

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

Potencial dos óleos essenciais de *Eremanthus erythropappus* e *Cinnamomum zeylanicum* e compostos isolados α -bisabolol e (*E*)-cinamaldeído para o controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Paula Barroso Cruz Marchesini

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**POTENCIAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eremanthus erythropappus* E
Cinnamomum zeylanicum E COMPOSTOS ISOLADOS α -BISABOLOL E
(*E*)-CINAMALDEÍDO PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus*
(ACARI: Ixodidae)**

PAULA BARROSO CRUZ MARCHESINI

Sob orientação da professora
Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt
e coorientação dos professores
Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro
Dra. Isabele da Costa Angelo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Seropédica, RJ

2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M316p Marchesini, Paula Barroso Cruz, 1987-
Potencial dos óleos essenciais de *Eremanthus erythropappus* e *Cinnamomum zeylanicum* e compostos isolados α -bisabolol e (E)-cinamaldeído para o controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) / Paula Barroso Cruz Marchesini. - Seropédica, 2020.
138 f.: il.

Orientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.
Coorientador: Caio Márcio de Oliveira Monteiro.
Coorientadora: Isabele da Costa Angelo.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2020.

1. Carrapato dos bovinos. 2. Carrapaticidas botânicos. 3. Sesquiterpeno. 4. Fenilpropanoíde. 5. Metabolismo energético. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959-, orient. II. Monteiro, Caio Márcio de Oliveira, 1982-, coorient. III. Angelo, Isabele da Costa, 1981-, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. V. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**



ATA Nº 2895 / 2020 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.053962/2020-46

Seropédica-RJ, 16 de outubro de 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
PAULA BARROSO CRUZ MARCHESINI**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 30/09/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 20/10/2020 11:00)

**WELBER DANIEL ZANETTI LOPES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 218.872.758-43**

(Assinado digitalmente em 20/10/2020 11:00)

**CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 058.965.206-03**

(Assinado digitalmente em 19/10/2020 07:58)

**JOSÉ RECK
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 998.883.860-34**

(Assinado digitalmente em 19/10/2020 07:24)

**RODRIGO LUIZ FABRI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 052.200.386-99**

(Assinado digitalmente em 16/10/2020 11:11)

**MARIANA GUEDES CAMARGO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 072.326.816-90**

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **2895**, ano: **2020**, tipo: **ATA**, data de emissão: **16/10/2020** e o código de verificação: **364d498641**

Dedicatória:

Dedico essa dissertação a minha família, ao Roberto, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo.

“Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar;
porque descobri, no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre guiar os meus passos e me permitir finalizar mais uma etapa;

A Prof. Dra. *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por me acolher em sua equipe. Por todas as oportunidades oferecidas e da grande confiança depositada. Sou-lhe eternamente grata;

Ao Prof. Dr. *Caio Márcio de Oliveira Monteiro*, em especial, por ter me apoiado em toda a trajetória da pós-graduação. Pelo incentivo diário, parceria, confiança e amizade que foram características fundamentais para o desenvolvimento pleno das atividades acadêmicas e superação de seus entraves, de produção e de prática, em um momento no qual a pesquisa científica é deixada de lado no Brasil. Um exemplo a ser seguido, pessoal e profissionalmente.

A prof. Dra. *Isabele Angelo*, pela doçura de co-orientação e referencial de profissional. Por acreditar na minha capacidade e me auxiliar em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. *Erik Daemon*, in memoriam, por todo ensinamento de vida. Pela grande inspiração, como pesquisador e profissional. Por me ensinar a levar a vida com leveza. Saudade sempre;

Ao Prof. Dr. *Ralph Maturano*, pela serenidade diante dos percalços impostos, por ter sido a base que o laboratório precisava. Por toda a ajuda na confecção desta tese, desde ceder o espaço do estudo à elaboração dos trabalhos;

Aos amigos do Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP), *Renata da Silva Matos, Mariana Oliveira, Viviane Zeringóta, Lívia Senra, Rafael Nascimento, Diego Melo, Tatiane Novato, Tatiane Senra, Bianca Silva Carvalho, Natália Muniz* por todos os momentos de convivência, aprendizado e descontração;

Aos amigos do Laboratório de Controle Microbiano, *Mariana Camargo, Jéssica Fiorotti, Ricardo Bittencourt, Caio Rodrigues, Allan Felipe, Thaís Almeida, Laura Meirelles, Adriani Carneiro, Emilly Mesquita* pela convivência e ensinamentos recebidos.

A Dra. *Márcia Cristina de Azevedo Prata* e ao Dr. *John Furlong* por serem essas pessoas incríveis, sempre dispostos a ajudar e ensinar. Todas as vezes que precisei, vocês me estenderam a mão, com tanto carinho, ótimos conselhos, que sempre levarei um pouquinho de vocês comigo;

A Prof. Dra. *Simone Jaqueline Cardoso* por toda a ajuda desprendida nas análises estatísticas do “temível” software R. Por sempre me receber com um cafezinho, me fazendo acreditar que tudo daria certo;

Ao Prof. Dr. *Mário Geraldo de Carvalho* e ao Prof. Dr. *Geovany Amorim Gomes* pela parceria. Por permitirem a utilização dos compostos químicos para realização de alguns bioensaios apresentados neste trabalho e por sempre estarem disponíveis para quaisquer esclarecimentos pertinentes;

Ao Prof. Dr. *Rodrigo Luiz Fabri* e seu aluno de doutorado *Ari Sergio* pela parceria, paciência e dedicação na elaboração de um dos capítulos deste estudo;

Ao Prof. Dr. *Itabajara da Silva Vaz-Jr* por ceder a cepa POA utilizada no segundo capítulo dessa tese;

Ao funcionário da Pós-Graduação, *Arthur*, por toda a paciência e auxílio burocrático;

Aos meus pais, *Maria Teresa Barroso Cruz* e *João Batista da Cruz*, por seu amor incondicional, por me apoiarem em todas as minhas decisões, por acreditarem nos meus sonhos e torcerem pelo meu sucesso;

Ao meu gêmeo, *Victor Barroso Cruz*, pela parceria de todas as horas, por me entender só com o olhar, pelo nosso dialeto próprio e pelas inúmeras taças de vinho. Você é a minha melhor versão;

Ao meu marido *Roberto de Oliveira Marchesini*, por todo amor, motivação, inspiração e paciência. Por me apoiar em todos os meus surtos, incentivando-me sempre a buscar ser uma pessoa e profissional melhor;

Aos meus amigos, que compreenderam minha ausência e nunca me abandonaram;

Ao CNPQ pela bolsa concedida;

Aos membros presentes na banca de qualificação e defesa, pela consideração e por suas contribuições visando o aprimoramento deste estudo;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Paula Barroso Cruz Marchesini, filha de Maria Teresa Barroso Cruz e João Batista da Cruz, nasceu no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 28 de dezembro de 1987.

Em 2007, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. No ano de 2010 foi estagiária da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, PESAGRO/RIO. Entre de 2011 e 2012 foi monitora das disciplinas Alimentação e Nutrição de Ruminantes, Alimentação de Aves e Suínos, Alimentação de Coelhos e Equinos, na área de Nutrição Animal Aplicada, do Departamento de Nutrição Animal e Pastagens do Instituto de Zootecnia. Ainda no ano 2012, foi estagiária de apoio técnico a partir de uma parceria da Embrapa Agrobiologia, Pesagro-RJ e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no setor de Bovinocultura leiteira orgânica da Fazendinha Agroecológica Km 47.

No ano de 2012, terminou a graduação e foi selecionada para trabalhar na empresa Êxito Rural Consultoria em Pecuária LTDA, Araçatuba, São Paulo, e no início de 2014 foi promovida e transferida para a empresa Êxito Rural Nutrição de Ruminantes LTDA, Araçatuba, São Paulo. Do final de 2014 até março de 2015, foi bolsista de apoio técnico da Embrapa Gado de Leite, na área de comportamento de bovinos, Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em 2015, foi aprovada no processo de seleção de mestrado do programa de pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro e co-orientação do Prof. Dr. Erik Daemon. O mestrado foi concluído em julho de 2016, com a dissertação intitulada: Atividade acaricida do extrato metanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae) e espilantol sobre *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae).

Em agosto de 2016, iniciou o doutorado no curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

Durante o período de mestrado e doutorado, publicou sete artigos referentes ao tema da Tese:

7. **MARCHESINI, P.**; NOVATO, T.P.; CARDOSO, S.J.; PRATA, M.C.A.; NASCIMENTO, R.M.; KLAFKE, G.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; MATURANO, R.; LOPES, W.D.Z.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; MONTEIRO, C.M.O. Acaricidal activity of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol on populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) with different resistance profiles. *Veterinary Parasitology*, v. XX, p. XX, 2020. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109226

6. **MARCHESINI, P.**; BARBOSA, A.F.; SANCHES, M.N.G.; NASCIMENTO, R.M.; VALE, F.L.; FABRI, R.L.; MATURANO, R.; CARVALHO, M.G.; MONTEIRO, C.M.O. Acaricidal activity of *Acmella oleracea* (Asteraceae) extract against *Rhipicephalus microplus*: What is the influence of spilanthol?. *Veterinary Parasitology*, v. 283, p. 109170, 2020.

5. NOVATO, T.L.P.; **MARCHESINI, P.**; MUNIZ, N.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; VILELA, F.M.P.; DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. *Experimental Parasitology*, v. 207, p. 107774, 2019.

4. MATOS, R.S.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; SAMPIERI, B.R.; **MARCHESINI, P.B.C.**; DELMONTE, C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol action on cells and tissues

of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). Ticks and Tick-borne Diseases, v. 10 (2), p. 314-320, 2018.

3. **MARCHESINI, P**; BARBOSA, A. F.; FRANCO, C.; NOVATO, T.; SANCHES, M.N.G.; DE CARVALHO, M.G.; FABRI, R.L.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O. Activity of the extract of *Acmella oleracea* on immature stages of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology, v. 254, p. 147-150, 2018.

2. DELMONTE, C.; **CRUZ, P.B.**; ZERINGÓTA, V.; DE MELLO, V.; FERREIRA, F.; AMARAL, M.P.H.; DAEMON, E. Evaluation of the acaricidal activity of thymol incorporated in two formulations for topical use against immature stages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Parasitology Research, v. 116, n. 11, p. 2957-2964, 2017.

1. **CRUZ, P.B.**; BARBOSA, A.F.; ZERINGÓTA, V.; MELO, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q.C.; FABRI, R.L.; DE CARVALHO, M.G.; OLIVEIRA, S., ARMANDO U.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology, v. 228, p. 137-143, 2016.

RESUMO

MARCHESINI, Paula Barroso Cruz. **Potencial dos óleos essenciais de *Eremanthus erythropappus* e *Cinnamomum zeylanicum* e compostos isolados α -bisabolol e (*E*)-cinamaldeído para o controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** 2020. 155p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Compostos de origem vegetal têm sido apontados como promissores no controle de carrapatos. Dessa forma, foi realizado um estudo de caracterização fitoquímica dos óleos essenciais (OEs) da casca de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e do caule de *Eremanthus erythropappus* (candeia) e avaliação da atividade carrapaticida desses OEs e dos compostos majoritários sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Além disso, também foi avaliado a atividade carrapaticida de um composto acetilado, produzido a partir do (*E*)-cinamaldeído, que foi o composto predominante no OE de canela. Os bioensaios com as larvas não alimentadas foram realizados através do teste de pacote de larvas nas concentrações de 0,31 a 10,0 mg/mL. Para os OEs de canela, candeia, e para as substâncias isoladas, (*E*)-cinamaldeído, α -bisabolol e acetato de cinamila, foram observadas mortalidade superior a 90% a partir das concentrações de 2,0; 2,0; 2,5; 5,0; 5,0 mg/mL, respectivamente. Para fêmeas ingurgitadas foi realizado o teste de imersão nas concentrações de 2,5 a 60,0 mg/mL, sendo observado que apenas o acetato de cinamila apresentou baixa atividade. Um percentual de controle acima de 95% foi observado para os OEs de canela e candeia, e para as substâncias (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, nas concentrações de 20,0; 60,0; 20,0 e 20,0 mg/mL respectivamente. Com base nesses resultados, foi investigado a atividade do (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol sobre cinquenta e uma populações de *R. microplus*, com diferentes perfis de resistência a diferentes carrapaticidas comerciais. Para caracterização de resistência, foram utilizados os carrapaticidas a base de deltametrina (Piretroide – Butox®), amitraz (Amidínico – Triatox®) e clorfenvinfós (Organofosforado – Supokill®) em sua concentração comercial no teste de imersão de fêmeas. Já para o cálculo da CL₅₀ das larvas tratadas com os compostos puros, foi realizado o teste de pacote de larvas nas concentrações de 0,31 a 10,0 mg/mL. Nessa etapa também foram realizados testes com a cepa Porto Alegre (POA), uma cepa sensível para referência do cálculo da Razão de Resistência (RR). Com base nos resultados gerados, não foi possível inferir uma correlação entre a eficiência dos carrapaticidas e os valores de CL₅₀ dos compostos puros testados, não sendo observado, dessa forma, resistência cruzada, indicando que os diferentes resultados encontrados podem estar relacionados com variações fenotípicas existentes entre as populações. Por fim, foi avaliado o perfil lipídico do corpo gorduroso e ovos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostas a concentração de 10,0 mg/mL do (*E*)-cinamaldeído e do α -bisabolol. Para caracterização do perfil de lipídios, foram aplicadas as técnicas de cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa. Além disso, foi realizado um estudo *in silico* com o intuito de se conhecer os possíveis alvos moleculares desses compostos vegetais. Os resultados demonstraram alterações no perfil de lipídios presentes no corpo gorduroso e ovos de fêmeas tratadas com (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, evidenciando um possível mecanismo de ação desses compostos.

Palavras – chave: Carrapato dos bovinos, carrapaticidas botânicos, sesquiterpeno, fenilpropanoíde, metabolismo energético.

ABSTRACT

MARCHESINI, Paula Barroso Cruz. **Potential of the essential oils of *Eremanthus erythropappus* and *Cinnamomum zeylanicum* and compounds isolated α -bisabolol and (*E*)-cinnamaldehyde for the control of the *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** 2020. 155p. Thesis (Doctorate in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Compounds of plant origin have been identified as promising in the control of ticks. Thus, a study was carried out on the phytochemical characterization of essential oils (EOs) of the bark of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) and of the stem of *Eremanthus erythropappus* (candeia) and evaluation of the tick activity of these OEs and the major compounds on engorged larvae and females of *Rhipicephalus microplus*. In addition, the tick activity of an acetylated compound, produced from (*E*)-cinnamaldehyde, which was the predominant compound in cinnamon OE, was also evaluated. The bioassays with the non-fed larvae were performed using the larval pack test at concentrations from 0.31 to 10.0 mg / mL. For the EOs of cinnamon, candeia, and for the isolated substances, (*E*)-cinnamaldehyde, α -bisabolol and cinamyl acetate, mortality of over 90% was observed from the concentrations of 2.0; 2.0; 2.5; 5.0; 5.0 mg / ml, respectively. For engorged females, the immersion test was performed at concentrations of 2.5 to 60.0 mg / mL, and it was observed that only cinamyl acetate showed low activity. A control percentage above 95% was observed for cinnamon and cinnamon EOs, and for substances (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol, at concentrations of 20.0; 60.0; 20.0 and 20.0 mg / mL respectively. Based on these results, the activity of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol was investigated on fifty-one populations of *R. microplus*, with different profiles of resistance to different commercial ticks. For the characterization of resistance, carrapaticides based on deltamethrin (Pyrethroid - Butox®), amitraz (Amidine - Triatox®) and chlorfenvinphos (Organophosphate - Supokill®) were used in their commercial concentration in the female immersion test. For the calculation of the LC₅₀ of the larvae translated with the pure compounds, the larval pack test was performed at concentrations from 0.31 to 10.0 mg / mL. In this stage, tests were also performed with the Porto Alegre strain (POA), a sensitive strain for reference in the calculation of the Resistance Ratio (RR). Based on the results generated, it was not possible to infer a correlation between the efficiency of ticks and the LC₅₀ values of the pure compounds tested, thus not observing cross resistance, indicating that the different results found may be related to existing phenotypic variations between populations. Finally, the lipid profile of the fatty body and eggs of *R. microplus* engorged females exposed to a concentration of 10.0 mg / mL of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol were evaluated. To characterize the lipid profile, the techniques of thin layer chromatography and gas chromatography coupled to a mass spectrometer were applied. In addition, an *in silico* study was carried out in order to know the possible molecular targets of these plant compounds. The results demonstrated changes in the profile of lipids present in the fatty body and eggs of females treated with (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol, showing a possible mechanism of action of these compounds.

