



AMILCAR MACHADO PEREIRA JÚNIOR

**ATIVIDADE ACARICIDA DO MONOTERPENO CARVACROL SOBRE
FÊMEAS ADULTAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
(ACARI: IXODIDAE)**

**LAVRAS – MG
2017**

AMILCAR MACHADO PEREIRA JÚNIOR

**ATIVIDADE ACARICIDA DO MONOTERPENO CARVACROL SOBRE FÊMEAS
ADULTAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

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

Dra. Ana Paula Peconick

Orientadora

Dr. Rafael Neodini Remedio

Coorientador

LAVRAS – MG

2017

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

Pereira Júnior, Amilcar Machado.

Atividade acaricida do monoterpene carvacrol sobre fêmeas adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) / Amilcar Machado Pereira Júnior. - 2017.
55 p. : il.

Orientador(a): Ana Paula Peconick.

Coorientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Fitoterapia. 2. CL50. 3. Carrapatos. I. Peconick, Ana Paula .
II. Remedio, Rafael Neodini. III. Título.

AMILCAR MACHADO PEREIRA JÚNIOR

ATIVIDADE ACARICIDA DO MONOTERPENO CARVACROL SOBRE FÊMEAS

ADULTAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)

**ACARICIDAL ACTIVITY OF MONOTERPENE CARVACROL ON *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
(ACARI:IXODIDAE) ADULT FEMALES**

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

APROVADA em 31 de julho de 2017

Dr. Rafael Neodini Remedio (coorientador) – UFLA

Dr. Antônio Marcos Guimarães – UFLA

Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães Rocha - UFLA

Dra. Ana Paula Peconick
Orientadora

LAVRAS – MG

2017

Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível.
(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita bondade e misericórdia, por prover tudo para que essa etapa se concluísse.

Aos meus pais Amilcar e Zilda, pelo apoio incondicional, pelo eterno amor, e também pelo exemplo de dedicação. Orgulho-me de vocês!

À minha querida irmã pelo companheirismo e amizade de toda a vida.

Aos meus avós Amilcar e Laura, Darcy e José (in memoriam) por todo o suporte, ensinamentos, carinho, e, principalmente pelo exemplo de humildade e simplicidade.

À Renata, minha querida namorada, por todo o zelo e pela presença que ilumina meu caminho. Obrigado por mesmo na distância estar ao meu lado, 7P!

À Maria Alice, José Geraldo, Flávio e Tina por me acolherem de braços abertos.

Ao grande amigo Januzzi, pelas incontáveis vezes que me ajudou no decorrer do mestrado e pelo exemplo de gratuidade.

Aos eternos amigos Tales, Bruno, P.A., Wesley, Danton, André e Bryan que compartilharam comigo momentos únicos na “casa da D. Diléia”. Levarei para sempre as “agonias” e as alegrias que passamos juntos.

Aos admiráveis orientadores, Ana Paula e Rafael, que invariavelmente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, e despretensiosamente se tornaram exemplos de liderança e cordialidade para mim. Agradecimento especial por terem confiado este trabalho a mim e considerarem que seria possível a sua conclusão a distância.

Aos grandes e valiosos amigos que Lavras me trouxe.

À Prefeitura Municipal de Doverlândia, em especial à prefeita, que me permitiu conciliar a gestão da secretaria de saúde com o término do mestrado. A todos os companheiros de trabalho pela árdua, mas gratificante, batalha enfrentada diariamente.

À CAPES e CNPq pela bolsa de estudo. À Universidade Federal de Lavras (UFLA) por fornecer a oportunidade e os recursos para minha formação. Aos professores, funcionários e técnicos administrativos do DMV e PPGCV que sempre foram fundamentais para a rotina

acadêmica. À Maria Carolina que por vezes forneceu carrapatos para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles, que de alguma forma me ajudaram e foram importantes no meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O desenvolvimento de resistência de cepas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas sintéticos é crescente. A infestação dos rebanhos por esse carrapato é um problema no Brasil e em países de clima temperado. Este artrópode causa enormes perdas econômicas à pecuária em virtude de seu hábito alimentar que debilita a saúde e transmite doenças aos seus hospedeiros. Os fitoterápicos e, em especial o carvacrol, têm se revelado uma alternativa no controle desse carrapato, uma vez que apresentam efeitos acaricidas e repelentes, além de configurarem método parcialmente seguro, pela rápida degradação e baixa contaminação do ambiente, do consumidor de produtos de origem animal e do hospedeiro. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a eficácia do carvacrol sobre fêmeas adultas de *R. microplus* por meio da avaliação da mortalidade e de parâmetros reprodutivos. Foram realizados bioensaios para determinação da CL₅₀ e avaliação dos parâmetros reprodutivos das fêmeas, ambos a partir do Teste de Imersão de Adultos (TIA). Para determinação da CL₅₀ onze grupos (n = 360) foram separados em concentrações que variaram de 0,099 a 1,304% e dois grupos serviram de controle negativo, um a base de água destilada (100%) e outro de álcool etílico 50% (v/v). Para avaliação dos parâmetros reprodutivos, as fêmeas foram submetidas ao TIA em tratamentos contendo 20% (n = 10), 40% (n = 10), 60% (n = 13), 80% (n = 16) e 100% da CL₅₀ (n = 20), e em tratamentos controle de água destilada (100%) (n = 10) e outro de álcool etílico 50% (v/v) (n = 10). Os grupos foram mantidos a 27±1 °C e umidade >80±10 %. O peso da massa de ovos, o índice de produção de ovos, o período de pré-oviposição e a taxa de fecundidade dos grupos 80% e 100% da CL₅₀ apresentaram diferença estatística (p<0,05) comparados aos grupos controle. A CL₅₀ encontrada foi de 20,11 mg/mL e a eficácia de controle desta concentração foi de 61,10% quando comparada ao controle de água destilada. Sendo assim, os resultados demonstram que o carvacrol possui atividade acaricida sobre *R. microplus*.

Palavras-chave: Fitoterapia. CL₅₀. Carrapatos. Óleo essencial. Bovinos.

ABSTRACT

Resistant strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to synthetic acaricides is increasing. Herd's infestation by this tick is a problem in Brazil and in temperate countries. These arthropods cause huge economic losses to livestock due to their feeding habits that weaken the health and transmit diseases to their hosts. The phytotherapies, and especially carvacrol, have been shown to be an alternative in the control of this tick, since they have acaricidal and repellent effects, besides setting up a partially safe method, due to the rapid degradation and low contamination of the environment, the consumer of animal products and the host. Therefore, the objective of the present study was to determine the efficacy of carvacrol on adult *R. microplus* females by evaluating mortality and reproductive parameters. Bioassays were performed to determine the LC₅₀ and to evaluate the reproductive parameters of the females, both from the Adult Immersion Test (AIT). For the determination of the LC₅₀, eleven groups (n = 360) were separated in concentrations ranging from 0.099 to 1.304% and two groups served as negative control, one distilled water (100%) and the other 50% (v/v). To evaluate the reproductive parameters, the females were submitted to AIT in treatments containing 20% (n = 10), 40% (n = 10), 60% (n = 13), 80% (N n = 20) and 100% of LC₅₀ (n = 20), and in control treatments of distilled water (100%) (n = 10) and ethyl alcohol 50% (v/v) (n = 10). The groups were maintained at 27 ± 1 ° C and humidity > 80 ± 10%. Egg weight, egg production index, pre-oviposition period and fecundity rate of the 80% and 100% LC₅₀ groups presented a statistical difference (p<0.05) in the control groups. The LC₅₀ found was 20.11 mg / mL and the control efficacy of this concentration was 64.67% compared to the ethyl alcohol control 50% (v/v). Thus, the results demonstrate that carvacrol has a significant acaricidal potential, and can contribute as another alternative in the control of *R. microplus*.

Keywords: Phytotherapy. LC₅₀. Ticks. Essential Oil. Cattle.

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Tabela 1 - Peso médio das fêmeas (mg), número de indivíduos (n) e número de mortos dos grupos do bioensaio 1.....	25
Tabela 2 - Peso médio das fêmeas antes da oviposição (mg), número de indivíduos (n) e número de mortos de cada grupo no bioensaio 2.....	26
Tabela 3 - Médias de peso das fêmeas antes da oviposição (mg), peso da massa de ovos (mg), porcentagem de eclosão (%) e índice de produção de ovos em fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de carvacrol diluído em solução hidroetanólica 50% (v/v) em condições de laboratório (27 ± 1 °C e umidade $>80\pm10$ %)......	27
Tabela 4 - Período pré-oviposição (dias), período de incubação (dias) e taxa de fecundidade (%) em fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de carvacrol diluído em solução hidroetanólica 50% (v/v) em condições de laboratório (27 ± 1 °C e umidade $>80\pm10$ %)......	28

LISTA DE GRÁFICOS

SEGUNDA PARTE

Gráfico 1 – Resultado da CL_{50} . Curva da dose/resposta das concentrações de carvacrol diluídas em solução hidroetanólica 50% (v/v) do bioensaio 1.....	24
Gráfico 2 – Taxa de redução de oviposição e eclosão de larvas dos diferentes grupos.....	29
Gráfico 3 – Eficiência dos diferentes grupos (CII, TI, TII, TIII, TIV e TV) em comparação ao grupo controle (CI).....	29

LISTA DE QUADROS

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1 - Resumo dos dados de mortalidade e concentrações letais e subletais de diferentes soluções contendo carvacrol, seus análogos ou óleos essenciais dos quais é constituinte.....8

SEGUNDA PARTE

Quadro 1 - Resumo dos dados de mortalidade e concentrações letais e subletais de diferentes soluções contendo carvacrol, seus análogos ou óleos essenciais dos quais é constituinte.....31

LISTA DE SIGLAS

PIB	Produto Interno Bruto
AChE	Acetil-Colinesterase
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
CO ₂	Gás Carbônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
CL ₉₀	Concentração Letal 90%
TIA	Teste de Imersão de Adulto
IPO	Índice de Produção de Ovos
PF	Peso da Fêmea
PM	Peso da Massa de Ovos
PPO	Período de Pré-Oviposição
PI	Período de Incubação
TE	Taxa de Eclosão
TF	Taxa de Fecundidade
RE	Reprodução Estimada
°GL	°Gay Lussac

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	1
REFERÊNCIAL TEÓRICO DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : DESAFIOS E MÉTODOS DE CONTROLE.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Bovinocultura Nacional.....	3
2.2 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.3 Medidas de controle de <i>Rhipicephalus microplus</i>	6
2.4 Fitoterapia no controle de carrapatos.....	7
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	10
4 REFERÊNCIAS.....	12
 SEGUNDA PARTE.....	16
ARTIGO.....	16
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO.	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÕES.....	34
AGRADECIMENTOS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

PRIMEIRA PARTE

REFERENCIAL TEÓRICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: DESAFIOS E MÉTODOS DE
CONTROLE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Carrapatos da família Ixodidae são ectoparasitas hematófagos do filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari, subordem Metastigmata. No Brasil dentre as espécies de ixodídeos de maior importância destacam-se *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Dermacentor nitens* (BARKER; MURRELL, 2004). *R. microplus*, também conhecido como carrapato-do-boi, é o ectoparasito mais disseminado no mundo parasitando principalmente bovinos (JONSSON, 2006). Esta espécie de carrapato está amplamente distribuída pelo mundo, afetando aproximadamente 1,4 bilhões de cabeças de bovinos em todo o mundo (FAO, 2011).

