7546, out. 2010.

SOLOMONS, T. W. et al. **Organic chemistry**. 12 ed. NJ: Hoboken, 2016.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2 ed. UK: Oxford, p. 540, 2014.

SOUZA, J. R. L. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, Rio Claro, SP, Brazil, n. 116, p. 66–72, jan. 2019.

SZABO, M. P. J.; BECHARA, G. H.. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Experimental and Applied Acarology**, Jaboticabal, Brasil, v. 23, p. 915–928, jul. 1999.

SZABÓ, M.P.J. et al. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari, Ixodidae) in South America. **Vet. Parasitol.** Jaboticabal, SP, Brazil v. 130, p. 131–140, march 2005.

TROUGHTON, D. R.; LEVIN, M. L.. Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. **Journal Of Medical Entomology**, Atlanta, USA, v. 44, n. 5, p. 732-740, abr. 2007.

TSABOULA, A. et al. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. **Environment International**, v. 91, p. 78–93, 2016.

VAIRAMUTHU, S. et al. A six year (2006–2011) retrospective study of hemoprotozoan parasites affecting dogs in Chennai, Tamil Nadu, India. **J Parasit Dis**, India, n. 38, p. 193–195, dez. 2012.

VERONEZ, V. A. et al. Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. **Experimental and Applied Acarology**, Jaboticabal, Brazil, v. 50, n. 2, p. 151–161, jan. 2010.