Keywords: Cattle tick, botanical acaricide, sesquiterpene, phenylpropanoid, energy metabolism.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** – Composição química, índice de retenção calculado (IRC), índice de retenção obtido da literatura (IRLIT) (ADAMS, 2007), percentagens dos componentes identificados e das classes (%) no óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum* e do caule de *Eremanthus erythropappus*..... 50
- Tabela 2** – Mortalidade média de larvas não alimentadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e α -bisabolol em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$) (Média \pm desvio padrão)..... 52
- Tabela 3** – Concentração letal (CL_{50}) de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e α -bisabolol sobre larvas não alimentadas de *Rhipicephalus microplus*..... 52
- Tabela 4** – Valores referente a média do peso das fêmeas antes da postura (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas e percentuais de eclosão larval e controle de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes concentrações de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e α -bisabolol, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$) (Média \pm desvio padrão)... 54
- Tabela 5** – Concentração letal (CL_{50}) de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e α -bisabolol sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*..... 55

CAPÍTULO II

- Tabela 1** – Eficácia de diferentes carrapaticidas (%) e valores de concentração letal 50% (CL_{50}) do (*E*)-cinamaldeído (mg/mL) em populações de *Rhipicephalus microplus*. Estudo conduzindo em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80 \pm 10\%$)..... 73
- Tabela 2** – Eficácia de diferentes carrapaticidas (%) e valores de concentração letal 50% (CL_{50}) do α -bisabolol (mg/mL) em populações de *Rhipicephalus microplus*. Estudo conduzindo em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80 \pm 10\%$)..... 75

CAPÍTULO III

- Tabela 1** – Substâncias ou classes de substâncias encontradas na análise de cromatografia gasosa do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL, após 72h e 120h de tratamento..... 96
- Tabela 2** – Substâncias ou classes de substâncias encontradas na análise de cromatografia gasosa do quinto dia de postura de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL..... 97
- Tabela 3** – Alvos farmacodinâmicos do (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol, selecionados a partir de análise na plataforma *PASS online*..... 98

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	04
Figura 2 – Exemplos de fenilpropanóides descritos com atividades sobre carrapatos.....	09
Figura 3 – Exemplos de sesquiterpenos descritos com atividades sobre carrapatos.....	11
Figura 4 – Representação esquemática das células do corpo gorduroso de fêmeas semi ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> sensu lato. trR = trofócito tipo R; trC = trofócito tipo C; n = núcleo.....	16

CAPÍTULO I

Figura 1 – Estrutura química do (<i>E</i>)-cinamaldeído (A), álcool cinamílico (B) e acetato de cinamila (C).....	46
Figura 2 – Figura 2 - Espectro de RMN 1H e RMN 13C para confirmação do acetato de cinamila.....	51

CAPÍTULO II

Figura 1 – Distribuição geográfica das populações de <i>Rhipicephalus microplus</i> utilizadas nos testes com (<i>E</i>)-cinamaldeído (populações de 1 a 25) e α -bisabolol (populações de 26 a 50).....	70
--	----

CAPÍTULO III

Figura 1 – Média quantitativa ($\mu\text{g}/\text{corpo}$ gorduroso) dos lipídios neutros triacilglicerol (TG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO) presentes no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao (<i>E</i>)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). Valores obtidos a partir da análise densitométrica.....	91
Figura 2 – Concentração ($\mu\text{g}/\text{corpo}$ gorduroso) de triacilglicerol (TG), ácido graxo (AG) e colesterol livre (CHO), presentes no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao (<i>E</i>)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste Kruskal wallis seguido do Student Newman Keulls.....	92
Figura 3 – Cromatograma dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao (<i>E</i>)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada lane na imagem representa um grupo experimental: 1 - controle água; 2 - controle solvente; 3 - α -bisabolol; 4 - (<i>E</i>)-cinamaldeído. P - amostras padrão: 2; 4; 6; 8; 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -1). Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO). Cada grupo continha 50 mg de ovo no momento da extração de lipídios.....	93

Figura 4 – Concentração (μg) de colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TG), ácido graxo (AG) e colesterol livre (CHO), presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, expostas ao (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste Kruskal wallis seguido do Student Newman Keulls

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	03
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO I	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1 Origem das substâncias.....	46
2.2 Análises químicas dos óleos essenciais.....	47
2.3 Preparação do derivado acetilado.....	47
2.4 Confirmação do produto acetilado.....	47
2.5 Origem dos carrapatos.....	48
2.6 Teste de pacote de larvas.....	48
2.7 Teste de imersão de adultos.....	48
2.8 Análise estatística.....	49
3. RESULTADOS.....	49
3.1 Composição química.....	49
3.2 Confirmação da acetilação.....	50
3.3 Teste pacote de larvas.....	51
3.4 Teste de imersão de adultos.....	53
4. DISCUSSÃO.....	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
CAPÍTULO II	66
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	70

2.1 Carrapatos.....	70
2.2 Teste de imersão de adultas (TIA) com os carrapaticidas.....	71
2.3 Teste de pacote de larvas (TPL) com (<i>E</i>)-cinamaldeído e α -bisabolol.....	71
2.4 Análise estatística.....	72
3. RESULTADOS.....	72
3.1 Eficácia dos carrapaticidas e (<i>E</i>)-cinamaldeído (populações 1-25).....	72
3.2 Eficácia dos carrapaticidas e α -bisabolol (populações 26-50)	74
4. DISCUSSÃO.....	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
CAPÍTULO III	83
RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	85
1. INTRODUÇÃO.....	86
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
2.1 Local de realização do estudo.....	87
2.2 Origem e diluição das substâncias.....	87
2.3 Obtenção dos carrapatos.....	87
2.4 Exposição das fêmeas ingurgitadas ao (<i>E</i>)-cinamaldeído e o α -bisabolol.....	87
2.5 Dissecção e extração dos lipídios do corpo gorduroso.....	88
2.6 Extração dos lipídico dos ovos.....	88
2.7 Análises dos lipídios por cromatografia em camada delgada.....	88
2.7.1 Análise Estatística.....	89
2.8 Análises dos lipídios por cromatografia gasosa.....	89
2.9 Estudo <i>in silico</i>	89
3. RESULTADOS.....	90
3.1 Análise dos lipídios por cromatografia em camada delgada.....	90
3.2 Análise dos lipídios por cromatografia gasosa.....	94
3.3 Estudo <i>in silico</i>	97
4. DISCUSSÃO.....	100
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
CONCLUSÕES GERAIS	110

CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
ANEXO	112
Anexo A. Obtenção de amostras de carrapatos enviadas para realização de testes de biocarrapaticidograma na Embrapa Gado de Leite.....	113
Anexo B. Manutenção das colônias de <i>Rhipicephalus microplus</i>	114
Anexo C. Protocolo de aprovação do comitê de ética permitindo manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i> por meio de infestações artificiais em bezerros.....	115
Anexo D. Fórmulas utilizadas para cálculo de eficácia dos tratamentos.....	116
Anexo E. Artigo referente ao capítulo I submetido na Veterinary Parasitology.....	117
Anexo F. Artigo referente ao capítulo II publicado na Veterinary Parasitology.....	118

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios, pertencentes à subclasse Acari, superordem Parasitiformes e ordem Ixodida. Já foram descritas 956 espécies de carrapatos, divididos entre as famílias Ixodidae (736 espécies), Argasidae (218 espécies), Nuttallielidae (1 espécie) e Deinocrotonidae (1 espécie já extinta) (APANASKEVICH et al., 2019; DANTAS-TORRES et al., 2019; SUN et al., 2019; TOMLINSON; VENZAL et al., 2019). Estudos referentes à evolução desses parasitos são controversos, havendo relatos de que eles tenham evoluído a partir do parasitismo em anfíbios na Gondwana (cerca de 390 milhões de anos) (BARKER; MURRELL, 2008), e relatos dos quais a origem seria na metade do período cretáceo em anfíbios ou répteis (NAVA et al. 2009).

Esses ectoparasitos são caracterizados por parasitar mamíferos, aves, répteis e anfíbios, sendo responsável por transmitir diferentes patógenos como fungos, vírus, bactérias, protozoários e até mesmo nematoides (SONENSHINE; ROE, 2013; YU et al., 2015). Além de atuarem como vetores de diversas doenças (zoonoses), a picada de carrapatos também pode levar a severas reações alérgicas e tóxicas e causar, ainda, morte do animal através de sintomas de paralisia. Mesmo com o avanço tecnológico, biológico e medicinal no controle de doenças transmitidas por vetores, como malária, dengue e febre amarela, a ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos, como a doença de Lyme e Febre Maculosa, perduram e até mesmo aumentaram nos últimos anos (SONENSHINE; ROE, 2013). Outro fator decorrente da infestação de carrapatos é o sucesso produtivo na criação de bovinos, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, no qual a infestação por *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), impacta diretamente na economia, com redução na produção de leite e depreciação de pele e couro em até 30% (DE LA FUENTE; KOCAN, 2006; GHOSH et al., 2007). Dessa forma, o sucesso no controle efetivo desses carrapatos é essencial para redução das perdas econômicas e prevenção contra doenças (BENELLI et al., 2016).

Diferentes ferramentas têm sido abordadas com o intuito de promover o controle de carrapatos, como desenvolvimento de vacinas (DÍAZ-MARTÍN et al., 2015), utilização de feromônios (SONENSHINE, 2006), uso de substâncias de origem vegetal (BENELLI et al., 2016) e controle biológico (MONTEIRO et al., 2019; MENDONÇA et al., 2019). No entanto, o método predominantemente utilizado é o uso de carrapaticidas sintéticos (FURLONG et al., 2007; HIGA et al., 2019), que tem sido fundamental para controle desses artrópodes, mas que o uso constante, às vezes sem critérios técnicos, tem resultado na seleção de populações resistentes. Além disso, o uso recorrente desses produtos tem gerado preocupações devido a possíveis efeitos tóxicos para organismos não-alvo, resíduos em produtos de origem animal e contaminação do ambiente (FURLONG et al., 2007; RECK et al., 2014; HIGA et al., 2015; KLAFKE et al., 2017; RAVINDRAN et al., 2018). Nesse sentido, é fundamental o desenvolvimento de novas alternativas de controle que minimizem esses efeitos. Alguns estudos têm apontado que os métodos alternativos, existentes até o momento, não seriam capazes de promover a eliminação do uso de pesticidas sintéticos, no entanto, quando associados com estratégias do manejo integrado de pragas (MIP), haveria uma considerável redução no uso de químicos, suprimindo, dessa forma, os efeitos prejudiciais dos carrapaticidas sintéticos (GURR; KVEDARAS, 2010; KISS et al., 2012).

De acordo com El-Wakeil (2013), o termo “controle alternativo” destina-se a produtos de origem natural utilizados no controle de artrópodes-praga em detrimento ao uso de pesticidas comerciais, sendo a aplicação de produtos vegetais uma destas alternativas. Já existem formulações comerciais à base de compostos vegetais disponíveis no mercado como MyggA® Natural (*Corymbia citriodora* Hook.), Citriodiol® (para-mentano-3,8-diol), NeemAzal F® (neem), Colosso® (químicos sintéticos + citronelal), Cyperclor Plus®

(químicos sintéticos + citrônella), EcoSMART (óleo de alecrim + óleo de folha de canela + óleo de capim-limão + geraniol), EcoTrol (óleo de alecrim + óleo de hortelã-pimenta) e Essentria IC³® (óleo de alecrim, geraniol e óleo de hortelã-pimenta). Nessa perspectiva, a descoberta de novas moléculas oriundas de plantas, com potencial acaricida, tem sido alvo de diversos estudos (ADENUBI et al., 2016, 2018a, b; BENELLI et al., 2016; PAVELA et al., 2016; ROSADO-AGUILAR et al., 2017; BENELLI; PAVELA 2018).

Os óleos essenciais da casca de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e do caule de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (candeia) são compostos vegetais que já tiveram sua atividade biológica evidenciada para alguns organismos (TEIXEIRA et al., 2015; JYOTI et al., 2019) e apresentam como componentes majoritários o (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, respectivamente que, por sua vez, tiveram atividade acaricida comprovada para o carrapato dos bovinos *R. microplus*. Em adicional, de acordo com alguns autores, as atividades biológicas de compostos botânicos podem ser potencializadas através de modificações estruturais (alterações dos grupos funcionais), sendo interessante o estudo com os seus derivados (KUMBHAR; DEWANG, 2001; MOSSA, 2016).

O mecanismo de ação de compostos vegetais ainda é incerto. Dessa forma, compreender como eles atuam no metabolismo intermediário, em especial no metabolismo energético, dos carrapatos é fundamental, uma vez que esse metabolismo está diretamente ligado a inúmeras reações orgânicas. Durante o desenvolvimento do carrapato, embriogênese à fase adulta, há a mobilização de diferentes vias metabólicas e substratos para atender suas exigências energéticas (CAMPOS et al., 2006; SEIXAS et al., 2012). Essas informações podem vir a contribuir para o estabelecimento de novas estratégias de controle, com novos alvos metabólicos, de forma a tornar o controle mais sustentável e racional, reduzindo o processo de resistência (GAUDÊNCIO, 2016).

Diante desse quadro, a presente proposta tem como objetivo avaliar e comparar a atividade acaricida dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *E. erythropappus*, dos seus constituintes majoritários, α -bisabolol e (*E*)-cinamaldeído, e derivado acetilado desse último (acetato de cinamila), sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como verificar o efeito desses compostos puros em diferentes populações deste ixodídeo, com diferentes perfis de susceptibilidade à acaricidas comerciais, e, por fim, investigar sua ação sobre o perfil lipídico do corpo gorduroso e ovos de fêmeas ingurgitadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) é uma espécie de carrapato pertencente ao Filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, superfamília Ixodoidea, família Ixodidae, cujo status taxonômico sofreu algumas mudanças, desde sua descrição. Descrito originalmente como *Haemaphysalis micropla*, por Canestrini, em 1888, a espécie foi reclassificada no gênero *Boophilus* por Curtice (1891), recebendo a denominação de *Boophilus microplus*. Durante o século passado, uma série de reclassificações foram feitas, contudo, o nome *B. microplus* acabou retornando como a proposta válida e foi mantido até o início do século XXI, quando, a partir de pesquisas realizadas com ferramentas de biologia molecular, associadas aos conhecimentos de filogenia, pesquisadores reclassificaram o gênero *Boophilus* como subgênero de *Rhipicephalus*, proposta que foi aceita pela comunidade científica e se mantém como válida atualmente, alterando o nome da espécie para *R. microplus* (MURREL; BARKER, 2003; PEREIRA, 2008; LABRUNA et al., 2009).

R. microplus é originário do continente asiático, sobretudo, Índia e ilha de Java (NUÑES et al., 1982), e co-evoluiu junto com as raças zebuínas, sendo disseminando para outros continentes graças às extensas migrações de bovinos, oriundas do mercado de exportação, ocorridas entre os séculos XVII e XIX (BARRE; UILENBERG, 2010; ESTRADA-PENA et al., 2006). De acordo com Gonzales (1995), a sua introdução no Brasil ocorreu no início do século XVIII, por meio da compra de animais provenientes do Chile, realizada pelo estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, *R. microplus* apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes países nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É conhecido por ter os bovinos como hospedeiros preferenciais, mas, em áreas muito infestadas, também pode parasitar outros animais como caprinos, ovinos, cervídeos e equinos (PEREIRA, 2008; MATIAS et al., 2013).

O ciclo biológico de *R. microplus* é monoxeno, no qual larvas, ninfas e adultos se desenvolvem em apenas um hospedeiro, e possui duas fases: uma fase de vida no ambiente, denominada fase não parasitária; e uma fase de vida sobre o animal, denominada como fase parasitária. No ambiente, durante a fase não parasitária, as larvas podem sobreviver sem se alimentar, por um período de cerca de 3 a 4 meses, mas esse tempo vai variar de acordo com as condições ambientais. Nessa fase, as larvas apresentam o comportamento de se aglomerarem nas regiões superiores das gramíneas, apresentando geotropismo negativo, e ficam mais ativas com presença de dióxido de carbono, odores característicos, alterações de luz e vibrações: fatores que favorecem o seu encontro com o hospedeiro (SONENSHINE; ROE, 2013; ZERINGÓTA et al., 2019). Iniciando a fase parasitária, as larvas se fixam nos bovinos e começam a se alimentar de fluidos linfáticos e exsudatos celulares. Depois do sexto dia de fixação, passam pelo processo de muda, dando origem às ninfas. Após a muda, as ninfas irão buscar um novo sítio de fixação, iniciando o processo de alimentação por hematofagia durante cerca de seis dias e, na sequência, também passam pelo processo de muda dando origem aos adultos (escudo completo nos machos e incompleto nas fêmeas) (SUTHERST et al., 1978), que apresentam dimorfismo sexual. As fêmeas fecundadas começam o processo de ingurgitamento rápido, período correspondente, aproximadamente, ao vigésimo primeiro dia de alimentação. A duração da fase parasitária (início e término do repasto sanguíneo) compreende, em média, o período de três semanas. Quando totalmente

ingurgitada, a fêmea nominada teleógina, desprende-se do bovino e inicia a fase de vida não parasitária, onde, no solo, procura um local protegido dos raios solares e alto nível de umidade para realização da postura. O processo de oviposição dura em torno de quatorze dias e a eclosão das larvas se inicia, aproximadamente, após o sétimo dia do término da postura em condições ótimas (27°C e umidade >80%) (SUTHERST et al., 1978; GUGLIELMONE et al., 2006; SONENSHINE; ROE, 2013) (Figura 1).