Infestações por *R. microplus* são um problema para a pecuária de países de clima tropical e subtropical, como o Brasil, por conta dos prejuízos econômicos que acarreta como perda de peso, alta conversão alimentar, depreciação na qualidade do couro, gastos com compra de carrapaticidas e contratação de mão de obra para aplicação (GRISI et al., 2014). Além destes, traz prejuízos indiretos como, transmissão de hematozoários e contaminação de ambiente e produtos de origem animal pelo uso indiscriminado de carrapaticidas (GUERRERO et al., 2014).

O controle de carrapatos tem se baseado principalmente na utilização de carrapaticidas sintéticos que levam à seleção de populações resistentes (RECK et al., 2014). Este tipo de tratamento tem revelado ineficácia e alto custo em virtude da necessidade do aumento da dose e/ou da frequência de aplicação além da corriqueira associação de duas ou mais bases (FURLONG et al., 2007). Muitos acaricidas sintéticos apresentam propriedades não-específicas, provocando danos em organismos não-alvo, redução populacional a longo prazo, além de bioacumulação na cadeia alimentar (FURTADO et al., 2013).

A busca por produtos alternativos aos convencionais tem evoluído. A utilização de fitoterápicos vem se destacado, e o Brasil, por possuir grande variabilidade de espécies de plantas, pode ser beneficiado por esta vasta oferta. Os extratos de plantas e/ou seus princípios ativos isolados podem sobressair-se aos compostos sintéticos por apresentar menor custo, alta disponibilidade, fácil manejo, rápida degradação, além de baixa contaminação do ambiente, homem e animais (FLAMINI, 2003; BORGES et al., 2011).

Através do metabolismo as plantas sintetizam e armazenam substâncias que podem ter ação acaricida. Os efeitos destas substâncias sobre os artrópodes podem variar entre

repelência, redução da alimentação e da fertilidade, alteração do comportamento e até a morte (BELL et al., 1990).

O monoterpeno carvacrol ou extratos de plantas dos quais é componente majoritário tem sido alvo de diversas pesquisas (CONCEPCIÓN et al., 2013; LAGE et al., 2013; SENRA et al., 2013a; ARAÚJO et al., 2016; COSTA-JÚNIOR et al., 2016). O carvacrol vem revelando importantes efeitos sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, atuando na diminuição da eficiência reprodutiva (SENRA, et al., 2013b; LAGE et al., 2013, CRUZ et al., 2013).

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do carvacrol sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* através da determinação da CL₅₀ deste monoterpeno e dos resultados reprodutivos e da determinação de sua eficácia em concentrações subletais a partir de parâmetros reprodutivos previamente estabelecidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bovinocultura Nacional

De acordo com dados de CEPEA (2016), o agronegócio tem papel relevante no contexto econômico nacional sendo um dos setores que sustentam a economia do país contribuindo para a balança comercial favorável. Em 2013 respondeu por 22,5% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. Dentro do agronegócio como um todo, no mesmo ano, a agropecuária representou 29,0% do PIB, enquanto que, dentro deste extrato a pecuária foi responsável por 43,4% do PIB.

O Brasil é detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo. Em 2014 atingiu a quantidade de 212,3 milhões de cabeças (BRASIL, 2015). Em 2015 exportou aproximadamente 1.400 mil toneladas de carne bovina, o que correspondeu a aproximadamente 6 bilhões de dólares (ABIEC, 2016). No mesmo período as exportações de produtos lácteos geraram faturamento de aproximadamente 380 milhões de dólares (MDIC, 2016).

A produção pecuária de corte desenvolve-se predominantemente no sistema de criação extensiva (MENDES, 2008). Entretanto, questões ambientais como desmatamento e preservação de mananciais de água, econômicas, como rentabilidade do processo de criação, e

de manejo, como controle da sanidade animal, estão levando a uma mudança no panorama da pecuária de corte (GARCIA; PEIXOTO, 2011).

A produção pecuária leiteira, que outrora era demasiadamente extensiva, está caminhando de sistemas menos produtivos para sistemas de produção em que os animais sejam mais produtivos (VILELA et al., 2017). Em 2014, a produtividade média das vacas de leite no Brasil foi de 1,525 litros/vaca, correspondendo a um crescimento de 2,2% em relação à 2013 (MILKPOINT, 2015). A produção brasileira de leite vem crescendo a cada ano que passa. Em 2014, ultrapassou 35 bilhões de litros, o que consolidou o Brasil como quinto maior produtor mundial, atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (IBGE, 2015; USDA, 2015).

A crescente demanda dos mercados consumidores por alimentos de maior qualidade nutricional e sanitária vem servindo de estímulo para prevenção e imediata intervenção em caso de surtos de doenças animais (BRASHEARS; CHAVES, 2017).

2.2 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

Originário da Ásia, por meio das expedições exploratórias e da movimentação de animais e mercadorias, *R. microplus* difundiu-se pelos continentes, encontrando condições climáticas propícias para sua perpetuação nas regiões tropicais e subtropicais, entre os paralelos 32° N e 32° S. Relatos históricos atribuem a sua introdução no Brasil à importação de animais do Chile no início do século XVII (NUÑES et al., 1982). No Brasil, o *R. microplus* encontra condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, podendo completar até cinco gerações por ano em locais com temperaturas médias anuais acima de 17 °C (FURLONG; EVANS, 1991).

Possuem o hábito de se alimentar por períodos prolongados, variando de alguns dias a algumas semanas. Possuem peças bucais relativamente curtas e necessitam de componentes salivares que auxiliem na sua fixação ao hospedeiro no momento do repasto sanguíneo (FRANCISCHETTI et al., 2009). É um carrapato monoxeno que parasita preferencialmente bovinos. O ciclo biológico é dividido em fase de vida livre e fase de vida parasitária.

A fase de vida livre inicia-se após o descolamento da teleógina ingurgitada do hospedeiro com destino ao ambiente, e é sucedida dos períodos de pré-postura, oviposição, eclosão das larvas, neolarvas e larvas infestantes. A fase de vida parasitária tem início quando

a larva se hospeda no bovino, transformando-se em metalarva, ninfa e metaninfa, ocorrendo, a partir de então diferenciação entre os sexos.

O início da queda das teleóginas ocorre entre 22º e 23º dia (PEREIRA, 1982). Na temperatura de 26 ± 1 °C os ovos levam um período de quatro semanas para eclodirem, e após sete dias as larvas estão aptas a parasitar os bovinos (PEREIRA, 1982). Os ovos são preferencialmente ovipostos em locais com umidade e temperatura medianas pois são muito sensíveis a desidratação. As larvas por sua vez podem ser bastante resistentes, chegando a sobreviver por mais de 200 dias no ambiente, com umidade de 90% e temperatura próxima a 15°C (KNULLE; RUDOLPH, 1982). A fase de vida livre do carrapato é influenciada pelas condições de temperatura e umidade. As baixas temperaturas e umidade relativa dos períodos de abril a setembro, retardam os períodos de incubação e de pré-oviposição, alongando o ciclo de vida deste ectoparasita (MORENO, 1984).

Durante o processo de repasto sanguíneo as teleóginas direcionam praticamente todos os nutrientes ingeridos para formação de ovos, podendo produzir e realizar a postura de 2000 a 4000 ovos no meio ambiente (PEREIRA, 1982). Durante este processo ela pode ingerir 100 vezes mais que a massa do próprio corpo em sangue. Milhares de fêmeas ingerindo de 0,5 a 3,0 mL de sangue durante o ciclo de vida podem levar o hospedeiro a um profundo quadro de anemia, promovendo perda de peso e comprometendo a qualidade do couro pelas lesões causadas pelas peças bucais (FURLONG, 1993).

Para se alimentar continuamente de sangue líquido, o *R. microplus* utiliza diversas substâncias para escapar dos sistemas de defesa do hospedeiro. É necessário que evadam as respostas homeostáticas do hospedeiro, como a hemostasia e as respostas imunes inata e adquirida. A saliva destes ácaros é composta por um arsenal de substâncias, que imediatamente constrói uma rota de escape às lesões causadas pelas suas picadas. Este ectoparasito desenha uma resposta contra o hospedeiro de forma a modificar ou impedir a ação das células do sistema imune, reduzindo a função dos linfócitos, suprimindo e desviando a produção de citocinas, diminuindo as respostas de anticorpos, e, principalmente, polarizando a resposta de linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th2, principalmente por afetar a maturação e funcionalidade das células dendríticas (BROSSARD; WIKEL, 2004; KRAMER et al., 2010).

O parasitismo deste carrapato pode trazer prejuízos indiretos à pecuária, como por exemplo a transmissão dos hematozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, além da

participação na epidemiologia do *Anaplasma marginale* (PATARROYO, 1994; OLIVEIRA-SIQUEIRA et al., 2005). Estes patógenos são responsáveis pela tristeza parasitária bovina, uma doença que afeta aproximadamente 80% da população bovina do mundo (FAO, 2011) e que causa perda de sangue, estresse geral, irritação, provocando redução na produtividade de leite e carne (MAPHOLI et al., 2014). Grandes perdas nas indústrias e criações de gado se devem à morte e às doenças transmitidas por patógenos vindos de carrapatos, gerando altos custos em medidas preventivas e também paliativas (MURRELL; BARKER, 2003). Estima-se que vacas leiteiras, mestiças de Holandês-Zebu infestadas por uma média de 105 carrapatos tenham redução em 23% na produção de leite por dia (SUDHAKAR et al., 2013).

2.3 Medidas de controle de *Rhipicephalus microplus*

O controle de *R. microplus* é realizado predominantemente por ectoparasiticidas a base de organofosforados, formamidas, piretróides e avermectinas (PEREIRA et al., 2010). O uso indiscriminado de carrapaticidas pode levar à seleção de populações de *R. microplus* resistentes, como resultado de mudanças no sítio de ação destes produtos e de mutações que criam mecanismos adaptativos, tais como, a redução da taxa de penetração do produto, alteração no tegumento externo, mudanças no metabolismo, no armazenamento e excreção do produto (FURLONG, 2007). A definição de resistência, segundo Sangster (2001), é a capacidade de um parasita sobreviver a concentrações de substâncias que normalmente seria capaz de matar espécies iguais e no mesmo estágio de desenvolvimento. Uma vez que estas alterações são transmitidas às gerações posteriores, a eficácia do mesmo produto na mesma população está comprometida (FREITAS-RIBEIRO et al., 2005).

Os acaricidas podem ser divididos em dois grupos: os primeiros são os aqueles que trazem danos aos carrapatos pelo contato, aplicados geralmente em formas de banhos de aspersão. São compostos principalmente por moléculas de organofosforados, piretróides e formamidas sendo acaricidas com baixo poder residual, exigindo aplicações em intervalos menores e com capacidade elevada de gerar resistência nos carrapatos. Os acaricidas do segundo grupo tem ação sistêmica após absorção e metabolização no hospedeiro. Possuem apresentação em forma de injeção, banho de aspersão ou *pour-on*, tendo as lactonas macrocíclicas como seu principal componente. Possuem período residual mais prolongado, permitindo que os intervalos de aplicação sejam maiores (BRITO et al., 2006).