A preocupação a respeito do impacto econômico de *R. microplus* é de âmbito global. Estimativas do fim do século passado, apontavam que mais de 75% da população bovina era acometida por essa parasitose (CORDOVÉS, 1997) e, no cenário atual, acredita-se que perdas anuais podem chegar a 30 bilhões de dólares no mundo (LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016) e 3,4 bilhões de dólares / ano somente no Brasil (GRISI et al., 2014). Essas perdas estão relacionadas a danos diretos devido a espoliação sanguínea, predisposição a instalação de miíases, desvalorização do couro, estresse, diminuição na ingestão de alimentos, perda de ganho de peso e diminuição na produção de leite. De acordo com Jonsson et al. (1998; 2001), cada fêmea ingurgitada resulta em perda de $8,9 \pm 2,1$ mL de leite e $1,0 \pm 0,38$ g de peso vivo, o que corresponde a 0,081 MJ de perda de energia metabolizável. Além disso, existem as perdas indiretas provocadas pelo parasitismo, que estão relacionadas ao fato desse carrapato atuar como vetor dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e da bactéria *Anaplasma marginale*, agentes etiológicos da babesiose e anaplasmose bovina, doenças agrupadas no complexo denominado Tristeza Parasitária Bovina, e que pode acarretar a morte do animal, devido a ocorrência de anemia hemolítica, taquipnéia, inapetência, icterícia, febre e apatia (LABRUNA; MACHADO, 2006; FURLONG et al., 2007; PEREIRA, 2008; MATIAS et al., 2013; TABOR, et al., 2017).

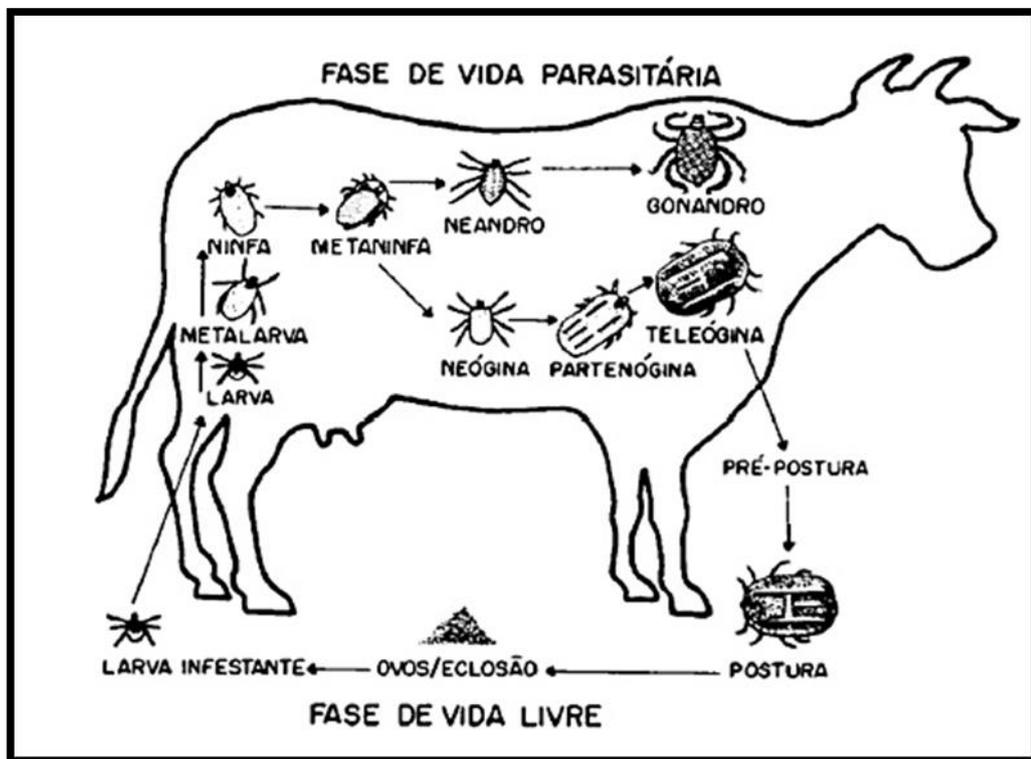


Figura 1 - Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus* (Fonte: GONZALES, 1975).

2.2. Controle de carrapatos: carrapaticidas comerciais e resistência

O uso de carrapaticidas sintéticos, com ativos de diferentes classes químicas, é a ferramenta mais utilizada no controle de *R. microplus*. Esses carrapaticidas podem ser de contato (pulverização, imersão, *pour on*) ou sistêmico (injetáveis ou *pour on*). Entretanto, sua utilização em ampla escala, às vezes sem critério, tem levado a uma redução da eficácia desses produtos, o que, atrelado ao ciclo de vida curto e elevadas taxas de reprodução, acarreta na seleção de populações resistentes (FURLONG, 2005; ABBAS et al. 2014; GUERRERO et al. 2014). Diversas formulações comerciais têm caído em desuso nas últimas décadas, justamente por esse processo de desenvolvimento de resistência por parte do carrapato aos principais grupos químicos disponíveis no mercado (WILLADSEN, 2004; ABBAS et al. 2014). Desde a década passada, estudos vem evidenciado que a maior parte dos carrapaticidas disponíveis no mercado brasileiro possuem baixa eficácia devido ao fenômeno de resistência (FURLONG et al., 2007).

Atualmente, há relatos de populações, de diferentes regiões do Brasil, que apresentam fenótipo de resistência às diferentes classes químicas, como piretroides, amidínicos, organofosforados, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas e benzofenilureas (FURLONG et al., 2007; RECK et al., 2014; HIGA et al., 2015; KLAFKE et al., 2017). Recentemente, registro de populações resistentes a todas as classes químicas e o aumento de registro de cepas multirresistentes deixam esse cenário mais preocupante (RECK et al., 2014; KLAFKE et al., 2017).

Devido a esse quadro de resistência, a busca por novas moléculas carrapaticidas é um processo natural, no entanto, é um procedimento extremamente demorado e oneroso, sendo os entraves, encontrados pela indústria, relacionados aos elevados custos envolvidos no desenvolvimento / descoberta de uma nova molécula, juntamente com aspectos sócio-políticos, relacionados a fatores de toxidade ambiental, segurança alimentar e resíduos alimentares de um novo produto (HENNESSY, 1997, KISS et al., 2012). Segundo Willadsen (2004), como fatores limitantes para as empresas investirem no desenvolvimento de novos compostos, temos a rápida velocidade do aparecimento de resistência a um novo produto, cerca de dez anos, e o fato dessa nova classe química ser mais onerosa que a anterior. Acredita-se que estes custos possam chegar a US\$ 100 milhões (GRAF et al., 2004). Nesse sentido, a indústria tem realizado a associação de diferentes princípios ativos a fim de potencializar a ação dos produtos, todavia, já existem relatos de resistência para essas associações (FURLONG et al., 2007).

O fenômeno da resistência pode estar relacionado à mudança da frequência gênica de uma população, por meio da seleção artificial, que pode ser percebida pela perda de eficácia de um dado princípio ativo, sendo necessário uma dose superior à letal, para controle da maior parte da população de um organismo alvo (FAO, 2004; FURLONG et al, 2007; GEORGE, 2014; FAO, 2018). A resistência é um processo natural, sendo uma resposta genética a evolução das populações de uma dada espécie, transmitida aos seus descendentes, em virtude de uma pressão de seleção, como a aplicação de pesticidas. Além disso, fatores ambientais também podem acarretar alterações no fenótipo e genótipo de um indivíduo (CONWAY; COMINS, 1979; CONDER; CAMPBELL, 1995).

A *Food and Agriculture Organization* (FAO, Estados Unidos) preconiza o teste de imersão de adultos (TIA) e teste de pacote de larvas (aplicado nos estágios imaturos) (TPL) para o diagnóstico fenotípico de resistência em carrapatos. Esses métodos permitem avaliar o perfil fenotípico de susceptibilidade de diferentes populações do parasito aos carrapaticidas (KLAFKE et al., 2006). Além da análise fenotípica, o diagnóstico de resistência pode ser realizado por diferentes técnicas bioquímicas e moleculares (LE GALL et al., 2018).

A partir da aplicação dos carrapaticidas, há a penetração da droga através da cutícula do carrapato chegando ao interior de seus corpos. A partir disso, sofrem reações de biotransformação alcançando seus respectivos sítios de ação. Os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de resistência estão relacionados a fatores como: a) redução na penetração do fármaco através da cutícula do artrópode; b) resistência por insensibilidade de sítio de ação (mutação de nucleotídeo em região codificadora de determinado gene); c) resistência metabólica (aumento no nível de enzimas encarregadas de realizar o metabolismo de drogas, como citocromo-P450 monooxigenases - P450, glutathione S-transferases - GST e esterases; ou uma associação desses fatores (FFRENCH-CONSTANT et al., 2004; LI et al., 2007). Dentre as principais classes carrapaticidas comerciais, utilizadas em produtos de contato, destacam-se a deltametrina (piretróide sintético), amitraz (amidínico) e clorfenvinfós (organofosforado).

Os piretróides são uma classe de pesticidas sintéticos, desenvolvidos com base na estrutura das piretrinas, compostos presentes em plantas do gênero *Chrysanthemum* spp., componentes do inseticida natural piretro, caracterizados por apresentarem em sua conformação uma fração ácida, contendo dois carbonos quirais, uma ligação éster e uma fração álcool, que pode conter um carbono quiral, particularidade que permite reações estereoespecíficas relacionadas ao seu mecanismo de ação (CASIDA et al., 1983; ELLIOTT, 1995). São conhecidos por atuarem no metabolismo das P450 e esterases (enzimas) (MILLER et al., 1999), além de agirem insensibilizando o canal de sódio, alterando a permeabilidade da membrana ao Na⁺, provocando hiperexcitação neural e subsequente morte dos invertebrados (VIJVERBERG et al., 1982; GUERRERO et al., 2001). Em carrapatos, a resistência a piretróides já foi descrita em alguns países como Brasil, Índia, Colômbia, México, Austrália, Iran, Uruguai e Argentina (SCHNITZERLING et al., 1989; BAGHERWAL et al., 1995; ROMERO et al., 1997; ENAYATI et al., 2010; MENDES et al., 2011; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2012; KLAFKE et al., 2017).

O amitraz, pertencentes ao grupo das formamidinas, é um pó cristalino que apresenta alta solubilidade em solventes orgânicos, sendo instável em pH ácido e em ambientes de elevada temperatura e luminosidade (MELO et al., 2002). São caracterizados por atuarem nas esterases e GST, agindo também na insensibilização do receptor de octopamina (receptor adrenérgico), levando a uma hiperestimulação das sinapses octopaminérgicas, causando tremores e convulsão (LI et al., 2004; JONSSON et al., 2018). A resistência de carrapatos ao composto amitraz já foi descrita por diferentes estudos (CHEN et al., 2007; CHEVILLON et al., 2007; LOVIS et al., 2013; KLAFKE et al., 2017).

Organofosforados são compostos derivados do ácido fosfórico, desenvolvidos para substituírem os organoclorados, devido problemas de contaminação, e representam a classe de carrapaticidas mais utilizada no Brasil (GEORGE et al., 2008). Atuam metabolicamente nas esterases (VILARINO et al., 2003) e na inibição do sítio de ação da acetilcolinesterase, mantendo os canais de sódio abertos, provocando hiperexcitação e morte dos artrópodes (FUKUTO, 1990; FOIL et al., 2004). Da mesma forma que nos grupos químicos anteriores, há relatos na literatura que evidenciam resistência de carrapatos a esse composto (ORTIZ et al., 1995; ROMERO et al., 1997; ROSARIO et al., 1997; MENDES et al., 2011).

2.3 Pesticidas botânicos

O emprego de inseticidas botânicos na agricultura era um dos principais métodos de controle de artrópodes até a primeira metade do século XX, sendo apontado como a primeira geração de inseticidas. Entretanto, com a descoberta e desenvolvimento das classes de

pesticidas químicos, ocorreu drástica redução no uso desses produtos de origem vegetal (KHATER, 2012).

As plantas apresentam, em sua composição química, metabólitos primários, compostos por substâncias essenciais à sua sobrevivência como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, e os metabólitos secundários, que não estão diretamente relacionados com a manutenção dos processos fisiológicos e estrutura da planta, mas garantem a sua sobrevivência, permitindo a interação com o meio no qual está inserida, defesa química contra predadores e patógenos e respostas a estresses abióticos (SIMÕES et al., 2003; LOPEZ-BUCIO et al., 2006). Dessa forma, todas as plantas produzem metabólitos secundários, em maior ou menor concentração, que podem exibir atividades biológicas contra artrópodes, sendo relacionadas a ação de repelência, intoxicação, efeitos na regulação de crescimento e alterações no comportamento alimentar (HANIFAH et al., 2011; KHETRAPAL; VODWAL, 2016). Como exemplo de plantas tradicionalmente ditas como pesticidas, temos *Azadirachta Indica* A. Juss. (neem), que apresenta atividade para mais de 400 espécies de artrópodes-praga, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. (piretrina), *Nicotiana tabacum* L. (nicotina), *Schoenocaulon officinale* A. Grang (sabadina) e *Ryania Speciosa* Vahl. (Rianodina) (KOUL et al., 2003; KHETRAPAL; VODWAL, 2016).

Os produtos vegetais podem ser utilizados na forma de extrato, óleo essencial (OE) ou compostos isolados (KOUL et al., 2003; KHETRAPAL; VODWAL, 2016). Os óleos essenciais (OEs) foram descobertos na Idade Média pelos Árabes. São misturas voláteis, de odor marcante, composto por uma matriz complexa, com cerca de 20 a 60 componentes, e a concentração de cada substância pode variar consideravelmente, dependendo de fatores bióticos, como espécie vegetal, genótipo da população da planta e interação ecológica com outros organismos (bactérias, fungos, nematoides artrópodes e outras plantas); e fatores abióticos, como composição do solo, época do ano, umidade relativa, incidência de radiação solar entre outros. Em geral, sua obtenção é dada pela técnica de hidrodestilação ou arraste a vapor, e as substâncias que predominam em OEs podem ser divididas em dois grupos, de acordo com a sua biossíntese. Um grupo composto pelos terpenos e terpenóides, incluindo os monoterpenos e os sesquiterpenos; e o grupo representado pelos compostos aromáticos e alifáticos, conhecidos como fenilpropanóides (BAKKALI et al., 2008).

Nos últimos anos, tem crescido o número de pesquisas direcionadas a investigação da atividade de substâncias de origem vegetal sobre carrapatos, incluído artigos de revisão (POHLIT et al., 2011; ADENUBI et al. 2016, 2018a, b; BENELLI et al. 2016; PAVELA et al. 2016; ROSADO-AGUILAR et al., 2017; BENELLI; PAVELA 2018; NWANADE et al., 2020), evidenciando a importância etno-veterinária, e o potencial dessas substâncias para o desenvolvimento de novos carrapaticidas.

De acordo com Kiss et al. (2012), o emprego de substâncias de origem vegetal como um produto acaricida teria, como vantagens, o custo de produção, relativamente baixo, a diminuição do processo de resistência, devido ao efeito sinérgico de inúmeros compostos ativos presentes nos OEs e extratos vegetais, e seu baixo poder residual, relacionado ao seu elevado grau de biodegradação. Além disso, quando comparado com pesticidas químicos, a regulamentação e liberação de carrapaticidas botânicos, frente aos órgãos fiscalizadores, seria menos onerosa em algumas regiões do mundo (KISS et al., 2012).

Como exemplo de OEs com atividade sobre carrapatos, temos o óleo de *Lippia alba* (Mill.) que já teve sua atividade acaricida e repelente evidenciada para larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (PEIXOTO et al., 2015; DA SILVA LIMA et al., 2016) e ninfas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* sensu lato (SOARES et al., 2010). Os OEs de *Eucalyptus citriodora* (Hook) e *Cymbopogon nardus* (L.) também tiveram sua atividade acaricida demonstrada para larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e

Dermacentor nitens (Neumann, 1897) (CLEMENTE et al., 2010). Nesse mesmo sentido, a atividade do óleo *Ocotea elegans* (Mez) foi evidenciada para larvas e fêmeas de *R. microplus*, sendo apontado o potencial da planta como composto acaricida (FIGUEIREDO et al., 2018). Em estudo recente, de Queiroz et al. (2020) observaram a atividade do óleo de *Ricinus communis* L. sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e constataram redução no processo de oviposição e alterações morfológicas no sistema reprodutor.

Análogos semi-sintéticos de compostos vegetais têm sido alvo de alguns estudos, na tentativa de desenvolver formulações botânicas estáveis, seguras e biologicamente mais ativas que o seu precursor (KIM et al., 2015). O processo de acetilação, em particular, substituição do grupo hidroxila por um grupo acetila, confere maior segurança à molécula, além de torná-la menos tóxica para o ambiente e organismos não-alvo (DAMASCENO et al., 2014; ANDRE et al., 2016; ANDRE et al., 2017). Estudos evidenciaram que alguns derivados acetilados potencializaram a ação inseticida (SCOTTI et al., 2014), bactericida (MATHELA et al., 2010; MYANGAR; PATEL, 2011), nematicida (ELOH et al., 2019) e acaricida (FERRARI et al., 2008; RAMÍREZ et al., 2016).

Conforme dito anteriormente, o desenvolvimento de resistência frente a um acaricida botânico é mais lento devido à presença de diferentes compostos bioativos. Nesse sentido, surge a necessidade de investigar se os mecanismos envolvidos no processo de resistência a carrapaticidas sintéticos podem influenciar na susceptibilidade dos carrapatos a compostos vegetais, indicando resistência cruzada (KISS et al., 2012). Rosado-Aguilar et al. (2010), investigaram a ação de quinze extratos de plantas sobre larvas não alimentadas de uma população de *R. microplus* resistente a piretróide, amitraz e organofosforado, e observaram mortalidade acima de 95% para seis espécies de plantas, demonstrando a ausência de resistência cruzada. Em outro estudo, foi avaliado a ação de dois OEs de *Lippia gracilis* Schauer (diferentes quimiotipos) e os compostos puros, timol e carvacrol, sobre larvas de *R. microplus* de diferentes populações (uma cepa suscetível e outra resistente a organofosforado), sendo observado que os OEs foram mais ativos na população resistente. Com relação aos compostos puros, timol resultou em atividade semelhante nas duas cepas e o carvacrol foi mais tóxico na cepa resistente (COSTA-JÚNIOR et al., 2016). Por fim, Singh et al. (2018) observaram a ação do acaricida botânico comercial Essentria® IC-3 (10% de OE de alecrim, 2% de OE de hortelã-pimenta, 5% de geraniol) sobre dez populações de *R. microplus* com diferentes susceptibilidades a carrapaticidas químicos, sendo constatado um baixo nível de resistência ao composto vegetal em populações já resistentes a carrapaticidas sintéticos.

2.4 Fenilpropanóides

Fenilpropanóides são moléculas aromáticas que apresentam como precursor o fenilpropano (via do chiquimato), estrutura central C6-C3. Esses compostos apresentam baixo peso molecular e ocorrem em menor frequência, se comparados aos terpenos, entretanto, algumas espécies de plantas exibem esses compostos como componentes majoritários (BAKKALI et al., 2008), como é o caso da *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Nemuaron vieillardii* (Baill.), *Arisaema anurans* Mart., *Piper aduncum* L., *Pimpinella anisum* L., *Syzygium aromaticum* L. (OZCAN; CHALCHAT, 2006; FRANZ; NOVAK 2009, SILVA et al., 2009; LÉBOUVIER et al., 2016; SANTOS et al., 2017; JIA et al., 2018).

Relacionados com a formação de diferentes metabólitos secundários como flavonoides, isoflavonas, cumarinas e tocoferóis (NATELLA et al. 1999; IRITI; FAORO 2009), os fenilpropanóides estão associados a respostas a estresses bióticos e abióticos e à defesa contra predadores e patógenos das plantas (BALLESTER et al., 2006; 2013;

CAJUSTE; LAFUENTE, 2007). Acredita-se que essa defesa esteja relacionada com características antioxidantes e subsequente eliminação de radicais livres (KORKINA, 2007).

A ação biológica de fenilpropanóides já foi relatada para bactérias (KEĀPA et al., 2018), fungos (SHREAZ et al. 2011), nematoides (WUYTS et al., 2006), protozoários (NOCITO et al., 2007) e insetos (CHENG et al., 2009). Para carrapatos sua ação foi evidenciada para diferentes estágios e espécies (Figura 2).

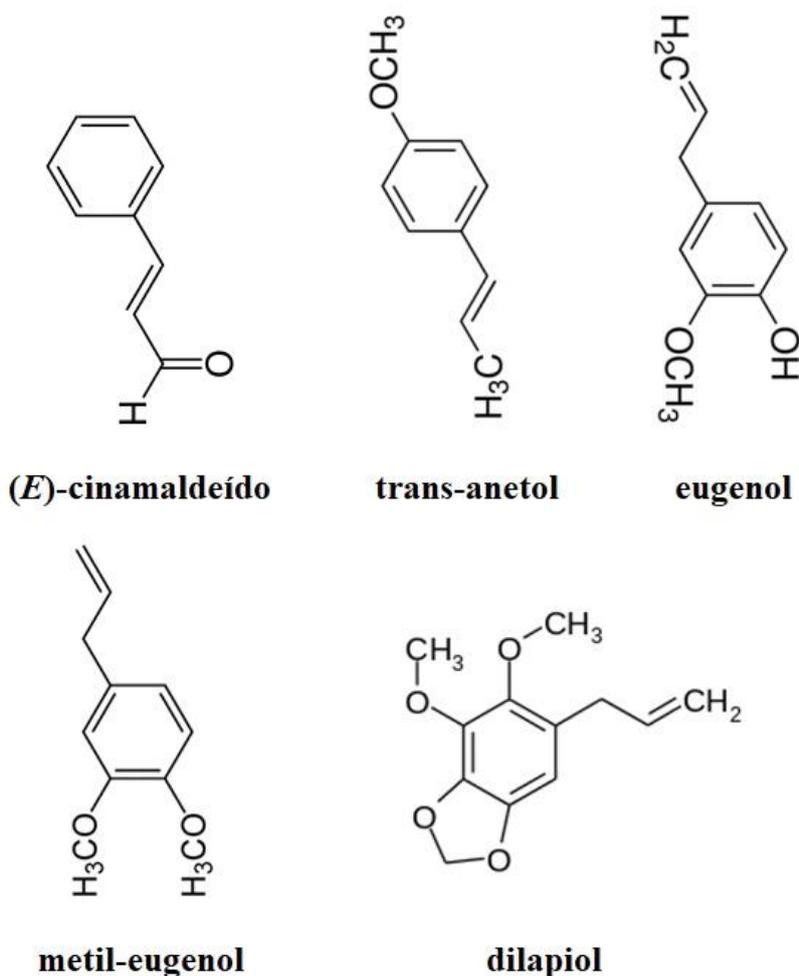


Figura 2 – Exemplos de fenilpropanóides descritos com atividades sobre carrapatos.

Sobre a ação acaricida, Martinez-Velazquez et al. (2011) observaram atividade acaricida dos óleos essenciais de *Pimenta dioica* (L.) Merr. e *Ocimum basilicum* Linn sobre larvas não alimentadas de *R. microplus* e atribuíram o potencial acaricida à presença dos fenilpropanóides metil-eugenol e eugenol nos óleos. Silva et al. (2009) avaliaram o extrato hexânico de *Piper aduncum* L., contendo 94,84% de dilapiol, sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e apontaram que a atividade sobre os carrapatos foi graças a presença do fenilpropanóide. O potencial acaricida dos OEs de *Ocimum gratissimum*

L. e *Ocimum urticaefolium* Roth foi evidenciado para larvas não alimentadas de *R. microplus*, sendo identificado o eugenol como componente majoritário e bioativo de ambos os óleos (HÜE et al., 2015). Em estudo recente, Jioti et al. (2019) avaliaram a atividade dos OEs de *Syzygium aromaticum* (L.) e *Cinnamomum zeylanicum* Blume, que continham os fenilpropanóides eugenol e (*E*)-cinamaldeído como componentes majoritários, respectivamente, sobre larvas não alimentadas de *R. microplus*, e observaram elevada mortalidade.

O eugenol puro teve sua atividade acaricida e repelente evidenciada sobre *R. microplus* (BROWN et al., 1998; MONTEIRO et al., 2012; ZERINGÓTA et al., 2013; FERREIRA et al., 2017), *Ixodes ricinus* Linnaeus 1758, (THORSELL et al., 2006; DEL FABBRO; NAZZI, 2013), *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (MONTEIRO et al., 2012), *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1808) e *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (SENRA et al., 2013b). Senra et al. (2013b) investigaram a ação do fenilpropanóide trans-anetol sobre larvas não alimentadas de *R. microplus* e *D. nitens* e observaram mortalidade superior a 90,0% a partir da concentração de 15 µL/mL. O (*E*)-cinamaldeído, fenilpropanóide comumente encontrado nas plantas do gênero *Cinnamomum*, já teve sua atividade evidenciada para larvas não alimentadas de *R. microplus*, *A. sculptum*, *D. nitens*, *R. sanguineus* (s.l.) (SENRA et al., 2013a,b; NOVATO et al., 2015).

2.5 Sesquiterpenos

Os terpenos são formados pela junção de unidades de isopreno (C₅H₈), sendo classificados em monoterpenos (C₁₀, duas unidades), sesquiterpenos (C₁₅, três unidades), diterpenos (C₂₀, quatro unidades), sesterpenos (C₂₅, cinco unidades), triterpenos (C₃₀, seis unidades) e tetraterpenos (C₄₀, oito unidades) (MAHMOUD; CROTEAU, 2002; KIYAMA, 2017). Os sesquiterpenos são compostos insaturados que podem ser lineares, ramificados ou cíclicos. Sua biossíntese ocorre no citoplasma das células vegetais, através da via do mevalonato e podem ser classificados, de acordo com sua conformação cíclica em: áciclicos, monocíclicos e bicíclicos (BASER; DEMIRCI, 2007).

Por possuírem estruturas químicas diversas, os sesquiterpenos possuem variada atividade biológica (ZHANG et al., 2017), incluindo ação anti-inflamatória (LEITE et al., 2011; MARTÍNEZ et al., 2012), antitumoral (ZHAI et al., 2010), antimicrobiana (KAMATOU; VILJOEN, 2010), antimalárica (MORADI-AFRAPOLI et al., 2013), inseticida (PRIESTLEY et al., 2006) e acaricida (DINIZ, 2014; LAGE et al., 2015) (Figura 3). Devido a sua característica lipofílica, os terpenos exibem potencial citotóxico, levando a alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais em artrópodes (PRATES; SANTOS, 2009).

A ação de óleos essenciais sobre carrapatos, que apresentam sesquiterpenos como componentes majoritários, tem sido amplamente relatada na literatura. Lebouvier et al. (2013) observaram a ação dos óleos essenciais de *Callitris sulcata* (Parl.), *Neocallitropsis pancheri* (Carr.), *Araucaria columnaris* Hook, cuja composição havia predominância de sesquiterpeno, e concluíram que a ação acaricida observada para *R. microplus* era devida a presença desses terpenos. O óleo essencial de *Drimys brasiliensis* Miers, contendo o sesquiterpeno ciccolorenona, também apresentou atividade sobre *R. microplus* (RIBEIRO et al. 2008). Em adicional, foi constatada a atividade acaricida e efeito sinérgico dos sesquiterpenos presentes no óleo essencial de *Calea serrata* Less sobre *R. microplus* (RIBEIRO et al. 2011).

Chagas et al. (2016) evidenciaram a atividade do OE de duas espécies de planta do gênero *Croton*, ricas com sesquiterpeno germacrene, sobre *R. microplus*. Nesse mesmo sentido, Facey et al. (2005) investigaram o efeito do óleo essencial de *Hyptis verticillata* Jacq,

com predominância de sesquiterpenos oxigenados, e observaram atividade sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Em outro estudo, foi demonstrada atividade de diferentes extratos de *Artemisia annua* L, contendo lactonas sesquiterpênicas como componentes majoritários, sobre o carrapato dos bovinos (CHAGAS et al., 2011). Lage et al. (2015) avaliaram efeito do óleo essencial *Baccharis dracunculifolia* DC e seu composto majoritário isolado, o sesquiterpeno nerolidol, sobre *R. microplus*, sendo demonstrado atividade carrapaticida do OE e do nerolidol.

Zhang et al. (2009a) observaram que o sesquiterpeno isolado isolongifolenona apresentou atividade repelente sobre *Amblyomma americanum* (L.) e *Ixodes scapularis* Say. Para essas mesmas espécies de carrapatos, foram relatadas ação repelente do álcool sesquiterpênico elemol (CARROLL et al., 2010), sendo também evidenciada a ação do (-)-10-epi- γ -eudesmol sobre *A. americanum* (TABANCA et al., 2013). Flor-Weiler et al. (2011) observaram a toxicidade do sesquiterpeno nootkatona sobre ninfas de *A. americanum*, *Dermacentor variabilis* (Say), *I. scapularis* e *R. sanguineus* (s.l.), sendo observado potencial acaricida do composto em todas as espécies testadas. Além disso, foi observada ação repelente, *in vivo* e *in vitro*, do nootkatona sobre *A. americanum* e *I. scapularis*, em estudos de campo, em área endêmica para doença de Lyme (DIETRICH et al. 2006; SCHULZE et al., 2011; JORDAN et al., 2012).

Diniz (2014) avaliou a atividade do OE de quatro quimiotipos da planta *Siparuna guianensis* Aublet e do álcool sesquiterpênico α -bisabolol sobre larvas e fêmeas de *R. microplus*. A análise fitoquímica dos OEs identificou a presença do α -bisabolol em dois óleos, justamente os que exibiram maior atividade para larvas e fêmeas de *R. microplus*, sendo observado que, em ambos os testes, o α -bisabolol puro resultou em maior atividade quando comparado com os OEs.

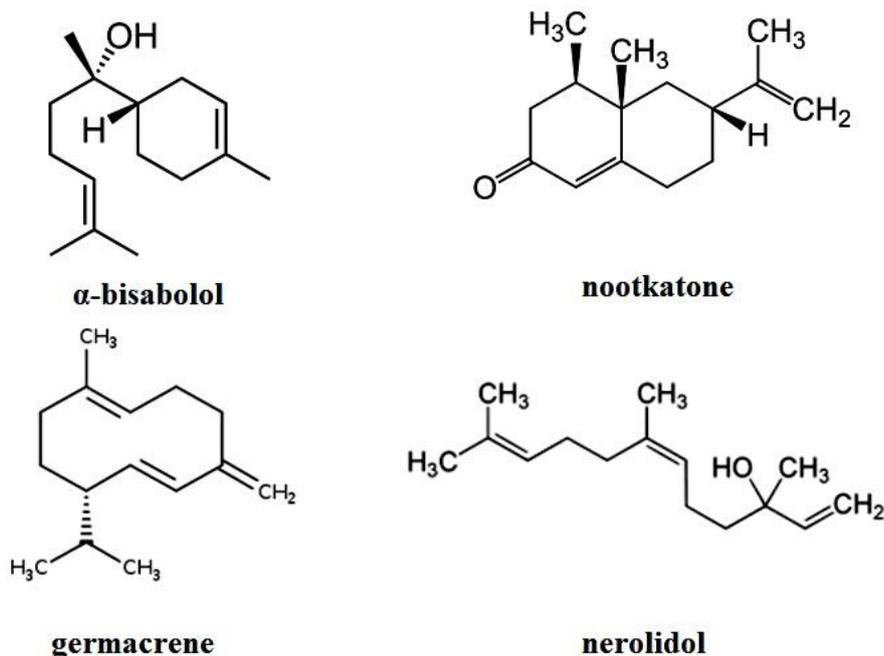


Figura 3 – Exemplos de sesquiterpenos descritos com atividades sobre carrapatos.

2.6 Viabilidade econômica dos compostos vegetais

Os ativos naturais são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e de gêneros alimentícios, com um faturamento em torno de US\$ 60 bilhões por ano. Segundo a ONU (Organização das Nações Unidas) a procura por medicamentos fitoterápicos tem crescido exponencialmente, cerca de 7% ao ano, abrangendo três mil espécies de plantas, o que corresponde a 400 mil toneladas/ano (EMATER, 2020). Além disso, de acordo com Miresmailli e Isman (2014), o segmento de biopesticidas cresce cerca de 16% ao ano, com estimativa para 2025 de alcançar 20% do mercado.

O fenilpropanoide eugenol, por exemplo, componente majoritário do OE do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry), é comumente utilizado na indústria de alimentos e cosméticos (ZHANG et al., 2009b; CHATTERJEE et al., 2015) além de ter aplicabilidade direta na área da odontologia, como componente selador em obturações e produto antisséptico de higiene bucal (MAZZAFERA, 2003). Outro exemplo é o OE de *Lavandula angustifolia* Mill. (lavanda), utilizado na confecção de produtos de higiene pessoal, perfumes, cosméticos, pães, sorvetes, balas e chicletes, sendo o mercado do OE de lavanda estimado em 1150 toneladas anuais (KIM; LEE, 2002).

O (*E*)-cinamaldeído, fenilpropanoide extraído de plantas do gênero *Cinnamomum*, é utilizado como componente aromatizante em sorvetes, goma de mascar, bebidas, doces, carnes processadas, medicamentos, cosméticos e perfumes. É considerado um composto de alta viabilidade econômica, sendo o seu uso industrial estimado entre 100-1000 toneladas por ano (BICKERS et al., 2005; HOOTH et al., 2014). O OE de *Eremanthus erythropappus* (DC) é a principal fonte de α -bisabolol, serquiterpeno com atividade anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e anti-irritante, sendo amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos. No Brasil, o mercado desse terpeno gira em torno de 120 toneladas por ano, sendo 98% desse total exportado para a Europa (OLIVEIRA et al., 2009).

A composição dos OEs é diretamente influenciada por fatores como época da colheita da planta, biogeografia do local de coleta, quimiotipo da espécie vegetal, método de extração e alterações do microclima no qual a planta está inserido (DJOUAHRI et al., 2013). De acordo com Miresmailli e Isman (2014), grande parte dos fabricantes de pesticidas botânicos terceirizam a obtenção dos OEs e realizam um rastreio desses compostos de acordo com alguns marcadores, como a quantidade de um composto-chave, previamente determinado, para garantir qualidade ao produto, sendo importante, para fins comerciais, realizar estudos para uma melhor compreensão dos princípios ativos presentes nos OEs e métodos de extração para estabelecer padrões de forma a obter um produto final uniforme. Segundo Jetter e Paine (2004), pesticidas botânicos costumam ser mais onerosos que os sintéticos, no entanto devido a crescente preocupação com o impacto ambiental e resíduos nos produtos, os consumidores estão dispostos a arcar com esses gastos.