Diversas formas alternativas de controle vêm sendo avaliadas como possíveis ferramentas do combate ao *R. microplus*. Dentre elas, destacam-se o controle biológico que trabalha na seleção de pastagens que dificultem a oviposição e a eclosão das larvas, o uso rotacional das pastagens, ou mesmo a busca de predadores ou parasitos do carrapato (LEAL et al., 2003); o controle imunológico, pelo qual estudos de biologia molecular e engenharia genética desenvolvem vacinas antiparasitárias (DALTON; MULCAHY, 2001); a homeopatia, visando a redução da infestação nos rebanhos sem contaminação residual de leite e carne (SOUZA et al. 2002); além da fitoterapia, que consiste na utilização de extratos de plantas e seus derivados (FLAMINI, 2003; ALVES et al., 2012).

2.4 Fitoterapia no controle de carrapatos

Para reduzir os impactos causados por produtos sintéticos pesquisadores do mundo todo têm direcionado seus esforços para estudar substâncias encontradas nos vegetais com potencial acaricida. Evolutivamente as plantas desenvolveram defesas contra insetos, bactérias, vírus, fungos, nematódeos, ácaros, mamíferos e outros herbívoros. Estas defesas normalmente envolvem substâncias do metabolismo secundário das plantas (REGNAULT-ROGER; PHILOGÈNE, 2008). Entretanto, fatores como a idade das plantas, sua localização geográfica, natureza do solo, condições climáticas, métodos de extração, entre outros, podem gerar variações nas concentrações de seus compostos químicos, o que torna o uso de princípios ativos puros mais vantajosos para a obtenção de resultados satisfatórios (KOC et al., 2013).

O monoterpeno carvacrol ou extratos de plantas dos quais é componente majoritário tem sido alvo de diversas pesquisas nas mais variadas fases do ciclo biológico de *R. microplus* (Quadro 1). O carvacrol é um monoterpeno aromático oxigenado encontrado em uma grande variedade de plantas, como, por exemplo, *Gynandropsis gynandra* (LWANDE et al., 1999), *Chamaecyparis nootkatensis* (ANDERSON; COATS, 2012), *Satureja thymbra* (CETIN et al., 2010), *Lippia triplinervis* (LAGE et al., 2013); *L. gracilis* (CRUZ et al., 2013), *Origanum onites* (COSKUN et al., 2008) e *O. bilgeri* (KOC et al., 2013). Em geral, os óleos e essências vegetais que possuem as mais efetivas propriedades pesticidas contêm uma grande porcentagem de carvacrol (KOC et al., 2013).

Quadro 1 - Resumo dos dados de mortalidade e concentrações letais e subletais de diferentes soluções contendo carvacrol, seus análogos ou óleos essenciais dos quais é constituinte.

Produto	Autores	Estágio	Solvente	Concentração e Mortalidade	Principais constituintes
Óleo essencial de: <i>Lippia graveolens</i>	Velazquez et al. (2011)	Larvas	Tricloroetileno e Azeite de Oliva (2:1)	2,5% (mortalidade de 100%)	timol (24,59%); carvacrol (24,54%); p-cimemo (13,6%)
Carvacrol	Senra et al. (2013)	Larvas	Etanol 50°GL	2,5 µl/ml (mortalidade de 100%)	
Óleo essencial de <i>Lippia triplinervis</i>	Lage et al. (2013)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	Tween 80 (20mg/mL)	Larvas: 5 mg/mL (mortalidade de 100%) Fêmeas ingurgitadas: *	carvacrol (31,9%); timol (30,6%); p-cimemo (12,3%)
Carvacrol; Acetato de carvacrol; Eter-metil-carvacrol	Concepción et al. (2013)	Larvas	Tricloroetileno e Azeite de Oliva (2:1)	1% (35,85%); 1% (67,83%); 1% (71,69%)	
Carvacrol	Cruz et al. (2013)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	DMSO (3%)	Larvas: 0,22 mg/mL (CL ₅₀) e 0,86 mg/mL (CL ₉₀) Fêmeas ingurgitadas: 4,46 mg/mL (CL ₅₀) e 5,71 mg/mL (CL ₉₀)	
Óleo essencial dos genótipos 106 e 201 de <i>Lippia gracilis</i> , e carvacrol	Costa-Júnior et al. (2016)	Larvas resistentes e suscetíveis a Organofosforados	Etanol (1%) e Triton X-100 (0,02%)	CL ₅₀ de Suscetíveis (mg/mL): Lgra 106 – 1,02 Lgra 201 – 1,03 Carvacrol – 2,56 CL ₅₀ de resistentes: Lgra 106 – 0,84	Lgra 106: Timol (59,26%); metil-timol (8,32%) p-cimemo (6,7%); carvacrol (0,88%) Lgra 201: carvacrol (35,28%); γ-terpineno (21,11%); p-cimemo (13,74%);

				Lgra 201 – 0,65 Carvacrol – 0,80	
Óleos essenciais de diferentes genótipos de <i>Lippia sidoides</i>	Soares et al. (2016)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	DMSO (3%)	CL ₅₀ (mg/mL) de larvas: LSID102 – 3,36 LSID104 – 2,99 CL ₅₀ (mg/mL) de fêmeas ingurgitadas: LSID102 – 2,81 LSID104 – 1,48	LSID102: timol (38,68%); p-cimemo (34,11%); carvacrol (0,60%) LSID104: carvacrol (43,69%); p-cimemo (17,83%); γ-terpineno (16,56%)
Carvacrol	Araújo et al. (2016)	Larvas	Etanol 70°GL	1,76 mg/mL (CL ₅₀)	
Óleos essenciais de <i>Lippia gracilis</i> e <i>Lippia organoides</i>	Chagas et al. (2016)	Larvas	Tween 80 (2%)	<i>L. gracilis</i> : 3,21 mg/mL (CL ₅₀) <i>L. organoides</i> : 3,08 mg/mL (CL ₅₀)	<i>L. gracilis</i> : carvacrol (40,40%); p-cimemo (11,40%) <i>L. organoides</i> : carvacrol (49,70%); p-cimemo (13,30%)

* Autor não apresentou resultado

Segundo Senra et al. (2013b), o carvacrol pode ser utilizado diretamente nos hospedeiros bem como em pastagens, ou até mesmo ser utilizado conjuntamente com outras estratégias de controle. Isso porque têm a capacidade de gerar mortalidade de carrapatos, além de manter um nível alto e consistente de atividade por muitas semanas. Em doses subletais pode, inclusive, apresentar efeitos anti-alimentação, impedir a oviposição ou mesmo induzir esterilidade (PANELLA et al., 2005).

Sugere-se que o carvacrol seja capaz de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis*, embora em um nível relativamente baixo. Por este motivo, este não pode ser considerado como o modo primário de ação do carvacrol, sendo seu potencial comparado a outros compostos monoterpênóides (ANDERSON; COATS, 2012). O carvacrol apresentou ação tóxica contra larvas e ninfas de

Amblyomma cajennense e *R. sanguineus* (SENRA et al., 2013a) e adultos de *R. turanicus* (KOC et al., 2013), em concentrações relativamente baixas, confirmando o potencial acaricida deste composto químico de origem natural. Cetin et al. (2010) constataram que o carvacrol foi também responsável pela morte e “knockdown” (estado em que o indivíduo não se move, porém responde a estímulos) de carrapatos *Hyalomma marginatum*.

Cruz et al. (2013) determinaram a concentração letal média (CL₅₀) do carvacrol diluído em DMSO a 3% para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (0,22 mg/mL), revelando maior eficiência, mesmo em baixas concentrações, quando comparado ao timol, outro importante princípio ativo extraído de plantas. Entretanto, em testes para a determinação da ação de solventes sobre carrapatos *R. microplus*, Chagas et al. (2003) observaram que o DMSO gerou mortalidade elevada de larvas e fêmeas adultas, se mostrando mais tóxico do que outros compostos, como o etanol, o qual não interferiu na mortalidade média desse ixodídeo em concentrações inferiores a 76%. Em solução etanólica, o carvacrol foi responsável pela mortalidade total de larvas de *R. microplus* e *D. nitens* na concentração de 2,5µL/mL (SENRA et al., 2013b).

O mercado para produtos acaricidas oriundos de plantas é extremamente promissor, especialmente quando são considerados os altos níveis de consumo de acaricidas sintéticos (BORGES et al., 2011). Em geral, os produtos de origem vegetal apresentam um potencial praticamente ilimitado de novas descobertas e, por este motivo, pesquisas adicionais com compostos derivados de plantas podem fornecer ao público alternativas naturais, seguras e ambientalmente aceitas em relação aos produtos sintéticos (PANELLA et al., 2005; DIETRICH et al., 2006).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos problemas causados pelo *R. microplus* e aos desafios encontrados para controlá-lo, compreende-se que seja necessário estudar os efeitos de substâncias potencialmente acaricidas. O carvacrol tem apresentado resultados satisfatórios no que diz respeito a viabilidade econômica e eficiência acaricida contra larvas e fêmeas adultas de carrapatos. A determinação da atividade deste fitoterápico diluído em solução hidroetanólica sobre parâmetros reprodutivos de fêmeas adultas de *R. microplus* poderá contribuir na

formulação de estratégias para o controle deste carrapato, um dos grandes entraves no desenvolvimento da pecuária nacional.

4 REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. <http://www.abiec.com.br/download/relatorio-anual-2015.pdf>. Acesso em: 14 fevereiro 2016.
- 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, p. 14-25, 2012.
- ANDERSON, J. A.; COATS, J. R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 124-128, 2012.
- ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D.; DA SILVA, B. C.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 377-382, 2016.
- BARKER, S. C. & MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Exp. Appl. Acarol**, v. 28, p. 55-68, 2004.
- BELL, A.; FELLOWS, L. E.; SIMMONDS, M. S. J. Natural products from plants for the control of insect pests. **Safer insecticide development and use**. New York and Basel, Marcel Dekker, p. 337-383, 1990.
- 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.
- BRASHEARS, M. M.; CHAVES, D. B. The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. **Meat Science**, v. 132, p. 59-71, 2017.
- BRASIL: **Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado**. <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/10/rebanho-bovino-brasileiro-cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado>. Acesso em: 14 fevereiro 2016.
- BRITO, L. G.; SILVA NETTO, F. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARBIERI, F. S. Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Porto Velho. **Embrapa Rondônia**. p. 21, 2006.
- BROSSARD, M.; WIKEL S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129 (Suppl.), p. S161-S176, 2004.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **Pib do Agronegócio**. Disponível em: < <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/> > Acesso em: 14 fevereiro 2016.
- CETIN, H.; CILEK, J. E.; OZ, E.; AYDIN, L.; DEVECI, O.; YANIKOGLU, A. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 287-290, 2010.
- CHAGAS, A. C. S.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; PRATES, H. L.; PASSOS, W. M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 109-114, 2003.
- CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 427-432, 2016.
- CONCEPCIÓN, L. R.; FROYLÁN, V. I.; HERMINIA, M. P.; NORBERTO, A. M.; HÉCTOR, S. Z.; YENIEL, G. C. In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Exp Appl Acarol**, v. 61, p. 251-257, 2013.
- COSKUN, S.; GIRISGIN, O.; KURKCUOGLU, M.; MALYER, H.; GIRISGIN, A.O.; KIRIMER, N.; BASER, K.H. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 103, p. 259-261, 2008.