2.7 Segurança clínica dos compostos vegetais

Em geral, os pesticidas botânicos são considerados uma alternativa segura em comparação ao uso de pesticidas sintéticos, principalmente por serem compostos de baixo teor residual. Entretanto, alguns autores acreditam que esses compostos transmitem uma imagem de falsa segurança, uma vez que poucos metabólitos secundários tenham sido submetidos à testes toxicológicos e que alguns compostos apresentaram efeitos nocivos para mamíferos (SHAALAN et al., 2005; KISS et al., 2012). Madzimure et al. (2011) investigaram a atividade acaricida do extrato aquoso *Lippia javanica* (Burm F.) e a sua toxicidade em camundongos,

sendo observado que as concentrações de 12,5, 25,0 e 37,5% foram tóxicas, causando letargia e morte de alguns animais, no entanto, essas concentrações foram mais altas do que a necessária para obtenção de um efeito acaricida efetivo (5%).

Os principais órgãos fiscalizadores, como o Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS, FDA e Conselho da Europa, estabeleceram um limiar de segurança clínica para utilização de diferentes compostos vegetais (FEMA, 1965; Conselho da Europa, 2000; FAO, 2011; JECFA, 2020). O (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, objetos de estudo do presente trabalho, foram reconhecidos como substâncias geralmente seguras ("GRAS"), sendo aprovada sua utilização como ingrediente aromatizante e saborizante pela FAO/OMS, sendo ainda determinada a faixa entre 0-0,7 mg/Kg de peso corporal de (*E*)-cinamaldeído e 0-0,09 mg/kg de α -bisabolol, para ingestão diária, sem efeito toxicológico para humanos.

O (*E*)-cinamaldeído em concentrações elevadas causa irritação na pele. No entanto, os órgãos fiscalizadores, até o momento, não o consideram um produto que possa causar câncer ou represente risco à saúde (PUBCHEM, 2020a). Em excesso no organismo, esse composto é excretado pela urina, na forma de ácido cinâmico, metabólico que também não é considerado tóxico (JECFA, 2020). Esse fenilpropanóide possui um total de 13.790 patentes registradas (PUBCHEM, 2020), o que demonstra um interesse comercial e científico na molécula. Como exemplo de patentes, temos a sua utilização como modulador alostérico de receptor nicotínico de acetilcolina (Registro US9926285); modulador de receptores da esfingosina, um constituinte dos esfingolípídios (Registro US9975863); atividade antibacteriana (Registro US2018265523) e sete registros de atividade acaricida (Registros US1355336 / US503737 / US438131 / US2852416 / US638940 / US515309 / US3093628) (PUBCHEM, 2020a). O (*E*)-cinamaldeído foi registrado como produto repelente para uso em aves na EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) e, atualmente, está com o registro pendente (Registro 1107/2009) como pesticida botânico no Comissão Europeia (EU Pesticides Database).

Com relação ao α -bisabolol, em excesso, ele também é excretado na urina, na forma de ácido glucurônico, não apresentando, até então, preocupação com relação à sua segurança clínica (FAO, 2011). Esse sesquiterpeno apresenta 1.297 patentes (PUBCHEM, 2020b), no qual podemos destacar sua utilização como modulador heterocíclico da síntese lipídica (Registro US8871790); em tratamento e/ou cuidados com a pele e seu uso em composições cosméticas ou farmacêuticas (Registro US9725483); em tratamento, redução ou prevenção de infecções causadas por bactérias resistentes a medicamentos (Registro US8937062) (PUBCHEM, 2020b). É um composto amplamente utilizado em produtos para higiene pessoal, cosméticos, inclusive em crianças e recém-nascidos (PUBCHEM, 2020b).

2.8 Mecanismo de ação dos compostos vegetais em artrópodes

Sobre o mecanismo de ação dos compostos vegetais em artrópodes-praga, acredita-se que devido ao seu caráter hidrofóbico essas substâncias podem atuar mecanicamente sobre o parasito, através da obstrução dos espiráculos ou atuando nas ceras cuticulares, ocasionando estresse hídrico e, por consequência, a morte do indivíduo (BURGESS, 2009). Outros estudos mostram um efeito tóxico no sistema nervoso de insetos tratados com óleos essenciais, atuando, por exemplo, na inibição da enzima acetilcolinesterase, no bloqueio dos canais de cloro controlados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), receptores de octopamina e tiramina (MILLS et al., 2004; LOPEZ;

PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; REGNAULT-ROGER et al., 2012; PAVELA; BENELLI, 2016).

Como exemplo da ação de substâncias de origem vegetal em artrópodes, temos o monoterpeno timol agindo como potencializador dos receptores GABA em *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (PRIESTLEY et al., 2003), o fenilpropanoide eugenol atuando no sistema octopaminérgico, se ligando aos receptores de octopamina, de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (ENAN, 2005a, b) e os monoterpenos carvacrol, α -terpineol e timol agindo nos receptores de tiramina (CAMPOS et al., 2018). Para carrapatos, a ação de diferentes compostos vegetais, como extratos, óleos essenciais e compostos isolados e sua citotoxicidade têm sido descritas para diferentes espécies e órgãos (ARNOSTI et al., 2011; DENARDI, et al., 2011; SAMPIERI et al., 2012; MATOS et al., 2014; 2019; 2020; LIMA DE SOUZA et al., 2019; KONIG et al., 2019).

Com relação ao sistema reprodutivo, Denardi et al. (2010; 2011) avaliaram a ação do extrato de *Azadirachta indica* A. Juss (neem) sobre fêmeas de *R. sanguineus* s.l e observaram que, apesar de não ocorrer mortalidade nas maiores concentrações testadas, ocorreu inúmeras alterações nos oócitos dessas fêmeas, afetando, principalmente, o processo de vitelogênese. O efeito citotóxico do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) também foi demonstrado para fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l, sendo observado alterações estruturais significativas nos oócitos (VENDRAMINI, 2012). Nesse mesmo sentido, estudos evidenciaram a ação do óleo essencial de *Ricinus communis* L. (mamona) e do extrato de *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (jambu) sobre o sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* stricto (s.s.) e constataram alterações morfológicas nas glândulas acessórias e espermátides, o que promove modificações no desenvolvimento e produção dos gametas (SAMPIERI et al., 2012; ANHOLETO et al., 2017).

O efeito citotóxico dessas substâncias também foi avaliado nas glândulas salivares desses carrapatos. Arnosti et al. (2011) constataram que o óleo de *R. communis* promove uma aceleração no processo de degeneração das células acinares de fêmeas de *R. sanguineus* s.l, levando a mudanças na atividade secretora desse órgão, acarretando alterações fisiológicas de órgãos considerados vitais para a sobrevivência desse parasito. Matos et al. (2019) analisaram a ação do monoterpeno timol nas glândulas salivares dessa mesma espécie de carrapato e também verificaram degeneração dos ácinos.

Os óleos essenciais de *A. indica* e *C. guianensis* e o composto puro timol também tiveram sua atividade evidenciada sobre o singânglio de *R. sanguineus* s.l., sendo observado danos celulares no córtex desse órgão, que podem promover alterações nas diferentes funções neurais, além de ser capaz de causar a morte do ectoparasito (ROMA et al., 2015; REMÉDIO et al., 2014; MATOS et al., 2019). Em adicional, foi observada a ação do timol sobre o órgão de Gené em *R. sanguineus* s.l, sendo observado danos nas glândulas tubulares e acessórias, afetando diretamente a viabilidade dos ovos (MATOS et al., 2020).

Recentemente, Cardoso et al. (2020) descreveram o potencial dos terpenos carvacrol, timol, eucaliptol, citral e R-(-)-carvona na inibição da acetilcolinesterase em duas cepas de *R. microplus* (uma suscetível e outra resistente às classes de carrapaticidas químicos), sendo o carvacrol e o timol os compostos que promoveram maior atividade inibitória.

Não existem estudos sobre a ação de compostos de origem vegetal no metabolismo de lipídios em carrapatos. Uma melhor compreensão de como essas substâncias atuam, pode vir a elucidar o mecanismo de ação desses compostos, podendo, até mesmo, caracterizar novos sítios de ação.

2.9 Metabolismo dos lipídeos em carrapatos

Lipídios são biomoléculas orgânicas, com características hidrofóbicas ou anfipáticas que apresentam baixa solubilidade em solventes polares e elevada solubilidade em solventes apolares. Dessa forma, os lipídios precisam se associar com proteínas específicas (lipoproteínas) para serem transportados dentro dos fluidos biológicos, sendo a parte proteica dessa proteína, denominada apoproteína. (LEHNINGER, 1984; MARECHAL et al., 2011; NELSON; COX, 2014; KLUCK, 2018).

Devido à sua ampla variação molecular, essas biomoléculas podem atuar em diferentes funções, como: componentes estruturais de membranas biológicas, substratos energéticos, segundos mensageiros, regulação da temperatura corporal, sistema imunológico, proteção contra dissecação e infecção por patógenos (DAVIS, 1974; GILBERT; CHINO, 1974; LEHNINGER, 1984; CABRAL, 2005). Por apresentar essas funções variadas, os lipídios podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo compreende os lipídios complexos, que apresentam em seu arranjo estrutural ácidos graxos, sendo ainda classificados em lipídios complexos apolares, como os triacilgliceróis, e polares, como os fosfolipídios. Já o segundo grupo é caracterizado pela ausência de ácidos graxos, tal como o colesterol (LEHNINGER, 1984).

Estudos sobre o metabolismo energético em carrapatos são escassos sendo, muitas vezes, utilizadas informações baseadas em estudos com insetos, trabalhando-se com a hipótese de um mecanismo regulatório comum entre o filo Arthropoda (SONENSHINE; ROE 2013). De acordo com Bennett e Shotwell (1972), 70% dos lipídios totais presentes na hemolinfa de insetos correspondem a lipídios neutros e 30% fosfolipídios. Como exemplos de lipídios neutros descritos para carrapatos temos os triacilglicerídeos (TG), ácidos graxos (AG), monoacilgliceróis (MG), diacilglicerol (DG), colesterol éster (CHOE) e fosfolipídios (ARRIETA et al., 2006; RAIA et al., 2012; ANGELO et al., 2013; GAUDÊNCIO, 2016; RIBEIRO, 2018; KLUCK et al., 2018; XAVIER et al., 2019).

Segundo Canavoso et al. (2001), ao longo do processo digestivo dos insetos, os lipídios complexos são hidrolisados, liberando ácidos graxos que, por sua vez, serão absorvidos pelas células intestinais desses artrópodes. No epitélio intestinal, esses ácidos graxos são esterificados e convertidos em diacilglicerol, triacilglicerol e fosfolipídeos, de acordo com a demanda fisiológica do indivíduo (CANAVOSO et al., 2001, ARRESE et al., 2001). Esses lipídios são transportados por uma lipoproteína denominada lipoforina, via hemolinfa, para todos os órgãos, sendo os fosfolipídios, diacilglicerol, colesterol e hidrocarbonetos as principais formas encontradas (ATELLA et al., 2000, ATELLA et al., 2012; SOULAGES; WELLS, 1994b). Em menor concentração, a lipoforina também transporta carotenoides, precursor do hormônio juvenil (SOULAGES; WELLS, 1994, ATELLA et al., 2000; ATELLA et al., 2012).

De acordo com Clark e Block (1959), os insetos não são aptos a sintetizar esteroides, dependendo exclusivamente de esteroides presentes na dieta que são, portanto, utilizados na produção de esteroides específicos, como os ecdisteróides, de acordo com a necessidade de cada espécie. Acredita-se que o teor de lipídios das fêmeas ingurgitada aumenta em torno de 22 a 63 microgramas/carrapato do conteúdo total de lipídios (SONENSHINE, 1991). O sangue do hospedeiro do carrapato apresenta, em sua composição, diferentes esteroides, sendo o colesterol considerado o mais importante, uma vez que eles participam da síntese de diversos hormônios e feromônios (CHERRY, 1976). Nesse mesmo estudo foi observada a utilização do colesterol durante o processo de postura de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo constatado que o peso dessas fêmeas é proporcional ao teor de colesterol presente (quanto maior o peso da fêmea, maior a quantidade de colesterol/mg), no qual um terço desse

substrato é transferido para os ovos. Além disso, foi observado que o metabolismo de manutenção demanda baixa quantidade de colesterol, ocorrendo acúmulo desse substrato quando as exigências metabólicas forem sanadas. Em adicional, alguns estudos têm evidenciado a presença de ésteres de colesterol e hidrocarbonetos na cera, sintetizada pelo órgão de Gené, que envolve os ovos com o papel de proteger contra dissecação, predação e patógenos (LEES; BEAMENT, 1948; ATKINSON; BINNINGTON, 1973).

O corpo gorduroso, análogo ao fígado e tecido adiposo dos mamíferos, é o órgão onde ficam estocados a maioria dos lipídios em artrópodes, sendo responsável por uma série de funções como: síntese de algumas proteínas presentes na hemolinfa, armazenamento de aminoácidos, detoxificação do metabolismo nitrogenado, produção de peptídeos antimicrobianos e armazenamento e metabolização de produtos tóxicos. É considerado o principal órgão do metabolismo energético de insetos e carrapatos, sendo que mais de 90% dos lipídios armazenados estão sob a forma do triacilglicerol (ARRESE; WELLS, 1997; CHAPMAN, 1998; CANAVOSO et al., 2001; COHEN, 2009; LIPOVSEK et al., 2011 ANGELO et al., 2013).

Nos carrapatos, o corpo gorduroso está presente em todos os estágios de desenvolvimento (larva, ninfa, adultos) e é formado apenas por um tipo celular, os trofócitos, sendo descrita, ocasionalmente, a existência de nefrócitos adjacentes aos cordões dos trofócitos (DENARDI et al., 2008; SONENSHINE; ROE, 2013) (Figura 4). Apontado como tecido de preenchimento, esse órgão pode ser classificado de acordo com a sua localização, em duas formas: corpo gorduroso parietal (revestimento da parede interna do tegumento) e corpo gorduroso perivisceral (ao redor dos órgãos) (DENARDI et al., 2008).

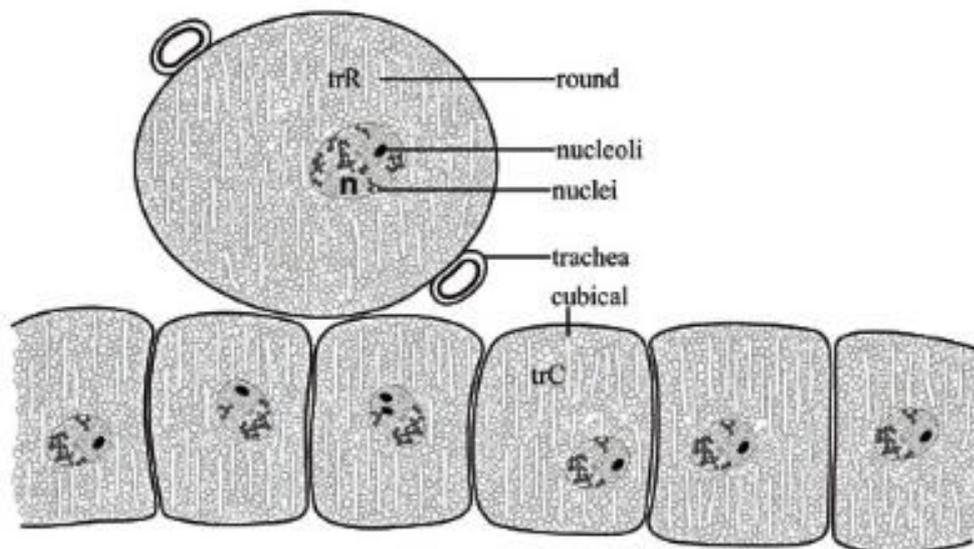


Figura 4: Representação esquemática das células do corpo gorduroso de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* sensu lato. trR = trofócito tipo R; trC = trofócito tipo C; n = núcleo (DENARDI et al., 2008).

O corpo gorduroso dos carrapatos é menos evoluído quando comparado com o dos insetos, principalmente no que se diz respeito ao processo de armazenamento de lipídios, entretanto, são altamente ativos após a alimentação e fecundação, exercendo papel essencial na fase reprodutiva devido à síntese de vitelogenina (Vg) e ecdisteróides (SONENSHINE; ROE, 2013). A Vg é uma proteína carreadora do grupo heme, produzida, principalmente, pelo corpo gorduroso e células intestinais, podendo, ainda, ser sintetizada, em menor quantidade, nos ovários de algumas espécies de carrapatos após período de ingurgitamento, sendo secretada para a hemolinfa, quando será transportada e incorporada nos ovos como vitelina (Vt) (CHINZEI; YANO, 1985; DENARDI et al., 2008; SONENSHINE; ROE, 2013). O grupamento heme carreado pela Vg é originário da degradação da hemoglobina advinda do hospedeiro (GUDDERRA et al. 2002).

Durante o processo de hematofagia dos carrapatos, uma série de eventos bioquímicos são desencadeados. Há um aumento na produção de ecdisteróides (esteróides poli-hidroxilados), sendo o peso da fêmea durante o processo de alimentação um fator estimulador para liberação deste hormônio na hemolinfa, que leva ao início da degeneração das glândulas salivares, ainda no processo de repasto sanguíneo (HARRIS; KAUFMAN, 1984, 1985; KAUFMAN, 1991; FRIESEN; KAUFMAN, 2009). Após término do ingurgitamento, as fêmeas se desprendem do animal, o processo de autólise das glândulas salivares se intensifica, juntamente com o aumento da concentração de ecdisteróides na hemolinfa, estimulando a síntese da proteína Vg, principal fonte energética do embrião (LOMAS; KAUFMAN, 1992). Esse estímulo da produção da Vg por ecdisteróides foi relatado para ixodídeos e argasídeos (FRIESEN; KAUFMAN, 2002, 2004; HIRIGANE et al., 2007; SONENSHINE; ROE, 2013), sendo a ecdisona (20-hidroxicdisona) o ecdisteróide indicado como o responsável pelo início da síntese proteica (NEESE et al., 2000; THOMPSON et al., 2005, 2007; ROE et al., 2008; SONENSHINE; ROE, 2013).

No processo de ingurgitamento, há ainda a produção da enzima glicogêniosintase quinase-3 (GSK-3), que apresenta ação inibitória na enzima glicogênio sintase (GS), sendo importante na embriogênese (EMBI et al., 1980). A GS promove a transformação da uracila difosfato-glicose (UDP-glicose) em uracila difosfato (UDP), fazendo com que o excesso de glicose seja armazenado na forma de glicogênio. Dessa forma, com a GSK-3 ativa (subsequente inativação da GS), há disponibilidade de glicose para ser utilizada no metabolismo embrionário (CROSS et al., 1995). Nos ovos dos carrapatos também se encontra a glicolipoproteína BYC (Boophilus Yolk pro-Cathepsin), sintetizada no corpo gorduroso e captada pelo ovócito em desenvolvimento, que age na degradação da Vt (LOGULLO et al., 1998).

Durante o processo de vitelogênese, processo que compreende a produção de Vg e posterior incorporação pelos oócitos, a Vg sofre modificações estruturais como glicosilação, fosforilação e sulfatação, sendo, portanto, denominada de Vt (ENGELMANN, 1990; BOLDBAATAR et al., 2008). Segundo ROSELL e COONS (1991b), o que difere a Vg da Vt é o percentual de lipídios totais, incluindo lipídios neutros e fosfolipídios, ligados às proteínas. Acredita-se que a Vt seja a responsável pela coloração marrom escura dos ovos (devido à presença do heme) e que corresponda a 90% das proteínas totais do vitelo (ROSELL; COONS, 1991a). No decorrer do desenvolvimento embrionário, grande parte dos lipídios presentes nos ovos são consumidos durante o processo de oviposição, sendo o teor de triacilgliceróis, ésteres de colesterol e diacilglicerol os que exibem maiores baixas (IWUALA et al., 1979; GUIZZO et al., 2012).

Alguns estudos têm evidenciado o perfil lipídico dos ovos em diferentes espécies de carrapatos. Maroun e Kamel (1973), avaliaram a composição dos ovos de *Dermacentor*

andersoni (Stiles, 1908) e verificaram a ocorrência de diferentes ácidos graxos, como ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Para a mesma espécie de carrapato, foram ainda identificados diferentes fosfolipídios como a fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina, lisofosfatidilcolina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol e ácido fosfatídico (HUSSEIN E KAMAL, 1977). Em outro estudo, envolvendo a análise dos ovos de *Rhipicephalus decoloratus* (Koch, 1844), foi observado em sua composição fosfolipídios, ácidos graxos livres, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, ésteres de colesterol e colesterol (IWUALA et al., 1981). Para *R. microplus* foram identificados nos ovos, lipídios neutros como colesterol esterificado, triglicerídios, ácidos graxos, colesterol livre, diacilglicerol, hidrocarbonetos e os fosfolipídios fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, esfingomielina e ácido fosfatídico (RAIA, 2012; GAUDÊNCIO, 2016).

Em um estudo recente, Kluck et al. (2018) observaram o transporte e o metabolismo de lipídios de fêmeas ingurgitadas *R. microplus*, durante o processo de postura, a partir da introdução de um ácido graxo (ácido palmítico radioativo [³H]) na hemocele desses ectoparasitos, sendo a rota desse lipídio analisado no corpo gorduroso, intestino, ovário e órgão de Gené, juntamente com a observação da conversão de lipídios simples em lipídios complexos, de forma a identificar as classes lipídicas utilizadas em cada órgão ao longo da oviposição. Depois da injeção do ácido graxo, os autores observaram queda na radioatividade da hemolinfa durante os diferentes tempos observados, ao passo que foi aumentando a incorporação do lipídio nos demais órgãos, sendo o corpo gorduroso e o ovário os órgãos metabolicamente mais ativos.

Com relação à conversão do ácido graxo em lipídios complexos, no decorrer da postura, foi observado que o corpo gorduroso foi o órgão que promoveu maior transformação de ácido graxo em fosfolipídios, triacilglicerol, monoacilglicerol, sendo o ovário o segundo órgão de importância na conversão das mesmas classes lipídicas. Já em relação ao diacilglicerol, o seu ápice de conversão ocorreu no mesmo momento (quinto dia de oviposição) no ovário, intestino e corpo gorduroso (KLUCK et al., 2018). A metabolização do ácido graxo em colesterol esterificado foi intensificada no ovário, reforçando a ideia de estocagem desse esteroide para formação dos ovos e síntese de ecdisteróides. Sobre o perfil de ácido graxo encontrado nos órgãos, verificou-se baixa concentração desse lipídio no intestino, corpo gorduroso e ovário, o que já era esperado, uma vez que, nesses órgãos, os ácidos graxos disponíveis são convertidos em lipídios mais complexos, sendo observada maior concentração no órgão de Gené (KLUCK et al., 2018). A cera produzida por este órgão é caracterizada por apresentar, em sua constituição, principalmente, hidrocarbonetos de cadeia longa, ácidos graxos e glicerofosfolípidos (BOOTH, 1992; XAVIER et al., 2019).

Com o intuito de melhor compreender o metabolismo energético de carrapatos e sua relação frente agente biológicos com potencial para controle de carrapatos, Angelo et al. (2013) investigaram alterações no metabolismo lipídico do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* frente infecção pelos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) e *Beauveria* sensu lato (s.l.). Nesse estudo, os autores observaram que o teor de colesterol livre aumentou após 24h de infecção nos dois tratamentos, sendo que no tratamento com *M. anisopliae*, após 48h de infecção, ocorreu um aumento no colesterol-éster e triacilglicerol e redução na quantidade de colesterol livre. Gaudêncio (2016), por sua vez, avaliou a ação do acaricida fluazuron, regulador de crescimento que inibe a incorporação de quitina na cutícula dos carrapatos, no perfil dos lipídios neutros da cutícula, corpo gorduroso e postura de fêmeas de *R. microplus* e não observou diferença estatística em nenhuma das classes lipídicas nas diferentes variáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R.Z.; ZAMAN, M.A.; COLWELL, D.D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6-20, 2014.
- ADENUBI, O.T.; FASINA, F.O.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: a review. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 178-193, 2016.
- ADENUBI, O.T.; AHMED, A.S.; FASINA, F.O.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: a systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 779-806, 2018.
- ADENUBI, O.T.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: a critical review. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 160-171, 2018.
- ANDRE, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C.; CAVALCANTE, G.S.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; FREITAS, R.M.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V.; BEVILAQUA, C.M.L. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 52-58, 2016.
- ANDRE, W.P.P.; CAVALCANTE, G.S.; RIBEIRO, W.L.C.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V., BEVILAQUA, C.M.L. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p. 323-330, 2017.
- ANGELO, I.C.; GÓLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; QUINELATO, S., SÁ, F.A.; PONTES, E.G. Neutral lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal infections, **Parasitology Research**, v.112, p.501-509, 2013.
- ANHOLETO, L. A.; DE OLIVEIRA, P. R.; FERREIRA RODRIGUES, R. A.; YAMANE, L. T.; DE CARVALHO CASTRO, K. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Toxic action of *Acmella oleracea* extract on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 164-171, 2017.
- APANASKEVICH, D.; CHALOEMTHANETPHONG, A.; VONGPHAYLOTH, K.; AHANTARIG, A.; APANASKEVICH, M.A.; BREY, P.T.; HERTZ, J.C.; LAKEOMANY, K.; SUTHERLAND, I.W.; TRINACHARTVANIT, W. Description of a new species of Dermacentor Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) from Laos and Thailand. **Systematic Parasitology**, v. 96, p. 475-484, 2019.
- ARRESE, E. L.; CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; PENNINGTON, J. E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry**, v. 31, p. 7-17, 2001.

ARRESE, E. L.; WELLS, M. A. Adipokinetic hormone-induced lipolysis in the fat body of an insect *Manduca sexta*, synthesis of sn-1,2-diacylglycerols. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 68-76, 1997.

ARRIETA, M.C.; LESKIW, B.K.; KAUFMAN, W.R. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum*(Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, p. 297-313, 2006.

ATELLA. G.C.; ARRUDA, M.A.B.C.F.; MASUDA, H.; GONDIM, K.C. Fatty acid incorporation by *Rhodnius prolixus* midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 43, p. 99-107, 2000.

ATELLA, G.C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Metabolismo de lipídios em insetos. INCT. Capítulo 6, 22p., 2012.

ATKINSON P.; W.; BINNINGTON K. C. New evidence on the function of the porose areas of ixodid ticks. **Experientia**, v. 29, p. 799-800, 1973.

BAGHERWAL, R.K.; SISODIA, R.S.; SHARMA, A.; DHANOTIYA, R.S.; GHOSAL, S.B.; ASHOK, S. In vitro studies on the susceptibility of the tick *Hyalomma anatolicum* to acaricides using FAO test kit. **Indian Veterinary Journal**,v. 72, p. 332-335, 1995.

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

BALLESTER A. R.; LAFUENTE M. T.; GONZÁLEZ-CANDELAS L. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, n. 2, p. 115-124, 2006.

BALLESTER A. R.; LAFUENTE M. T.; GONZÁLEZ-CANDELAS L. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part II: gene expression and metabolite accumulation in the response of fruits to *Penicillium digitatum* infection. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 285-291, 2013.

BARKER, S.C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. In A.S. Bowman and P.A. Nuttall (Eds.), Ticks. Biology, Disease and Control. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p. 1-39, 2008.

BARRE, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue scientifique et technique**, v. 29, n. 1, p. 149-160, 2010.

BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. In Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Berger RG. Ed. Springer, Berlin. p. 43-86, 2007.

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

BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks - a systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47-54, 2018.

BICKERS, D.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 799-836, 2005.

BOOTH, T. F. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v.14, p. 137-49, 1992.

BROWN H. A.; MINOTT D. A.; INGRAM C. W.; WILLIAMS L. A. D. Biological activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 18, p.9-16, 1998.

CABRAL, G.A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sciences**, v.77, p. 1699-1710, 2005.

CAJUSTE J. F.; LAFUENTE M. T. Ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting as related to phenolic metabolism and lignin content in 'Navelate' fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 193-203, 2007.

CAMPOS, E.; MORAES, J.; FAÇANHA, A.R.; MOREIRA, E.; VALLE, D.; ABREU, L.; MANSO, P.P.A.; NASCIMENTO, A.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H.; MASUDA, A.; VAZ JR, I.S.; LOGULLO, C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**, v.138, p. 349-357, 2006.

CAMPOS, E.V.; PROENÇA, P.L.; OLIVEIRA, J.L.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P.; FRACETO, L.F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: future perspectives. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 483-495, 2018.

CANAVOSO, L.E.; KARNAS, J. K.; JOUNI, Z.E.; PENNINGTON, J.E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 23-46, 2001.

CARDOSO, A.S.; SANTOS, E.G.G.; LIMA, A.S.; TEMEYER, K.B.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; COSTA, L.M.; SOARES, A. M.S. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Veterinary Parasitology**, v. 280, 109090, 2020.

CAROLL, J.F.; PALUCH, G.; COATS, J.; KRAMER, N. Elemol and amyris oil repel the ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in laboratory bioassays. **Experimental and Applied Acarology**, v. 51, p. 383-392, 2010.

CASIDA, J.E.; GAMMON, D.W.; GLICKMAN, A.H.; LAWRENCE, L.J. Action of Pyrethroid. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 23, p. 413-38, 1983.

CHAGAS, A.C.D.; GEORGETTI, C.S.; DE CARVALHO, C.O.; OLIVEIRA, M.C.D.; RODRIGUES, R.A.; FOGLIO, M.A.; DE MAGALHAES, P.M. In vitro activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 31-35, 2011.

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, n. 3, p. 427-432, 2016.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Use of eugenol-lean clove extract as a flavoring agent and natural antioxidant in mayonnaise: product characterization and storage study. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 8, p. 4945- 4954, 2015

CHEN, A.C.; HE, H.Q.; DAVEY, R.B. Mutations in a putative octopaminereceptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 379-383, 2007.

CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; HUANG, C.G.; HSU, Y.R.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 100, 457-464, 2009.

CHERRY, L.M. Utilization of Cholesterol by the Cattle Tick *Boophilus microplus*: Cholesterol Economy in the Engorged Female Adult. **Insect Biochemistry**, v. 6, pp. 587-594, 1976.

CHEVILLON, C.; DUCORNEZ, S.; DE MEEUS, T.; KOF, B.B.; GAIA, H.; DELATHIERE, J.M.; BARRE, N. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 276-288, 2007.

CHINZEI, Y.; YANO, I. Vitellin is the Nutrient Reserve During Starvation in the Nymphal Stage of a Tick. **Experientia**, v. 41, p. 948-950, 1985.

CLARK, A. J.; BLOCK, K. The absence of sterol synthesis in insects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, p. 2578-2582, 1959.

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

COHEN, E. *Fat body*. In: Resh, V.H.; Cardé, R.T. *Encyclopedia of Insects*. 2ed: London, Academic Press. 1024p, 2009.

COMISSÃO EUROPEIA (EU PESTICIDES DATABASE). Disponível em: <<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=899>>

CONDER, G.A.; CAMPBELL, W.C. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**, v.35, p.1-83, 1995.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; MILLER, R.J.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; LI, A.Y.; PÉREZ DE LEÓN, A.A. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60-64, 2016.

CORDOVÉS, C.O. Carrapato: controle ou erradicação. 1ª ed. Guaíba: Agropecuária. 176p., 1997.

COUNCIL OF EUROPE. Partial Agreement in the Social and Public Health Field. Chemically-defined Flavouring Substances. Groups: 2.2 aromatic alcohols, 5.2 aromatic aldehydes, 8.2 aromatic acids. Pages 74, 119, 205. Numbers, 22, 65, 102. Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2000.

CROSS, D. A. E.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen-synthase kinase-3 by insulin-mediated by protein-kinase- B. **Nature**, v.378, n.6559, p.785-789, 1995.

CONWAY, G. R.; COMINS, H. N. Resistance to pesticides. 2. Lessons in strategy from mathematical models. *Span*, v. 22, n.2 p. 53-55, 1979.

DA SILVA LIMA, A.; DE CARVALHO, J.F.; PEIXOTO, M.G.; BLANK, A.F.; BORGES, L.M.F.; COSTA JUNIOR, L.M. Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 73-77, 2016.

DAMASCENO, S.R.B.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; CARVALHO, N.S.; BRITO, C.F.C.; SILVA, I.S.; SOUSA, F.B.M.; SILVA, R.O.; SOUSA, D.P.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V.R. Carvacryl acetate a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, p. 58-66, 2014.

DAVIS, M.T.B. Critical temperature and changes in cuticular lipids in the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, p.1087 to 1100, 1974.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS T.F.; MUÑOZ-LEAL, S.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 10, 101252, 2019.

DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 275-283, 2006.

DE QUEIROZ, V.T.; CAMPOS, N.C.; NUNES, E.T.; COSTA, A.V.; COELHO, J.D.; TRIVILIN, L.O.; MELO, D.C.A.; MORAIS, P.A.B.; MARTINS, I.V.F. 1,8-cineole and castor oil in sodium lauryl ether sulphate disrupt reproduction and ovarian tissue of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, 12444, 2020.

DEL FABBRO, S.; NAZZI, F. Correction: From Chemistry to Behavior. Molecular Structure and Bioactivity of Repellents against *Ixodes ricinus* Ticks. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; MATHIAS, M. I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 39, n. 7, p. 875-83, 2008.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 462-470, 2010.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, I.M. Inhibitory Action of Neem Aqueous Extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the Vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, p. 889-899, 2011.

DÍAZ-MARTÍN, V.; MANZANO-ROMÁN, R.; OBOLO-MVOULOUGA, P.; OLEAGA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: an update. **Ticks Tick-borne Diseases**, v. 6, n 3, 211-220, 2015.

DIETRICH, G.; DOLAN, M.C.; PERALTA-CRUZ, J.; SCHMIDT, J.; PIESMAN, J.; EISEN, R.J.; KARCHESY, J.J. Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis ootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, p. 57-961, 2006.