- COSTA-JÚNIOR, L. M.; MILLER, R. J.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; LI, A. Y.; PÉREZ DE LEON, A. A. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet Parasitol.** V. 228, p. 60-64. 2016.
- CRUZ, E. M. O.; COSTA-JÚNIOR, L. M. C.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. A.; ARAUJO, S. A.; RIGONI-BLANK, M. F.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology.** v. 195, p. 198-202, 2013.
- DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Parasite vaccine – a reality? **Veterinary Parasitology.** v. 98, p. 149 – 167, 2001.
- DIETRICH, G.; DOLAN, M. C.; PERALTA-CRUZ, J.; SCHMIDT, J.; ELISEN, R. J.; KARCHESY, J. J. Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis nootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 957-961, 2006.
- FAO. World Livestock 2011 - Livestock in food security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2011. [Online] Available from: <http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf> [Accessed on 10th July, 2016]
- 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.
- FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNEZ, A.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, 2009.
- FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ-JÚNIOR, I. S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Sci. Vet.** v. 2, p. 109-117, 2005.
- FREITAS-RIBEIRO, G. M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V. O. VASCONCELOS, V. O.; DOLINSKI. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and All strains (*Steinernema*: Rhabditida). **Braz. Arch. Biol. Tech.**, v.48, n.6, p. 911-919, 2005.
- FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária.** Ano 27, nº 159, 2007.
- FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. Belo Horizonte: **Escola de Veterinária da UFMG.** v. 8, p. 49-61, 1993.
- FURLONG, J.; EVANS, D. Epidemiologia do carrapato *Boophilus microplus* no Brasil: Necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, VLL. SIMPÓSIO SOBRE MOSCAS DO CHIFRE *Haematobia irritans*, Il.; São Paulo. Anais. São Paulo, p. 48-50, EMBRAPA. 1991.
- FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Vet.** v. 23, p. 53-56, 2004.
- FURTADO, F. N.; SILVA, V. A. R.; PEREIRA, J. R. G.; KISUE, A.; COELHO, F. A. S.; COELHO, M. D. G. 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, A. G.; PEIXOTO, M. S. Bovinocultura de corte: uma avaliação dos recursos exigidos pelos diferentes sistemas de produção através de modelagem matemática fuzzy. **Biomatemática.** V. 21, p. 141-152, 2011.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23(2), p. 150-156, 2014.
- GUERRERO, F. D.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K. G.; CUNHA, R. C.; MILLER, R. J.; YEATER, K.; LEÓN, A. A. P. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-12, 2014.

- JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**. v. 137, p. 1-10, 2006.
- KNULLE, W.; RUDOLPH, D. Humidity relationships and water balance of ticks. In: OBECHAIN, F.D.; GALUN, R. (Ed.). Physiology of ticks. Oxford: **Pergamon Press Ltd.**, p. 43-70, 1982.
- KOC, S.; OZ, E.; CINBILGEL, L.; AYDIN, L.; CETIN, H. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P. H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 316-319, 2013.
- KRAMER, C. D.; POOLE, N. M.; COONS, L. B.; COLE, J. A. Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. **Exp. Parasitol.** v. 127, p. 665-671, 2010.
- LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, A. S.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, F. C.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis gardner* (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 112(2), p. 863-869, 2013.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 31, p. 1-11, 2003
- LWANDE, W.; NDAKALA, A. J.; HASSANALI, A.; MOREKA, L.; NYANDAT, E.; NDUNGU, M.; AMIANI, H.; GITU, P. M.; MALONZA, M. M.; PUNYUA, D. K. *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. **Phytochemistry**, v. 50, p. 401-405, 1999.
- MAPHOLI, N. O.; MARUFU, M. C.; MAIWASHE, A.; BANGA, C. B.; MUCHENJE, V.; MACNEIL, M. D.; CHIMONYO, M.; DZAMA, K. Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: a review. **Ticks Tick Borne Dis**. v. 5(5), p. 475-483, 2014.
- MDIC. Ministério do Desenvolvimento. **Exportação Brasileira Valores Mensais e Acumulados**. http://www.mdic.gov.br/arquivo/secex/balanca/balcombrasileira/mensal/brasileiro/2016/2016_01/bce008b.doc. Acesso em: 14 fevereiro 2016.
- MENDES, A. C. A. Um modelo de simulação como ferramenta de planejamento na bovinocultura de corte. **TESE**. 2008.
- MILKPOINT. **IBGE: produção de leite cresceu 2,7% em 2014; Sul tornou-se a maior região produtora**. <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/ibge-producao-de-leite-cresceu-27-em-2014-sul-tornouse-a-maior-regiao-produtora-97326n.aspx>. Acesso em: 14 fevereiro 2016.
- MORENO, E. C. Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da Região metalúrgica de Minas Gerais. **Dissertação**, 1984.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Crutice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.
- NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. *Boophilus microplus*: **La garrapata comum del ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, p. 184, 1982.
- OLIVEIRA-SIQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO-JUNIOR, J. P.; AMARANTE, A. F. T. PCR- based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 105 – 111, 2005.
- PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 352-358, 2005.
- PATARROYO, J. H. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Revista de Patologia Tropical**, v.23, p.145-146, 1994.
- PEREIRA, C. D.; SOUZA, G. R. L.; BAFFI, M. A. **Carrapatos dos Bovinos: Métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas**. Planaltina-DF. EMBRAPA Cerrados. p. 30, 2010.

- PEREIRA, M. C. **Boophilus microplus: Revisão Taxionômica e Morfo-Biológica**. Rio de Janeiro: Quimo Divisão Veterinária. 1982.
- REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B. J. R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharmaceutical Biology**. v. 46, p. 41-52, 2008.
- RECK, J.; KLAFFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, A. U.; CORAQUSSINI, B. V.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, S. J.; MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 128-136, 2014.
- SANGSTER, N. C. Managing parasiticidae resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 89 – 109, 2001.
- SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; GOMES, G. A.; FAZA, A.; CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (*E*)-cinnamaldehyde, *trans*-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 1461-1466, 2013b.
- SENRA, T. O. S.; CLAMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C. M.; MATURANO, R.; MATOS, R. S.; GOMES, G. A.; CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 3471-3476, 2013a.
- SOARES, A. M. S.; PENHA, T. A.; ARAÚJO, S. A.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Braz. J. Vet. Parasitol.** v. 25, p. 401-406, 2016.
- SOUZA, M. F. A. Homeopatia Veterinária. Apresentado na **I Conferência virtual global sobre produção orgânica de bovinos de corte**. Brasil, 2002.
- SUDHAKAR, N. R.; MANJUNATHACHAR, H. V.; KARTHIK, K.; SAHU, S.; GOPI, M.; SHANTAVEER, S. B.; MADHU, D. N.; NAURYA, P. S.; NAGARAJA, K. H.; SHINDE, S.; TAMILMAHAN, P. RNA Interference in Parasites; Prospects and Pitfalls. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**. v. 1, p. 1-6, 2013.
- VELAZQUEZ, M. M.; CRUZ, R. R.; HERRERA, G. C.; FERNANDEZ, J. M. F.; ALVAREZ, A. H.; CERVANTES, E. L. Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 48(4), p. 822-827, 2011.
- VILELA, S. D. J.; ASSIS, L. P.; LOPES, M. A.; SILVESTRE, L. H. A.; SANTOS, R. A.; RESENDE, E. S.; MARTINS, P. G. M. A. Economic and Productive Assessment of a Ordinary Small-Sized Dairy Enterprise in Southeast Brazil: A Multi-Year Study. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, p. 143-155, 2017.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Elaborado de acordo com as normas do periódico Parasitology Research.

Atividade acaricida do monoterpene carvacrol sobre fêmeas adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

Resumo

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se destaca pelo grande impacto que causa à produção animal e saúde pública. A dificuldade de controle deste ectoparasito em rebanhos tem estimulado a busca por métodos alternativos e seguros. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial acaricida do carvacrol, diluído em solução hidroetanólica 50% (v/v), em fêmeas adultas de *R. microplus*, por meio da estimativa da concentração letal média (CL₅₀) e da determinação da eficácia acaricida deste monoterpene. Os indivíduos (n= 360) foram submetidos ao Teste de Imersão de Adultos (TIA), a partir do qual calculou-se a CL₅₀. A partir deste valor o TIA foi realizado novamente (n=86) nas concentrações de 20%, 40%, 60%, 80% e 100% da CL₅₀, avaliando-se os seguintes parâmetros: peso das fêmeas antes da oviposição, peso da massa de ovos, período pré-oviposição, período de incubação, porcentagem de eclosão, índice de produção de ovos, taxa de fecundidade, reprodução estimada, porcentagens de redução da oviposição e eclosão, e eficácia do produto. Dois grupos controle foram estabelecidos: um grupo tratado com etanol 50% (v/v) e o outro com água destilada. Os grupos foram mantidos a 27±1°C e umidade>80±10 %. O peso da massa de ovos, o índice de produção de ovos, o período de pré-oviposição e a taxa de fecundidade dos grupos 80% e 100% da CL₅₀ apresentaram diferença estatística (p<0,05) se comparados aos grupos controle. A CL₅₀ encontrada foi de 20,11 mg/mL e a eficácia de controle desta concentração foi de 61,10% comparada ao controle tratado com água destilada. Os resultados sugerem que, devido sua ação acaricida, o carvacrol pode ser uma alternativa promissora no controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: Fitoterapia; CL₅₀; Carrapatos; Óleo Essencial, Bovinos; Controle.

Abstract

The tick *Rhipicephalus microplus* has been highlighted by the great impacts that it causes to animal production and public health. The difficulty of controlling this ectoparasite in herds has stimulated the search for alternative and safe methods. The aim of this study was to evaluate the acaricidal potential of carvacrol diluted in 50% (v / v) hydroethanolic solution in the control of engorged females of *R. microplus* ticks by estimating the mean lethal concentration (LC₅₀) and determining the efficacy of this product. The individuals (n = 360) underwent the Adult Immersion Test (AIT), from which the LC₅₀ was calculated. From this value, AIT was performed again (n = 86) at the concentrations of 20%, 40%, 60%, 80% and 100% of LC₅₀, and the following parameters were evaluated: females weight before egg oviposition, egg mass weight, preoviposition period, incubation period. Percentage of hatching, egg production index (IPO), fecundity rate, estimated reproduction, oviposition and hatching reduction percentages, and product efficacy. Two control groups were established: one group treated with 50% ethanol (v / v) and the other with distilled water. The groups were maintained at 27 ± 1 ° C and humidity $> 80 \pm 10\%$. Egg weight, egg production index, pre-oviposition period and fecundity rate of groups treated with 80% and 100% of LC₅₀ presented statistical difference ($p < 0.05$) when compared to control groups. The LC₅₀ found was 20.11 mg / mL and the control efficacy of this concentration was 61.10% compared to the control treated with distilled water. Thus, the results demonstrate that carvacrol has a significant acaricidal potential, and may contribute as another alternative in the control of *R. microplus*.