DINIZ, J.A. *Siparuna guianensis* Aublet como nova fonte de α -bisabolol para o controle de *Rhipicephalus microplus*. Dissertação de Mestrado. 94p. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2014.

DJOUAHRI, A., BOUDARENE, L., MEKLATI, B.Y. Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algeria *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 32-36, 2013.

EL-WAKEIL, N.E. Botanical pesticides and their mode of action. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, p. 125-149, 2013.

ELLIOTT, M. Chemicals in insect control. In: Casida, J.E., Quistad, G.B. (Eds.), *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. Oxford University Press, New York, pp. 3-31, 1995.

ELOH, K.; KPEGBA, K.; SASANELLI, N.; KOUMAGLO, H.K.; CABONI, P. Nematicidal activity of some essential plant oils from tropical West Africa. **International Journal of Pest Management**, v. 66, n. 2, p. 131-141, 2019.

EMBI, N.; RYLATT, D. B.; COHEN, P. Glycogen-synthase kinase-3 from rabbit skeletal-muscle-separation from cyclic-amp-dependent protein-kinase and phosphorylase-kinase. **European Journal of Biochemistry**, v.107, n.2, p.519-527, 1980.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL (EMATER). Projeto Plantas Potenciais, Medicinais e Aromáticas. Disponível em: <http://www.emater.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=53>> Acesso em: 28 de junho de 2020.

ENAN, E.E. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem. Molecular Biology*, v. 35, p. 309-321, 2005a.

ENAN, E.E. Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 59, p. 161-171, 2005b.

ENAYATI, A.A.; ASGARIAN, F.; AMOUEI, A.; SHARIF, M.; MORTAZAVI, H.; BOUJH-MEHRANI, H.; HEMINGWAY, J. Pyrethroid insecticide resistance in *Rhipicephalus bursa* (Acari: Ixodidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 97, p. 243-248, 2010.

EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Disponível em: <https://ecotox.ipmcenters.org/index.cfm?menuid=5>>.

ESTRADA-PENA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J.L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A.R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental & applied acarology*, v. 38, n. 2-3, p. 219-235, 2006.

FACEY, P.C.; PORTER, R.B.R.; REESE, P.B.; WILLIAMS, L.A.D. Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4774-4777, 2005.

FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association). Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the Food Additives Amendment. 3. Gras Substances. *Food Technology*, v. 19, 151-197, 1965.

FERRARINI, S.R.; DUARTE, M.O.; DA ROSA, R.G.; ROLIM, V.; EIFLER-LIMA, V.L.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V.L.S. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 157, p.149–153, 2008.

Ferreira, F.M.; DELMONTE, C.C.; NOVATO, T.P.L.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; VILELA, F.M.P.; AMARAL, M.P.H. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, v.32, n.1, p 41-47, 2017.

FRENCH-CONSTANT, R.H.; DABORN, P.J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*, v. 20, p. 163-70, 2004.

FIGUEIREDO, A.; NASCIMENTO, L.M.; LOPES, L.G.; GIGLIOTI, R.; ALBUQUERQUE, R.D.D.G.; SANTOS, M.G.; FALCAO, D.Q.; NOGUEIRA, J.A.P.; ROCHA, L.; CHAGAS, A.C.S. First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 252, p.131-136, 2018.

FLOR-WEILER, L.B.; BEHLE, R.W.; STAFFORD, K.C. Susceptibility of four tick species, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, *Ixodes scapularis*, and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), to nootkatone from essential oil of grape-fruit. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 322-326, 2011.

FOIL, L.D.; COLEMAN, P.; EISLER, M.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; GARCIA VAZQUEZ, Z.; GUERRERO, F.D.; JONSSON, N.N.; LANGSTAFF, I.G.; LI, A.Y.; MACHILA, N.; MILLER, R.J.; MORTON, J.; PRUETT, J.H., TORR, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p.163-181, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION (FAO) (Roma, Itália). Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Roma: Food and Agriculture Organisation, Animal Production and Health Division, 2004. 53 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. <http://www.fao.org/home/en/> (accessed 11 de dezembro de 2018).

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of Essential Oils. In Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. In: K Hüsnü Can Baser and Gerhard Buchbauer. CRC Press, New York, p.39-81, 2009.

FRIESEN, K.J.; KAUFMAN, W.R. Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v.48, n.8, p.773-782, 2002.

FRIESEN, K.; KAUFMAN, W.R. Effects of 20-hydroxyecdysone and other hormones on egg development, and identification of a vitellin-binding protein in the ovary of the tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v.50, n.6, p.519-529, 2004.

FRIESEN K.J.; KAUFMAN W.R. Salivary gland degeneration and vitellogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*: Surpassing a critical weight is the prerequisite and detachment from the host is the trigger. **Journal of Insect Physiology**, v.55, n.10, p.936-942, 2009.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 245-254, 1990.

FURLONG, J. Carrapato: problemas e soluções. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Vetetária**, 27: 1-7, 2007.

GAUDÊNCIO, F.N. 2016. Efeito do fluazuron sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Tese de Doutorado. 88p. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: BOWMAN, A. S.; NUTTALL, P. A. Ticks: biology, disease and control. Cambridge. University Press, 415-416 p., 2008.

GEORGE, D.R.; FINN, R.D.; GRAHAM, K.M.; OLIVIER, S.A.E.O. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. **Parasites Vectors**, v.7, p.1-28, 2014.

GILBERT, L.I.; CHINO, H. Transport of lipids in insects. **Journal of Lipid Research**, v. 15, p. 439-456, 1974.

GONZALES, J. C. O controle dos carrapatos do boi. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; YADAV, M.P. Upcoming and future strategies of tick control: a review. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, p. 79-89, 2007.

GRAF, J. F.; GOGOLEWSK, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G. A.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G. J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, p. 427-442, 2004.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; CANCADO, P. H. D. Reassessment of economic impact by cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

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

GUERRERO, F.D.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 44-50, 2001.

GUDDERRA, N.P.; SONENSHINE, D.E.; APPERSON, C.S.; ROE, R.M. Tissue distribution and characterization of predominant hemolymph carrier proteins from *Dermacentor variabilis* and *Ornithodoros parkeri*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 161-70, 2002.

GUERRERO, F.D.; DE LEÓN, A.A.P.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; JONSSON, N.N.; MILLER, R.J.; ANDREOTTI, R. Acaricide research and development, resistance, and resistance monitoring. In: Sonenshire DE, Roe RM, editors. Biology of Ticks. Volume 2. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2014.

GUIZZO, M.G.; ABREU, L.; MASUDA, A.; LOGULLO, C.; VAZ JUNIOR, I.S. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.40, n.1, p.1-12, 2012.

GURR, G.M.; KVEDARAS, O.L. Synergizing biological control: scope for sterile insect technique, induced plant defences and cultural techniques to enhance natural enemy impact. **Biological Control**, v. 52, p. 198-207, 2010.

HANIFAH, A.L.; AWANG, S.H.; MING, H.T.; ABIDIN, S.Z.; OMAR, M.H. Acaricidal activity of *Cymbopogon citratus* and *Azadirachta indica* against house dust mites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 5, p. 365-369, 2011.

HARRIS, R.A.; KAUFMAN, W.R. Neural involvement in the control of salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Experimental Biology**, v.109, p. 281-290, 1984.

HARRIS, R.A.; KAUFMAN, W.R. Ecdysteroids: possible candidates for the hormone which triggers salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Experientia**, v.41, n.6, p.740-742, 1985.

HENNESY, D.R. Physiology, pharmacology and parasitology. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 145-52, 1997.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, R. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 326-333, 2015.

HIGA, L.D.O.S.; GARCIA, M.V.; RODRIGUES, V.D.S.; JUNIOR, P.B.; BARRADAS PINA, F.T.; BARROS, J.C.; ANDREOTTI, R. Effects of cypermethrin, chlorpyrifos and piperonyl butoxide-based pour-on and spray acaricides on controlling the tick *Rhipicephalus microplus*. **Systematic and Applied Acarology**, v. 24, p.278–286, 2019.

HOOTH, M.J.; SILLS, R.C.; BURKA, L.T.; HASEMAN, J.K.; WITT, K.L.; OREZECH, D.P.; GRAVES, S.; BUCHER, J.R. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated transcinnamaldehyde in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1757-1768, 2004

HORIGANE, M.; OGIHARA, K.; NAKAJIMA, Y.; SHINODA, T.; TAYLOR, D. Cloning and expression of the ecdysteroid receptor during ecdysis and reproduction in females of the soft tick. *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Insect Molecular Biology**, v.16, n. 5, p.601-612, 2007.

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

IRITI, M.; FAORO, F. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3371-3399, 2009.

IWUALA, M.; UMEZURIKE, G.M.; NWADIOGBU, N. A qualitative study of the lipid components of eggs of *Boophilus decoloratus* KOCH (Ixodoidea Ixodidae). **Acarologia**, v.21, p. 3-4, 1979.

JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), 2000. Cinnamaldehyde and related flavouring agents. WHO Food Additives Series: 46. Prepared by the Fifty-fifth meeting of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives, June 6–15, Geneva, Switzerland. World Health Organization.

JECFA, 2020. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Disponível em: < <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-flav/en/>>.

JETTER, K.; PAINE, T.D. Consumer preferences and willingness to pay for biological control in the urban landscape. **Biological Control**, v. 30, p. 312–322, 2004.

JIA, M; HE, QI.; WANG, W.; DAI, J.; ZHU, L. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 59-66, 2018.

JONSSON, N.N.; MAYER, D.G.; MATSCHOSS, A.L. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v.78, p. 5-77, 1998.

JONSSON, N.N.; DAVIS, R.; WITT, M.D. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, p. 826-831, 2001.

JONSSON, N. N.; KLAFKE, G.; CORLEY, S. W.; TIDWELL, J.; BERRY, C. M.; KOHTAN, H. H. C. Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 23, n. 2, p. 796-810, 2018.

JORDAN, R.A.; SCHULZE, T.L.; DOLAN, M.C. Efficacy of plant-derived and synthetic compounds on clothing as repellents against *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, p. 101-106, 2012.

JYOTI.; SINGH, N.K.; SINGH, H.; MEHTAB, N.; RATH, S.S. In vitro assessment of synergistic combinations of essential oils against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 201, 42-48, 2019.

KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabololrich oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KAUFMAN, W.R. Correlation between haemolymph ecdysteroid titre, salivary gland degeneration and ovarian development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum* Koch. **Journal of Insect Physiology**, v.37, n.2, p.95-99, 1991.

KEPA, M.; MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, M.; WOJTYCZKA, R.D.; IDZIK, D.; KORZENIOWSKI, K.; SMOLEŃ-DZIRBA, J.; WAŚSIK, T.J. Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. **BioMed Research International**, v.2018, p. 1-9, 2018.

KIM, N.; LEE, D. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 982, p. 31-47, 2002.

KIM, E.; MOORE, B.S.; YOON, Y.J. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. **Nature Chemical Biology**, v. 11, p. 649-659, 2015.

KHATER, H.F. Ecosmart biorational insecticides: Alternative insect control strategies In: PERVEEN, F. Insecticides Advances in Integrated Pest Management, Cap 2, 2012.

KHETRAPAL, M.; VODWAL, L. Botanical pesticides: An upcoming tool for plant protection **International Journal of Advanced Research**, v. 4, p. 1778-1784, 2016.

KISS, T.; CADAR, D.; SPÎNU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 357-66, 2012.

KIYAMA, R. Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, p. 405-415, 2017.

KLAFKE, G.M.; SABATINI, G.A.; ALBUQUERQUE, T.A.; MARTINS, J.R.; KEMP, D.H.; MILLER, R.J.; SCHUMAKER, T.T.S. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.386-390, 2006.

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B.D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L.H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M.F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state Southern Brazil. **Ticks Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p.73-80. 2017

KLUCK, G.E.G.; SILVA CARDOSO, L.; DE CICCIO, N.N.T.; LIMA, M.S.; FOLLY, E.; ATELLA, G.C. A new lipid carrier protein in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, p. 850-859, 2018.

KOUL, O.; DHALIWAL, G.S.; MARWAHA, S.S.; ARORA, J.K. Future perspectives in biopesticides. In: KOUL, O.; DHALIWAL, G.S.; MARWAHA, S.S.; ARORA, J.K. Biopesticides and Pest Management. (eds.), vol.1, Campus Books International, New Delhi, pp. 386-388, 2003.

KORKINA, L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, v. 53, p. 15-25, 2007.

KUMBHAR, P., DEWANG, P.M. Monoterpenoids: thenatural pest management agents. **Flavor and fragrance Industry of India**, v. 3, p. 49-56, 2001.

LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti, D.M.B.; Arzua, M.; Bechara, G.H (eds). Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan. pp. 155-164, 2006.

LABRUNA, M.B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. .; THOMPSON, C.; ESTRADA-PENA, A.; GUGLIELMONE, A.; JONGEJAN, F.; FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Boophilus microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 46, 2009.

LAGE, T.C.A.; MONTANARI, R.M.; FERNANDES, S.A.; MONTEIRO, C.M.O.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R.S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 124-129, 2015.

LE GALL, V.L.; KLAFKE, G.M.; TORRES, T.T. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Scientific Reports**, v.8, p.12401, 2018.

LEBOUVIER, N.; HUE, T.; HNAWIA, E.; LESAFFRE, L.; MENUT, C.; NOUR, M. Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1379-1384, 2013.

LEBOUVIER, N.; HUE, T.; BROPHY, J.; HNAWIA, E.; NOUR, M. Chemical composition and acaricidal activity of *Nemuaron vieillardii* essential oil against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Natural Product Communications**, v. 11, p. 1919-1922, 2016.

LEITE, G.O.; LEITE, L.H.I.; SAMPAIO, R.S.; ARARUNA, M.K.A.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; CAMPOS, A.R. (-)- α -bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia**, v. 82, p. 208-211, 2011.

LEHNINGER, A., L. Bioquímica. Ed. Edgar Blücher, São Paulo: Segunda Edição, v.1, 1232 p, 1984.

LEES, A. D.; BEAMENT J.W.L. An egg-waxing organ in ticks. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 89, p. 291-332, 1948.

LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J.; GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 2, p. 193-200, 2004.

LI, X; SCHULER, M.A; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 231-253, 2007.

LIPOVSEK, S.; NOVAK, T.; JANZEKOVIC, F.; PABST, M.A. Role of the fat body in the cave crickets *Troglophilus cavicola* and *Troglophilus neglectus* (Raphidophoridae, Saltatoria) during overwintering. **Arthropod Structure & Development**, v. 40, p. 54-63, 2011.

LOGULLO, C.; MORAES, J.; DANSA-PETRETSKI, M.; DA-SILVA-VAZ, JR.I.; MASUDA, A.; SORGINE, M.H.F.; BRAZ, G.R.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1805-1811, 2002.

LOMAS, L.O.; KAUFMAN, W.R. An indirect mechanism by which a protein from the male gonad hastens salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.21, n.3, p.169-178, 1992.

LEW-TABOR, A.E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 573-585, 2016.

LÓPEZ-BUCIO, J.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G.; RAMIREZ-CHÁVEZ, E. MOLINA-TORRES, J. HERRERA-ESTRELA, L. Novel signals for plant development. **Plant Biology**, v. 9, p. 523-529, 2006.

LÓPEZ, M.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 284-288, 2010.

LOVIS, L.; MENDES, M.C.; PERRET, J.L.; MARTINS, J.R.; BOUVIER, J.; BETSCHART, B., SAGER, H. Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 323-331, 2013.

MADZIMURE, J.; NYAHANGARE, E.T.; HAMUDIKUWANDA, H.; HOVE, T.; STEVENSON, P.C.; BELMAIN, S.R.; MVUMI, B.M. Acaricidal efficacy against cattle ticks and acute oral toxicity of *Lippia javanica* (Burm F.) Spreng. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 481-489, 2011.

MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in plant Science**, v. 7, p. 366-373, 2002.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; CASTILLO-HERRERA, G.; ROSARIO-CRUZ, R.; FLORES-FERNANDEZ, J.; LOPEZ-RAMIREZ, J.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; LUGO-CERVANTES, E.C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae). **Parasitology Research**, v.108, p. 481-487, 2011.

MARECHAL, E.; RIOU, M.I.; KERBOEUF, D.; BEUGNET, F.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P.M. Membrane lipidomics for the discovery of new antiparasitic drug targets. **Trends in Parasitology**, v.27, n.11, 2011.

MARTÍNEZ, M.J.A.; OLMO, L.M.B.D.; TICONA, L.A.; BENITO, P.B. The Artemisia L. genus: a review of bioactive sesquiterpene lactones. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 37, p. 43-65, 2012.

MATHELA, C.S.; SINGH, K.K.; GUPTA, V.K. Synthesis and In Vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v. 67, p.375-380, 2010.

MATIAS, J.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Classificação, distribuição geográfica, ciclo biológico e importância econômica das principais espécies de carrapatos no Brasil. In: Andreotti, R.; Koller, W.W. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas. Campo Grande: Embrapa, 2013.

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

MATOS, R.S.; DELMONTE, C.; MARCHESINI, P.; MONTEIRO, C.M.O.; SAMPIERI, B.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 10, p. 314-320, 2019.

MATOS, R.S.; ROSA, P.; BRITO, L.C.M.; PAULA, L.G.F.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol: effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 11(1), 101308, 2020.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n.2, p. 231-238, 2003.