Key-words: Phytotherapy. LC₅₀. Ticks. Essential Oil. Cattle.

INTRODUÇÃO

Entre os carrapatos mais importantes para a pecuária bovina destaca-se a espécie *R. microplus*, responsável por importantes perdas econômicas diretas e indiretas, em virtude de seu hábito hematófago, que provoca anemia, perda de peso e aumento na conversão alimentar, além de danos à qualidade do couro, transmissão de hematozoários e, altos custos com controle e tratamentos (Jonsson 2006).

Por várias décadas, diversas classes de acaricidas sintéticos têm sido desenvolvidas e utilizadas no controle de carrapatos e, apesar de possuírem diferentes mecanismos de ação, têm sofrido redução na eficácia de tratamento pelo desenvolvimento de populações resistentes (Higa et al. 2016). Os produtos sintéticos são amplamente utilizados no controle do *R. microplus* e, de modo geral, indiscriminadamente (Junqueira et al. 2016; Klafke et al. 2016). A subdosagem, bem como o desrespeito ao período de carência destas substâncias vêm acarretando o aparecimento e perpetuação de populações resistentes aos vários grupos químicos utilizados, além de contaminar produtos de origem animal e o meio ambiente (Alves et al. 2012). No Brasil, diversos estudos demonstraram carrapatos resistentes às várias classes de acaricidas (Castro-Janer et al. 2010; Mendes et al. 2011; Klafke et al. 2012; Reck et al. 2014; Klafke et al. 2016). A seleção de cepas resistentes a múltiplos fármacos resulta em redução na eficácia do tratamento e consequente aumento nos custos de controle (Klafke et al., 2016).

Em virtude da grande variabilidade de espécies de plantas, principalmente no Brasil, vem se destacando o uso de produtos fitoterápicos no controle de carrapatos (Alves et al., 2012). Extratos de plantas têm sido desenvolvidos como uma tentativa de se encontrar substâncias com propriedades acaricidas que possam ser utilizadas em associação ou mesmo em substituição aos princípios ativos sintéticos (Borges et al. 2011). Isso porque, em comparação aos compostos sintéticos, os produtos naturais apresentam menor custo, alta disponibilidade, fácil manejo, rápida degradação, além de baixa contaminação do ambiente, homem e animais (Flamini 2003; Alves et al. 2012).

O carvacrol é um monoterpeno encontrado em óleos essenciais, principalmente de plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) (Ntalli et al. 2011) possuindo atividades bactericidas (Ali-Shtayeh et al. 1997; Du et al. 2008; García-Heredia et al. 2016; Houdkova et al. 2017) e

antitumorais (Jayakumar et al. 2012; Fitsiou et al. 2016), além de apresentar efeitos contra larvas de diversas espécies de carrapatos (Senra, et al. 2013a; Costa-Júnior et al. 2016; Senra, et al. 2013b; Cruz et al. 2013) e também contra indivíduos adultos (Cetin et al. 2010; Cruz et al. 2013; Coskun et al. 2008). Acredita-se que o carvacrol cause toxicidade aguda em artrópodes por atuar na inibição da acetilcolinesterase (AChE) (Anderson e Coats 2012; El-Wakeil 2013). Em estudo recente, Gross et al (2017) revelaram que o carvacrol possui uma ação potencializadora do efeito da amina biogênica tiramina sobre seu receptor RmTAR1, que é considerado um possível alvo de acaricidas a base de formamidina (Blenau et al. 2012).

Frente aos desafios encontrados e às emergentes formas alternativas de controle de carrapatos, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial acaricida do carvacrol diluído em solução hidroetanólica sobre fêmeas adultas de *R. microplus*, por meio da determinação da concentração letal e da avaliação do desempenho reprodutivo deste carrapato, a fim de se estimar a eficácia desse produto.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Parasitária (BIOPAR) da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. As fêmeas adultas foram coletadas de rebanhos naturalmente infestados do município de Lavras, Minas Gerais, Brasil e região que não haviam realizado tratamentos acaricidas nos últimos três meses. As fêmeas adultas de *R. microplus* foram coletadas no período de abril a dezembro de 2016.

Primeiro bioensaio

Os testes para a obtenção da concentração letal do carvacrol para 50% das fêmeas adultas de *R. microplus* (CL₅₀) foram realizados de acordo com adaptação da metodologia descrita por Roma et al. (2009). Para determinar o intervalo de mortalidade dos carrapatos, fêmeas adultas (n = 140) foram divididas em 14 grupos experimentais, com 10 indivíduos cada: dois Grupos Controle (C_I e C_{II}), no qual as fêmeas foram expostas à água destilada (C_I) e apenas ao solvente (etanol a 50° GL - C_{II}); e dez Grupos de Tratamento (T_{I-X}), nos quais os indivíduos foram expostos às concentrações de 9,67, 19,15, 23,83, 26,61, 29,37, 31,21, 34,85, 37,57, 40,28, 43,85 mg/mL do carvacrol diluído em solução hidroetanólica (etanol a 50° GL), respectivamente, com base em experimentos realizados previamente (Senra et al. 2013).

Antes do início dos testes, os carrapatos foram lavados em água corrente em uma peneira e, logo depois, secos em papel absorvente macio. O teste de imersão de adultos (TIA) seguiu os procedimentos propostos por Drummond et al. (1973). Cada grupo de fêmeas foi imerso nas substâncias a serem testadas durante 5 minutos. Em seguida, os carrapatos foram secos em papel absorvente, e colocados em placas de Petri (6x6) identificadas em estufa BOD sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas). Os animais foram observados, durante um período total de sete dias, conforme proposto por Oliveira et al. (2008). A determinação da morte das fêmeas se deu quando houve ausência de motilidade após estimulação com CO_2 , coloração da cutícula enegrecida e ausência de motilidade após estimulação do ventre por instrumento pontiagudo.

Segundo bioensaio

Após a detecção do intervalo de mortalidade, o carvacrol foi novamente diluído em solvente e testado em uma nova série de diluições. Carrapatos com massas corporais homogêneas ($n = 280$; $p < 0,05$) foram divididos em 14 grupos experimentais, com 10 indivíduos cada: dois Grupos Controle (C_I e C_{II}), no qual as fêmeas foram novamente expostas à água destilada (C_I) e apenas ao solvente (etanol a 50°GL - C_{II}); e dez Grupos de Tratamento (T_{I-X}), nos quais os indivíduos foram expostos às concentrações de 12,53, 16,33, 19,15, 21,96, 23,82, 26,61, 29,37, 31,21, 34,85, 37,57 mg/mL do carvacrol diluído em solução hidroetanólica (etanol a 50°GL), respectivamente, com base no intervalo de mortalidade obtido.

O TIA foi novamente realizado (Drummond et al., 1973), e os carrapatos foram, em seguida, mantidos em estufa BOD sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas), também durante sete dias. Os grupos experimentais foram testados em duplicatas (totalizando 20 indivíduos para cada grupo). Os resultados obtidos foram submetidos à análise Probit, por meio do software POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987), a fim de se calcular as concentrações letais para 50 e 90% dos indivíduos (CL_{50} e CL_{90}), bem como seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Avaliação dos parâmetros reprodutivos de *R. microplus*

As fêmeas adultas foram lavadas em uma peneira em água corrente e, logo depois, foram secos em papel absorvente macio. O protocolo experimental foi baseado no teste de

imersão de adultos proposto por Drummond et al. (1973). Um total de 84 carrapatos, com pesos homogêneos ($p < 0,05$), foram divididos em sete grupos experimentais: dois Grupos Controle (C_I , C_{II}), nos quais os carrapatos foram expostos, respectivamente, à água destilada e ao solvente (etanol a 50° GL); e quatro Grupos de Tratamento (T_I , T_{II} , T_{III} , T_{IV} e T_V), nos quais os carrapatos foram expostos às concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100% da concentração letal média (CL_{50}) do carvacrol, diluído em etanol a 50° GL. Após a aplicação das soluções, as fêmeas foram secas em papel absorvente, e mantidas individualmente em placas de Petri (6x6) identificadas em uma estufa BOD, sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas).

Foram 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 da fêmea; c) período de pré-oviposição (PPO), que corresponde ao número de dias contados desde o momento em que se destacam do hospedeiro até o início da oviposição; d) período de incubação (PI), que corresponde ao período de tempo contado a partir da oviposição até o começo da eclosão dos ovos (incubação); e) taxa de eclodibilidade de ovos (TE), ou porcentagem de eclosão, determinada visualmente por meio da estimativa da proporção de larvas em relação à proporção de ovos não eclodidos.

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).

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

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):

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

Além disso, para cada grupo, foram definidos: a taxa de reprodução estimada (RE), segundo Lage et al. (2013) e Matos et al. (2014), bem como a porcentagem de redução da

oviposição (% $R_{\text{OVIPOSIÇÃO}}$) e de redução da eclosão (% $R_{\text{ECLOSÃO}}$), conforme Lopes et al. (2013):

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

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

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

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):

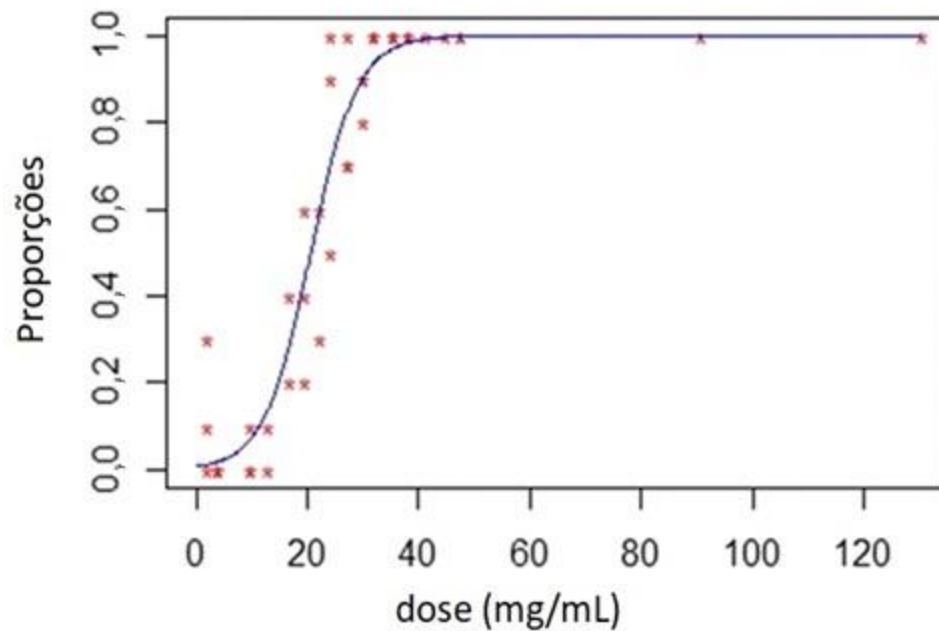
$$EP = \frac{(RE_{\text{CONTROLE}} - RE_{\text{TRATAMENTO}})}{RE_{\text{CONTROLE}}} \times 100$$

A análise estatística foi realizada em software GraphPad Prism 5 (v.5.03). Todos os valores obtidos foram analisados estatisticamente por meio de Análise de Variância (ANOVA), e a comparação das médias foi realizada mediante utilização do teste de Tukey ($p < 0,05$). Para dados não distribuídos normalmente, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS

A concentração letal do carvacrol para 50% dos indivíduos tratados foi estimada, por meio de análise Probit, em 20,11 mg de carvacrol por mL de solução hidroetanólica a 50% v/v (Gráfico 1), enquanto que a concentração letal do carvacrol para 90% dos indivíduos foi 29,1 mg/mL

Gráfico 1 - Resultado da CL_{50} . Curva da dose/resposta das concentrações de carvacrol diluídas em solução hidroetanólica 50% (v/v) do bioensaio 1.



Os valores de CL_{50} e CL_{90} foram obtidos a partir dos resultados de mortalidade das fêmeas no 7º dia de experimento, nos bioensaio 1 e 2, conforme as Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Peso médio das fêmeas de *R. microplus* (mg), número de indivíduos (n) e número de mortos em cada grupo do bioensaio 1.

Tratamento	Peso médio das fêmeas (mg)	n	Número de mortos
Controle – H ₂ O	213,64±38,3	10	3
Controle – Etanol 50%	221,32±27,48	10	0
9,67 mg/mL	206,6±38,9	10	0
19,15 mg/mL	220±39,1	10	2
23,83 mg/mL	177,2±11,7	10	9
26,61 mg/mL	149,8±5,4	10	10
29,37 mg/mL	114,7±2,7	10	8
31,21 mg/mL	116,9±20,8	10	10
34,85 mg/mL	130,3±39,5	10	10
37,57 mg/mL	204,5±21,2	10	10
40,28 mg/mL	135,1±48,3	10	10
43,85 µL/mL	129,1±46,4	10	10

Tabela 2 - Peso médio das fêmeas antes da oviposição (mg), número de indivíduos (n) e número de mortos em cada grupo no bioensaio 2.

Tratamento	Peso médio das fêmeas (mg)	n	Número de mortos
Controle – H ₂ O	178,0±22,2	20	1
Controle – Etanol 50%	139,0±34,6	20	0
12,53 mg/mL	174,0±23,8	20	1
16,33 mg/mL	120,9±2,9	20	6
19,15 mg/mL	161,9±32	20	10
21,96 mg/mL	110,4±6,4	20	9
23,82 mg/mL	223,3±25,2	20	15
26,61 mg/mL	133,1±5,2	20	14
29,37 mg/mL	127,8±2,7	20	18
31,21 mg/mL	119,1±24,5	20	20
34,85 mg/mL	164,5±7,1	20	20
37,57 mg/mL	119,6±37,4	20	20

Na avaliação dos parâmetros reprodutivos, não foram encontradas diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre as médias do peso das fêmeas antes da oviposição (mg) nos diferentes grupos (Tabela 3). A média do peso da massa de ovos teve valores estatisticamente similares ($p>0,05$) para os grupos dos tratamentos de água destilada (125,10 mg), etanol 50% (135,97 mg), 20% da CL₅₀ (135,58 mg) e 40% da CL₅₀ (105,77 mg), que por sua vez foram significativamente diferentes ($p<0,05$) dos grupos tratados com a concentração de 80% (61,72 mg) e 100% da CL₅₀ (48,04 mg) (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre as médias de porcentagem de eclosão nos diferentes grupos (Tabela 3). O índice de produção de ovos sofreu redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) a partir da concentração de 80% da CL₅₀ (26,35%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias de peso das fêmeas adultas de *R. microplus* antes da oviposição (miligramas), peso da massa de ovos (miligramas), porcentagem de eclosão (%) e índice de produção de ovos em fêmeas tratadas com diferentes concentrações de carvacrol diluído em solução hidroetanólica 50% (v/v) em condições de laboratório (27 ± 1 °C e umidade $>80\pm10$ %).

Tratamento	Peso da fêmea antes da oviposição (mg)	Peso da massa dos ovos (mg)	Índice de produção de ovos	Porcentagem de eclosão (%)
Controle H ₂ O	235,7a $\pm$ 4,1	125,1a $\pm$ 3,0	52,7a $\pm$ 6,0	99,5a $\pm$ 0,9
Controle Etanol 50%	223,3a $\pm$ 3,3	135,9a $\pm$ 3,07	58,0a $\pm$ 6,1	99,3a $\pm$ 1,1
20 % da CL ₅₀	249,7a $\pm$ 3,0	135,5a $\pm$ 2,5	54,3a $\pm$ 8,1	99,1a $\pm$ 1,6
40% da CL ₅₀	231,5a $\pm$ 3,1	105,7a $\pm$ 4,0	45,0ab $\pm$ 14,5	98,1a $\pm$ 2,2
60% da CL ₅₀	226,9a $\pm$ 3,1	82,1ab $\pm$ 5,6	36,3ab $\pm$ 24,2	98,8a $\pm$ 1,6
80% da CL ₅₀	234,8a $\pm$ 2,9	61,7b $\pm$ 5,3	26,3b $\pm$ 22,8	98,6a $\pm$ 2,0
100% da CL ₅₀	231,4a $\pm$ 1,4	48,0b $\pm$ 5,1	21,2b $\pm$ 23,2	97,6a $\pm$ 2,3

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente com significância a 5%.

Os grupos tratados com 80% e 100% da CL₅₀ apresentaram período de pré-oviposição estatisticamente superior ($p<0,05$) aos demais: 4,1 e 4,7 dias, respectivamente (Tabela 4). No que se refere ao período de incubação, os grupos tratados com 40%, 60% e 100% da CL₅₀

apresentaram valores intermediários (26,7, 27,3 e 27 dias, respectivamente), enquanto que o maior período foi observado no grupo tratado com 80% da CL₅₀ (27,9 dias) ($p < 0,05$) (Tabela 4). A taxa de fecundidade dos grupos tratados com 80% (25,95%) e 100% da CL₅₀ (20,65%) apresentou-se inferior ($p < 0,05$) à dos demais grupos (Tabela 4).

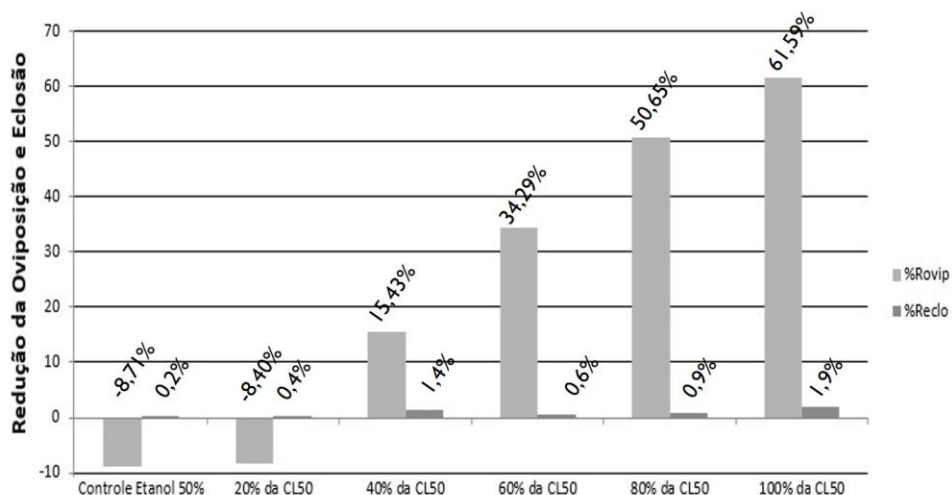
Tabela 4 - Período pré-oviposição (dias), período de incubação (dias) e taxa de fecundidade (%) em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações de carvacrol diluído em solução hidroetanólica 50% (v/v) em condições de laboratório (27 ± 1 °C e umidade $> 80 \pm 10$ %).

Tratamento	Período de Pré-Oviposição (dias)	Período de Incubação (dias)	Taxa de fecundidade
Controle H ₂ O	3,1a $\pm$ 0,3	26,1a $\pm$ 0,3	52,5a $\pm$ 6,1
Controle Etanol 50%	3,3a $\pm$ 0,4	25,8a $\pm$ 0,3	57,6a $\pm$ 5,7
20 % da CL ₅₀	3,5a $\pm$ 0,5	26,3a $\pm$ 0,7	53,8a $\pm$ 7,8
40% da CL ₅₀	3,8a $\pm$ 1,1	26,7ab $\pm$ 0,7	44,1a $\pm$ 14,0
60% da CL ₅₀	3,7a $\pm$ 0,6	27,3ab $\pm$ 1,1	35,9ab $\pm$ 24,0
80% da CL ₅₀	4,1b $\pm$ 0,7	27,9b $\pm$ 0,7	25,9b $\pm$ 22,5
100% da CL ₅₀	4,7b $\pm$ 0,4	27,0ab $\pm$ 0,9	20,6b $\pm$ 22,5

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente com significância a 5%.

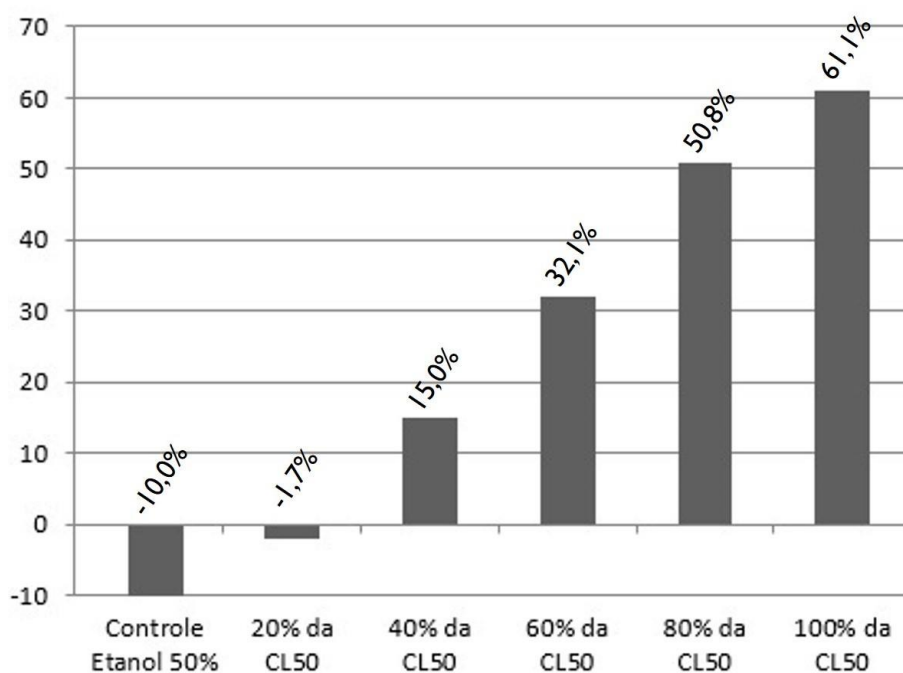
Observou-se redução na porcentagem de oviposição nos grupos tratados com 40%, 60%, 80% e 100% da CL₅₀; respectivamente a redução foi de 15,43%, 34,29%, 50,65% e 61,59%. Os tratamentos apresentaram porcentagens de redução de eclosão das larvas muito semelhantes; os grupos tratados com 20%, 40%, 60%, 80% e 100% da CL₅₀ apresentaram pequenas reduções de 0,2%, 0,4%, 1,4%, 0,6%, 0,9% e 1,9%, respectivamente (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Porcentagem de redução de oviposição (%Rovip) e eclosão de larvas (%Reclo) dos diferentes grupos.



A partir dos resultados obtidos, a estimativa da porcentagem de controle ou eficácia do produto foi de -10,0; -1,7; 15,0; 32,1; 50,8 e 61,1%, para os grupos tratados com solução hidroetanólica 50% (v/v), 20, 40, 60, 80 e 100% da CL50 (Gráfico 3), respectivamente.

Gráfico 3 - Eficiência dos diferentes grupos (CII, TI, TII, TIII, TIV e TV) em comparação ao grupo Controle (CI).



DISCUSSÃO

Os acaricidas mais utilizados em todo o mundo são produtos sintéticos pertencentes à classe dos organofosforados, carbamatos e piretróides (Bandara e Kanuaratne 2017). O crescente desenvolvimento da resistência aos acaricidas sintéticos, aliado à eminente contaminação no ambiente e em produtos de origem animal, tem estimulado estudos com métodos alternativos de controle (Biegelmeyer et al. 2015). Frente a este desafio, os fitoterápicos têm surgido como uma opção promissora, podendo ser utilizados no controle de *R. microplus*, minimizando seus efeitos adversos fora do organismo alvo (Matos et al. 2014). Dentro desse contexto, o carvacrol tem aparecido como um dos principais componentes dos óleos essenciais com atividade acaricida contra fêmeas adultas ou larvas de *R. microplus*, *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus turanicus* (Coskun et al. 2008; Velazquez et al. 2011; Lage et al. 2013; Koc et al. 2013; Senra et al. 2013; Costa-Júnior et al. 2016; Soares et al. 2016; Chagas et al. 2016).

Cruz et al. (2013), avaliando a atividade acaricida do carvacrol, diluído em DMSO a 3%, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, determinaram CL₅₀ de 4,46 mg/mL. A diferença entre a concentração encontrada por Cruz et al. (2013) e a encontrada no presente estudo (20,11 mg/mL) pode ser atribuída ao solvente utilizado. Chagas et al. (2003) testaram a sensibilidade de fêmeas de *R. microplus* a alguns solventes, dentre esses o DMSO, e observaram mortalidade de 24% dos indivíduos quando imergidos em solução com 25% deste solvente, porém não realizaram testes na concentração de 3%. O fato de Cruz et al. (2013) não apresentarem os resultados referentes ao grupo controle não nos permite afirmar se houve ou não potencialização do efeito do carvacrol na presença de DMSO (3%), e este ser o motivo da CL₅₀ ter apresentado um valor reduzido.

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos do carvacrol, dos seus análogos ou de óleos essenciais dos quais este faz parte, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e/ou suas larvas, utilizando diferentes solventes (Quadro 1). Observa-se que, dependendo do tipo de solvente e da concentração utilizada, ocorre variação nos efeitos de mortalidade, e isto se deve ao fato de cada solvente ter uma característica própria e apresentar ou não sinergismo com o acaricida (Senra et al. 2013). No presente estudo, avaliamos a os possíveis efeitos do solvente a partir da comparação dos grupos CI e CII.

Quadro 1 - Resumo dos dados de mortalidade e concentrações letais e subletais de diferentes soluções contendo carvacrol, seus análogos ou óleos essenciais dos quais é constituinte.

Produto	Autores	Estágio	Solvente	Concentração e Mortalidade	Principais constituintes
Óleo essencial de: <i>Lippia graveolens</i>	Velazquez et al. (2011)	Larvas	Tricloroetileno e Azeite de Oliva (2:1)	2,5% (mortalidade de 100%)	timol (24,59%); carvacrol (24,54%); p-cimemo (13,6%)
Carvacrol	Senra et al. (2013)	Larvas	Etanol 50°GL	2,5 µl/ml (mortalidade de 100%)	
Óleo essencial de <i>Lippia triplinervis</i>	Lage et al. (2013)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	Tween 80 (20mg/mL)	Larvas: 5 mg/mL (mortalidade de 100%) Fêmeas ingurgitadas: *	carvacrol (31,9%); timol (30,6%); p-cimemo (12,3%)
Carvacrol; Acetato de carvacrol; Eter-metil-carvacrol	Concepción et al. (2013)	Larvas	Tricloroetileno e Azeite de Oliva (2:1)	1% (35,85%); 1% (67,83%); 1% (71,69%)	
Carvacrol	Cruz et al. (2013)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	DMSO (3%)	Larvas: 0,22 mg/mL (CL ₅₀) e 0,86 mg/mL (CL ₉₀) Fêmeas ingurgitadas: 4,46 mg/mL (CL ₅₀) e 5,71 mg/mL (CL ₉₀)	
Óleo essencial dos genótipos 106 e 201 de <i>Lippia gracilis</i> , e carvacrol	Costa-Júnior et al. (2016)	Larvas resistentes e suscetíveis a Organofosforados	Etanol (1%) e Triton X-100 (0,02%)	CL ₅₀ de Suscetíveis (mg/mL): Lgra 106 – 1,02 Lgra 201 – 1,03 Carvacrol – 2,56 CL ₅₀ de resistentes: Lgra 106 – 0,84	Lgra 106: Timol (59,26%); metil-timol (8,32%) p-cimemo (6,7%); carvacrol (0,88%) Lgra 201: carvacrol (35,28%); γ-terpineno (21,11%); p-cimemo (13,74%);

				Lgra 201 – 0,65 Carvacrol – 0,80	
Óleos essenciais de diferentes genótipos de <i>Lippia sidoides</i>	Soares et al. (2016)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	DMSO (3%)	CL ₅₀ (mg/mL) de larvas: LSID102 – 3,36 LSID104 – 2,99 CL ₅₀ (mg/mL) de fêmeas ingurgitadas: LSID102 – 2,81 LSID104 – 1,48	LSID102: timol (38,68%); p-cimemo (34,11%); carvacrol (0,60%) LSID104: carvacrol (43,69%); p-cimemo (17,83%); γ-terpineno (16,56%)
Carvacrol	Araújo et al. (2016)	Larvas	Etanol 70°GL	1,76 mg/mL (CL ₅₀)	
Óleos essenciais de <i>Lippia gracilis</i> e <i>Lippia origanoides</i>	Chagas et al. (2016)	Larvas	Tween 80 (2%)	<i>L. gracilis</i> : 3,21 mg/mL (CL ₅₀) <i>L. origanoides</i> : 3,08 mg/mL (CL ₅₀)	<i>L. gracilis</i> : carvacrol (40,40%); p-cimemo (11,40%) <i>L. origanoides</i> : carvacrol (49,70%); p-cimemo (13,30%)

* Autor não apresentou resultado

Tratando-se das diferenças entre efeitos de mortalidade dos acaricidas sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, os resultados da literatura revelam a impossibilidade de se atestar se determinada substância será mais eficiente sobre um estágio ou sobre outro. Cruz et al (2013), por exemplo, encontraram valores de CL₅₀ e CL₉₀ menores em larvas do que em fêmeas ingurgitadas, enquanto que Soares et al. (2016) encontraram valores de CL₅₀ menores em fêmeas ingurgitadas. Estudos dos efeitos destes acaricidas sobre fêmeas adultas de *R. microplus* são minoria em comparação com os realizados em larvas, porém, são de extrema importância, pois podem ser correlacionados às características reprodutivas deste ixodídeo.

Chagas et al. (2016), analisando uma série de óleos essenciais de plantas típicas do Brasil, observaram que os compostos capazes de atingir a CL₅₀ com as menores concentrações para larvas são os que possuem em sua composição o carvacrol como principal

constituente, sendo eles os oriundos das espécies *Lippia gracilis*, *Lippia origanoides*, com CL_{50} de 3,21 mg/mL e 3,08 mg/mL, respectivamente.

Uma vez que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o peso das fêmeas antes da oviposição (mg), no presente estudo, pode-se atribuir ao tratamento as diferenças ($p < 0,05$) entre os pesos das massas dos ovos entre os grupos. Considerando as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), a utilização da concentração de 80% da CL_{50} faz-se interessante, uma vez que é a menor concentração a apresentar diferença dos grupos controle, no que se refere tanto ao peso da massa de ovos quanto ao índice de produção de ovos.

Para formação do conjunto de média da porcentagem de eclosão levou-se em consideração apenas os indivíduos que sobreviveram ao tratamento e fizeram oviposição. Dentre aqueles que realizaram oviposição, não se observou qualquer redução significativa na porcentagem de eclosão, ao contrário do que outros estudos apontam como, por exemplo, Lage et al. (2013) com diferentes concentrações de óleo essencial de *Lasiosiphon triplinervis*, Castro et al. (2016), com extratos de *Pilocarpus microphyllus* e Parveen et al. (2014), com diferentes concentrações de extrato etanólico de *Artemisia absinthium*. Avaliações histológicas, bem como análises de ultraestrutura do aparelho reprodutivo fêmeas expostas a produtos fitoterápicos poderiam fornecer informações importantes sobre o comprometimento ou não da reprodução e geração de descendentes viáveis.

O retardamento do período de pré-oviposição observado nos grupos tratados com 80 e 100% da CL_{50} ($p < 0,05$) pode ter comprometido a plenitude da oviposição e influenciado na redução do peso da massa de ovos, reduzindo por consequência a taxa de fecundidade destes mesmos grupos ($p < 0,05$). Desta maneira, pode-se supor que o atraso no início da oviposição tenha se dado pelo comprometimento que o carvacrol causou à formação dos ovos, considerando-se que, nestes grupos de tratamento, o peso da massa de ovos, bem como o número de larvas, encontram-se reduzidos.

O período de incubação diferiu entre os tratamentos ($p < 0,05$), apresentando-se maior no grupo tratado com 80% da CL_{50} (27,9 dias). Tratando-se esta, de uma etapa do ciclo em que o artrópode não está parasitando os animais hospedeiros, pode-se sugerir que o alongamento deste período potencialize outros métodos de controle, especialmente aqueles direcionados aos ovos de carrapatos localizados no ambiente.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que a CL₅₀ de carvacrol diluído em solução hidroetanólica possui eficácia de 61,10% sobre de fêmeas adultas de *R. microplus* quando comparado ao grupo controle tratado com solução hidroetanólica 50% (v/v) (Gráfico 3). A eficácia do produto ou porcentagem de controle (EP) aumentou à medida em que as concentrações do carvacrol aumentavam, evidenciando um efeito dose-dependente. A eficácia do carvacrol encontrada neste estudo tem resultados superiores aos encontrados por Chagas et al. (2016) nos óleos essenciais que têm em sua composição este monoterpene; o óleo de *L. gracilis* apresentou 32% de eficácia, enquanto que o óleo de *L. origanoides* apresentou 39% de eficácia em carrapatos *R. microplus*. Em um estudo com metodologia semelhante, Ramírez et al. (2016) encontraram eficácia de 16,76% diluindo 0,25 mg de carvacrol em solução de DMSO (3,84%), e observaram que os análogos éter-metil-carvacrol e acetato de carvacrol apresentaram maior eficácia que o carvacrol, com valores de 26,76% e 26,33%, respectivamente.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que o monoterpene carvacrol possui atividade acaricida podendo ser uma alternativa promissora no controle de *R. microplus*. Na dosagem capaz de matar 50% dos indivíduos (CL₅₀), o produto apresentou eficácia de 61,10%, reduzindo significativamente o índice de produção de ovos e a taxa de fecundidade e, consequentemente a quantidade de indivíduos da geração seguinte. Estudos posteriores podem oferecer relevantes informações, principalmente a respeito dos efeitos que esta substância pode causar no aparelho reprodutivo das fêmeas de *R. microplus* que resistirem ao acaricida.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado, à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal de Lavras (UFLA) por prover recursos estruturais para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z (2014) Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet Parasitol* 203:6-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.006
- Ali-Shtayeh MS, Al-Nuri MA, Yaghmour RMR, Faidi YR (1997) Antimicrobial activity of *Micromeria nervosa* from the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology* 58:143-147. doi: 10.1016/S0378-8741(97)00088-3
- Alves WV, Lorenzetti ER, Gonçalves FC (2012) 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* 2:14-25. doi: 10.21206/rbas.v2i2.162
- Anderson JA, Coats JR (2012) Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pestic. Biochem* 102:124-128. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.12.002
- Araújo LX, Novato TPL, Zeringota V, Maturano R, Melo D, Da Silva BC, Daemon, E, Carvalho MG, Monteiro CMO (2016) Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 30(4):377–382. doi: 10.1111/mve.12181
- Bandara KMJ, Karunaratne SHPP (2017) 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.2017.05.002
- Biegelmeyer P, Nizoli LQ, da Silva SS, dos Santos TRB, Dionello NJL, Gúlias-Gomes CC, Cardoso FF (2015) Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 208:231–237. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.01.010
- Blenau W, Balfanz S, Baumann A (2012) Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets?. *Apidologie* 43:334-347. doi: 10.1007/s13592-011-0108-7
- Borges LMF, Sousa LAD, Barbosa CS (2011) Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 20(2):89-96. doi: 10.1590/S1984-29612011000200001

- Castrejón FM, Cruz-Vásquez MF, Ruvalcaba MF, Torres JM, Cruz JS, Parra MR (2003) Repellence of *Boophilus microplus* larvae in *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes shamata* plants. *Parasitol. Latinoamer.* 58:118–121. doi: 10.4067/S0717-77122003000300005
- Castro KNC, Lima DF, Wolschick D, Andrade IM, Santos RC, Santos FJS, Veras LMC, Costa Júnior LM (2016) In vitro effects of *Pilocarpus microphyllus* extracts and pilocarpine hydrochloride on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 25(2):248-253. doi: 10.1590/S1984-29612016032
- Castro-Janer E, Martins JR, Mendes MC, Namindome A, Klafke GM, Schumaker TT (2010) Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Vet. Parasitol.* 173:300–306. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.036
- Cetin H, Cilek JE, Oz E, Aydin L, Deveci O, Yanikoglu A (2010) Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and gamma-terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 170(3-4):287-90. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.031
- Chagas ACS (2004) Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 13:156-160
- Chagas ACS, Leite RC, Furlong J, Prates HL, Passos WM (2003) Sensibility of *Boophilus microplus* tick to solvents. *Cienc. Rural* 33(1):109-114. doi: 10.1590/S0103-84782003000100017
- Chagas ACS, Oliveira MCS, Giglioti R, Santana RCM, Bizzo HR, Gama PE, Celio F (2016) Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7(3):427-432. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.01.001
- Concepción LR, Froylán VI, Herminia MP, Norberto AM, Héctor SZ, Yeniel GC (2013) In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 61:251-257. doi: 10.1007/s10493-013-9688-4
- Coskun S, Girisgin O, Kurkcuglu M, Malyer H, Girisgin NK, Baser KH. (2008) Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). *Parasitology Research.* 103(2):259-261. doi: 10.1007/s00436-008-0956-x

- Coskun S, Girisgin O, Kurkcuoglu M, Malyer H, Girisgin AO, Kirimer N, Baser KH (2008) Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). Parasitology Research. 103(2): 259-261. doi: 10.1007/s00436-008-0956-x
- Costa-Júnior LM, Miller RJ, Alves PB, Blank AF, Li AY, Pérez De Leon AA. (2016) Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol 228:60-64. doi: doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.028
- Cruz EMO, Costa-Júnior LMC, Pinto JAO, Santos DA, Araujo SA, Rigoni-Blank MF, Bacci L, Alves PB, Cavalcanti SCH, Blank AF (2013) Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol 195:198-202. doi: doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.046
- Dolan M, Jordan RA, Schulze TL, Schulze CJ, Cornell M, Ruffolo D, Schmidt JP, Piesman J, Karchesy J (2009) Ability of two natural products, nootkatone and carvacrol, to suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme disease endemic area of New Jersey. J Econ Entomol 102:2316–2324. doi: 10.1603/029.102.0638
- Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973) *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. Journal of Economic Entomology 66:130-133. doi: 10.1093/jee/66.1.130
- Du WX, Olsen CE, Avena RJ, McHugh TH, Levin CE, Friedman M (2008) Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. J Agric Food Chem 56(9):3082–3088. doi: 10.1021/jf703629s
- El-Wakeil NE. Botanical pesticides and their mode of action (2013) GESUNDE PFLANZEN. 65(4):125-149. doi: 10.1007/s10343-013-0308-3
- Fitsiou E, Anestopoulos I, Chlichlia K, Galanis A, Kourkoutas I, Panayiotidis MI, Pappa A (2016) Antioxidant and antiproliferative properties of the essential oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their major constituents. Anticancer Res. 36(11):5757-5763. doi: 10.21873/anticancer.11159
- Flamini G. Acaricides of natural origin, personal experiences and review of literature (1990-2001) (2003) Studies in Natural Products Chemistry 28:381-451. doi: 10.1016/S1572-5995(03)80146-1

- García-Heredia A, García S, Merino-Mascorro JÁ, Feng P, Heredia N (2016) Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence gens in enteroaggragative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Food Microbiol 59:124-132. doi: 10.1016/j.fm.2016.06.001
- Goskun S, Girisgin O, Kürkcüoglu M, Malyer H, Girisgin AO, Kirimer N, Baser KH (2008) Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). Parasitol Res 103:259–261. doi: 10.1007/s00436-008-0956-x
- Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PH (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 23(2):150-156. doi: 10.1590/S1984-29612014042
- Gross AD, Temeyer KB, Day TA, De León AAP, Kimber MJ, Coats JR (2015) Pharmacological characterization of a tyramine receptor from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 63:47-53. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.04.008
- Gross AD, Temeyer KB, Day TA, Pérez de León AA, Kimber MJ, Coats JR (2017) Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target. Chemico-Biological Interactions 263:1–6. doi: 10.1016/j.cbi.2016.12.009
- Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R (2016) 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. doi: 10.1590/S1984-29612016026
- Houdkova M, Rondevaldova J, Doskocil I, Kokoska L (2017) Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. Fitoterapia 118:56-62. doi: 10.1007/s00436-013-3289-3
- Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokuladhas K, Kamaraj S, Divya MG, Decaki T (2012) Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. Mol Cell Biochem 360(1–2):51–60. doi: 10.1007/s11010-011-1043-7
- Jonjejan F, Uilenberg G (2004) The global importance of ticks. Parasitology 129:S3-S14. doi: 10.1017/S0031182004005967

- Jonsson NN (2006) The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology* 137(1-2):1-10. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.010
- Junqueira VS, Cardoso, FF, Oliveira MM, Sollero BP, Silva FF, Lopes PS (2016) Use of molecular markers to improve relationship information in the genetic evaluation of beef cattle tick resistance under pedigree-based models. *J An Breeding and Genetics* 134(1):14-26. doi: 10.1111/jbg.12239
- Klafke G, Webster A, Agnol BD, Pradel E, Silva J, La Canal LH, Becker M, Osório MF, Mansson M, Barreto R (2016) Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases* 8:7380. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.019
- Klafke GM, Castro-Janer E, Mendes MC, Namindome A, Schumaker TT (2012) Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 184:212–220. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.09.018
- Koc S, Oz E, Cinbilgel I, Aydin L, Cetin H (2013) Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P. H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 193(1-3):316-319. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.010.
- Lage TCA, Montanari RM, Fernandes as, Monteiro CMO, Senra TOS, Zeringota FC, Matos RS, Daemon E (2013) Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* February 112(2):863–869. doi: 10.1007/s00436-012-3209-y
- LeOra Software, 2004. A User's Guide to Probit or Logit Analysis. LeOra Software, Berkeley, CA, USA.
- Lima AS, Sousa Filho JGN, Pereira SG, Guillon GMSP, Santos LS, Costa Júnior LMC (2014) Acaricide activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitology Research*. 113: 107-112. doi: 10.1007/s00436-013-3632-8
- Matos RS, Melo DR, Monteiro CMO, Zeringóta V, Senra TOS, Calmon F, Maturano R, Prata MCA, Daemon E (2014) Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. *Parasitology Research* 113:669-673. doi: 10.1007/s00436-013-3694-7

- McLeod RS (1995) Cost of major parasites to the Australian livestock industries. *International Journal for Parasitology* 25(11):1363-1367. doi: 10.1016/0020-7519(95)00071-9
- Mendes MC, Lima CK, Nogueira AH, Yoshihara E, Chiebao DP, Gabriel FH, Ueno TE, Namindome A, Klafke GM (2001) Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 178(3-4):383–388. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.006
- Ntalli NG, Ferrari F, Giannakou I, Menkissoglu-Spiroudi, U (2011) Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest Management Science* 67:341–351. doi: 10.1002/ps.2070
- Parveen S, Godara R, Katoch R, Yadav A, Verma PK, Matoch M, Singh NK (2014) In vitro evaluation of ethanolic extracts of *Ageratum conyzoides* and *Artemisia absinthium* against cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *The Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2014/858973
- Ramírez C, Ibarra F, Pérez HI, Manjarrez N, Salgado HJ, Ortega L (2016) Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasit Epidemiology and Control*. 1:72-77. doi: 10.1016/j.parepi.2016.02.006
- Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Agnol B, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Vargas R, dos Santos JS, Martins JR (2014) First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201:128–136. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.01.012
- Roma GC, Oliveira PR, Pizano MA, Camargo MMI (2009) Determination of LC50 of permethrinacaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Exp Parasitol.* 123(3):269-272. doi: 10.1016/j.exppara.2009.08.001.
- Senra TO, Clamon F, Zeringóta V, Monteiro CM, Maturano R, Matos RS, Gomes GA, Carvalho MG, Daemon E (2013) Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 112:3471-3476. doi: 10.1007/s00436-013-3527-8
- Velazquez MM, Cruz RR, Herrera GC, Fernandez JMF, Alvarez AH, Cervantes, EL (2011) Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis*

(Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology. 48(4):822-827. doi: 10.1603/ME10140