MELO, M. M.; DE OLIVEIRA, N. J. F.; LAGO, L. A. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e gatos. Parte II: amitraz, estricnina, fluoracetado de sódio e fluoracetamida, rodenticidas anticoagulantes e avermectinas. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 3, p. 259-267, 2002.

MENDES, M.C.; LIMA, C.K.; NOGUEIRA, A.H.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D.P.; GABRIEL, F.H.; UENO, T.E.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 383-388, 2011.

MENDONÇA, A.É.; MOREIRA, R.G.; AMARAL, M.P.H.; MONTEIRO, C.M.O.; MELLO, V.; VILELA, F.M.P.; HOMEM, F.C.M.; FURLONG, J.; DOLINSKI, C.; PRATA, M.C.A.; CHAGAS, E.F. Entomopathogenic nematodes in pharmaceutical formulations for *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) control: In vitro evaluation of compatibility, thermotolerance, and efficiency. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 781-786, 2019.

MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 36, p. 533-538, 1999.

MILLS, C.; CLEARY, B.J.; GILMER, J.F.; WALSH, J.J. 2004. Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 375-79, 2004.

MIRESMAILLI, S., ISMAN, M.B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 29-35, 2014.

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

MONTEIRO, I.N.; MONTEIRO, O.D.S.; COSTA-JUNIOR, L.M.; DA SILVA, L.A.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; MOUCHREK FILHO, V.E. Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 54-57, 2017.

MONTEIRO, C.; COELHO, L.; PAULA, L.G.L.F.; FERNANDES, É.K.K.; DOLINSKI, C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Efficacy of entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulation against engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in semi-field conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, XX, 2019.

MORADI-AFRAPOLI, F.; EBRAHIMI, S.N.; SMIESKO, M.; RAITH, M.; ZIMMERMANN, S.; NADJAFI, F.; BRUN, R.; HAMBURGER, M. Bisabololoxide derivatives from *Artemisia persica*, and determination of their absolute configurations by ECD. **Phytochemistry**, v. 85, p. 143-52, 2013.

MOSSA, A.T.H. Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, p. 354-378, 2016.

MURRELL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

MYANGAR, K.N.; PATEL, N.H. Synthesis and in vitro antibacterial activity of new. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 67, p. 1-6, 2011.

NATELLA, F., M. NARDINI, M. DI FELICE, AND C. SCACCINI. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1453-9, 1999.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2857-2877, 2009.

NEESE, P. A.; SONENSHINE, D. E.; KALLAPUR, V. L.; APPERSON, C. S.; ROE, R. M. Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae) and *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.4, p.477-490, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª ed. Porto Alegre: W.H. Freeman, 2014. 1220 p.

NOCITO, I.; CASTELLI, M.V.; ZACCHINO, S.A.; SERRA, E. Activity of 8.O.4'-neolignans against *Trypanosoma cruzi*, *Parasitol. Parasitology Research*, v. 101, p. 1453-1457, 2007.

NOVATO, T.; ARAUJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 331-335, 2015.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno. 1. ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982.

NWANADE, C.F.; WANG, M.; WANG, T.; YU, Z.; LIU, J. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, p. 1-35, 2020.

OLIVEIRA, A.D.; RIBEIRO, I.S.A.; SCOLFORO, J.R.S.; MELLO, J.M.; ACERBI JR.; F.W.A.; CAMOLESI, J.F. Market chain analysis of Candeia Timer (*Eremanthus erythropappus*). Lavras. **Cerne**, v. 15, p. 257-264, 2009.

ORTIZ, E.M.; SANTAMARIA, V.M.; ORTIZ, N.A.; SOBERANES, C.N.; OSORIO, M.J.; FRANCO, B.R.; MARTINEZ, I.F.; QUEZADA, D.R.; FRAGOZO, S.H. In: RODRIGUEZ, C.; SERGIO, D.; FRAGOSO, H.; ACAPULCO, G. (Eds.), *Caracterización de la resistencia de B. microplus en Mexico*, Mexico, pp.58-70, 1995.

OZCAN, M.; CHALCHAT, J.C. Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. **Annals of Microbiology**, v.56, p.353-358, 2006.

PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H., BENELLI, G. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: a review. **Research in Veterinary Science**, v. 109, p. 1-9, 2016.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Science**, v. 21, p. 1000-1007, 2016.

PEIXOTO, M.G.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; BLANK, A.F.; LIMA, A.S.; MENEZES, T.S.A.; SANTOS, D.A.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BACCI, L.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, p. 118-122, 2015.

PEREIRA, M.C. Introdução. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET. pp.1-5, 2008.

PRIESTLEY, C.M.; BURGESS, I.F.; WILLIAMSON, F.M. Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. **Fitoterapia**, v. 77, p. 303-309, 2006.

POHLIT, A.M.; REZENDE, A.R.; BALDIN, E.L.L.; LOPES, N.P.; NETO, V.F.A. Plant extracts, isolated phytochemicals, and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases-a review. *Planta Med.*, 77(6):618-630, 2011.

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

PUBCHEM, 2020a. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637511>>.

PUBCHEM, 2020b. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10586>>.

RAIA, V.A.; CARVALHO FILHO, P.R.; PEDRENHO, A.R.; FLAUSINO, Walter; FAMADAS, K.M.. Quantitative and Qualitative Evaluation of the Egg Proteins of *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) During Oviposition. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, p. 177-182, 2012.

RAMÍREZ, C.; IBARRA, F.; PÉREZ, H.I.; MANJARREZ, N.; SALGADO, H.J.; ORTEGA, L. Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, p. 72-77, 2016.

RAVINDRAN, R.; JYOTHIMOL, G.; AMITHAMOL, K.K.; SUNIL, A.R.; CHANDRASEKHAR, L.; LENKA, D.R.; AMRITHA, A.; SREELEKHA, K.; SATHISH, N.; UDAYAN, D.; KRISHNA, T.P.A.; DIVYA, T.M.; JULIET, S.; KUMAR, K.G.A., NAIR, S.N.; GHOSH, S. In vitro efficacy of amitraz, coumaphos, deltamethrin and lindane against engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* and *Haemaphysalis bispinosa* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 75, p.241-253, 2018.

RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J.S.; 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, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: lowrisk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p 405-424, 2012.

RIBEIRO, V.L.S.; ROLIM, V.; BORDIGNON S.; HENRIQUES, A.T.; DORNELES, G.G.; LIMBERGER, R.P.; VON POSER, G. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus*) and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v. 102, p. 531-535, 2008.

RIBEIRO, V.L.S.; DOS SANTOS, J.C.; MARTINS, J.R.; SCHRIPEMAD, J.; SIQUEIRA, I.R.; VON POSERB, G.L.; APEL, M.A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 195-198, 2011.

RIBEIRO, C.S. Mecanismo de defesa de ixodídeos à infecção fúngica: cutícula, a primeira barreira. Dissertação Mestrado. 84p. Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil, 2018.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; HODGKINSON, J.E.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; VILLEGAS-PEREZ, S.L.; TREES, A.J. The prevalence of pyrethroid resistance phenotype and genotype in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Yucatan, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 221-229, 2012.

ROMERO, A.; BENAVIDES, E.; HERRERA, C.; PARRA, M.H. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas organofosforados y piretroides sintéticos en el departamento del Huila. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 23, p. 9-17, 1997.

ROE, R. M.; DONOHUE, K. V.; KHALIL, S. M. S.; SONENSHINE, D. E. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v.13, p.7250-7268, 2008.

ROSADO-AGUILAR, J.A.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BORGES-ARGAEZ, R.; GARCÍA-VÁZQUEZ, Z.; MÉNDEZ-GONZÁLEZ, M. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) by larval immersion test. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, n. 2, p. 417-422, 2010.

ROSADO-AGUILAR, J.A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; ORTEGA-PACHECO, A., ALZINA-LÓPEZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR-CABALLERO, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66-76, 2017.

ROSARIO, C.R.; MIRANDA, M.E.; GARCIA, V.Z.; ORTIZ, E.M. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, p. 197-202, 1997.

ROSELL, R.; COONS, L.B. Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodidae) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Medical Entomology**, v.28, p.41-44, 1991a.

ROSELL, R.; COONS, L. B. Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry**. v.21, n.8, p.871-885, 1991b.

SAMPIERI, B. R.; ARNOSTI, A.; NUNES, P. H.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged

Rhipicephalus sanguineus female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 683-690, 2012.

SCHNITZERLING, H.J.; NOLAN, J.; HUGHES, S. Toxicology and metabolism of isomers of flumethrin in larvae of pyrethroid susceptible and resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 6, p. 47-54, 1989.

SCHULZE, T.L.; JORDAN, R.A.; DOLAN, M.C. Experimental use of two standard tick collection methods to evaluate the relative effectiveness of several plant-derived and synthetic repellents against *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Economic Entomology**, v.104, p. 2062-2067, 2011.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; SILVA, V.B.; SANTOS, S.R.L.; CAVALCANTI, S.C.H.; MENDONÇA, F.B.M.J.R. Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.10, n. 2, p. 201-210, 2014.

SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONIA, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; VAZ JR., I.S. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.148, p. 149-156, 2012.

SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, 1461-1466, 2013a.

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

SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNES, M.W.F.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149-1166, 2005.

SHREAZ S.; SHEIKH R.A.; BHATIA R.; NEELOFAR K.; IMRAN S.; HASHMI A.A.; MANZOOR N.; BASIR S.F.; KHAN L.A. Antifungal activity of α -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. **BioMetals**, v. 24, p. 923-933, 2011.

SILVA W.C.; MARTINS J.R.S.; DE SOUZA H.E.M.; HEINZEN, H.; CESIO M.V.; MATO, M., ALBRECHT F.; DE AZEVEDO J.L.; DE BARROS, N.M. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon Forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 267-274, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, p. 403, 498, 2003.

SINGH, N. K.; MILLER, R. J.; KLAFKE, G. M.; GOOLSBY, J. A.; THOMAS, D. B.; PEREZ DE LEON, A. A. In-vitro efficacy of a botanical acaricide and its active ingredients against larvae of susceptible and acaricide-resistant strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 9, p. 201-206, 2018.

SOARES, S.F.; BORGES, L.M.F.; DE SOUSA BRAGA, R.; FERREIRA, L.L.; LOULY, C.C.B.; TRESVENZOL, L.M.F.; DE PAULA, J.R.; FERRI, P.H. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 67-73, 2010.

SONENSHINE, D.E. The Biology of Ticks. 1. Ed. Oxford University Press, New York, USA, 1991.

SONENSHINE, D.E. Tick pheromones and their use in tick control. *Ann. Rev. Entomol.* 51, 557-580, 2006.

SONENSHINE, D. E. e ROE, R. M. *Biology of Ticks*, New York, 2013.

SOULAGES, J. L.; WELLS, M. Lipophorin: The structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 371-415, 1994a.

SOULAGES, J.L.; WELLS, M.A. Effect of diacylglycerol content on some physicochemical properties of the insect lipoprotein, lipophorin: Correlation with the binding of apolipophorin-III. **Biochemistry**. v. 33, p. 2356-2362, 1994.

SUN, Y.; XU, R.; LIU, Z.; WU, M.; QIN, T. *Ornithodoros (Ornithodoros) huajianensis* sp. nov. (Acari, Argasidae), a new tick species from the Mongolian marmot (*Marmota bobak sibirica*), Gansu province in China. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 209-217, 2019.

SUTHERST, R.W.; WAGLAND, B.M.; ROBERTS, J.A. The effect of density on the survival of *Boophilus microplus* on previously unexposed cattle. **International journal for parasitology**, v. 8, n. 4, p. 321-324, 1978.

TABANCA, N.; WANG, M.; AVONTO, C.; CHITTIBOYINA, A.G.; PARCHER, J.F.; CARROLL, J.F.; KRAMER, M.; KHAN, I.A. Bioactivity-guided investigation of geranium essential oils as natural tick repellents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4101-4107, 2013.

TABOR, A. E.; ALI, A.; REHMAN, G.; ROCHA GARCIA, G.; ZANGIROLAMO, A.F.; MALARDO, T.; JONSSON, N.N. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 506, 2017.

TEIXEIRA, J.G.; LATORRACA, J.V.F.; TREVISAN, H.; PAE, J.B. Efficiency of neem oil and *Eremanthus erythropappus* residues on the xylophagus fungi inhibition. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 106, p. 417-426, 2015.

THOMPSON, D. M.; KHALIL, S.M.S.; JEFFERS, L.A.; SONENSHINE, D.E.; MITCHELL, R.D.; OSGOOD, C.J.; ROE, R.M. Sequence and the developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin messenger RNA from ticks responsible for heme sequestration. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 363-374, 2007.

THOMPSON, D.M.; KHALIL, S.M.S.; JEFFERS, L.A.; ANANTHAPADMANABAN, U.; SONENSHINE, D.; MITCHELL, R.D.; OSGOOD, C.J.; APPERSON, C.S.; ROE, M.R. In vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Insect Physiology**, v.51, n.10, p.1105-1116, 2005.

TOMLINSON, J.A.; APANASKEVICH, D.A. Two new species of *Haemaphysalis* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) in the *H. (Rhipistoma) spinulosa* subgroup, parasites of carnivores and hedgehogs in Africa. **Systematic Parasitology**, v. 96, p. 485-509, 2019.

VENDRAMINI, M.C.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FARIA, A.U.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; ROMA, G.C. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semiengorged females. **Parasitology Research**, v. 111, p.1885-1894, 2012.

VENZAL, J.M.; CASTILLO, G.N.; GONZALEZ-RIVAS, C.J.; MANGOLD, A.J.; NAVA, S. Description of *Ornithodoros montensis* n. sp. (Acari, Ixodida: Argasidae), a parasite of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura: Bufonidae) in the Monte Desert of Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 78, p. 133-147, 2019.

VIJVERBERG, H. P. M.; VAN DER ZALM, J. M.; VAN DEN BERCKEN, J. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. **Nature**, v. 295, n. 5850, p. 601-603, 1982.

VILLARINO, M.A.; WAGHELA, S.D.; WAGNER, G.G. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 52-57, 2003.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. 367-387, 2004.

WUYTS, N.; SWENNEN, R.; DE WAELE, D. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 8, p. 89-101, 2006.

XAVIER, M.A.; TIRLONI, L.; PINTO, A.F.M.; DIEDRICH, J.K., YATES III, J.R.; GONZALES, S.; FARBER, M.; VAZ JR, I.S.; TERMIGNONI, C. Tick Gene's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 787-797, 2019.

YU, Z.J.; WANG, H.; WANG, T.H.; SUN, W.Y.; YANG, X.L.; LIU, J.Z. Tick-borne pathogens and the vector potential of ticks in China. **Parasites Vectors** v. 8, n 24, 2015.

ZERINGÓTA, V.; SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; FAZZA, A.P.; CATUNDA-JR., F.E.A.; MONTEIRO, C.M.O.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 2675-2679, 2013.

ZERINGÓTA, V.; OLIVEIRA FILHO, J.G.; BORGES, L.M. F. . Activation of the ambusher tick (Acari: Ixodidae) exposed to different stimuli. **Medical and Veterinary Entomology**, p. mve.12406, 2019.

ZHAI, D.D.; SUPAIBULWATANA, K.; ZHONG, J.J. Inhibition of tumor cell proliferation and induction of apoptosis in human lung carcinoma 95-D cells by a new sesquiterpene from hairy root cultures of *Artemisia annua*. **Phytomedicine**, v. 17, p. 856-861, 2010.

ZHANG, A.; KLUN, J.; WANG, S.; CARROLL, J.F.; DEBBOUN, M. Isolongifolenone: a novel sesquiterpene repellent of ticks and mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 100-106, 2009a.

ZHANG, H.; CHEN, X.; HE, J.J. Pharmacological action of clove oil and its application in oral care products. **Oral Care Industry**, v. 19, p. 23-24, 2009b.

ZHANG, L.B.; DUAN, J.A.; LV, J.L. Phytochemistry and bioactivities of sesquiterpenoids from the *Artemisia* species. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 317-334, 2017

CAPÍTULO I

ATIVIDADE ACARICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamomum Zeylanicum* (CANELA) E *Eremanthus Erythropappus* (CANDEIA), COMPOSTOS MAJORITÁRIOS E ACETATO DE CINAMILA SOBRE *Rhipicephalus microplus*.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente os óleos essenciais (OEs) de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e *Eremanthus erythropappus* (candeia) e avaliar e comparar a atividade carrapaticida dos óleos essenciais, juntamente com os seus compostos majoritários e do derivado acetado de cinamila, sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/EM). O derivado acetilado foi obtido por meio de uma reação contendo anidro acético e piridina. O produto foi confirmado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (1D), e carbono-13 (RMN 13C 125 MHz). Para avaliação do teste sobre larvas não alimentadas foi realizado o teste de pacote de larvas com concentrações entre 0,31 a 10,0 mg/mL. Para fêmeas ingurgitadas foi realizado o teste de imersão nas concentrações de 2,5 a 60,0 mg/mL. O (*E*)-cinamaldeído foi identificado como composto majoritário do OE de *C. zeylanicum*, com 86,93 %. Para o OE de *E. erythropappus* o α -bisabolol foi identificado como principal composto (78,41%). Os OEs resultaram em mortalidade superior a 90%, para larvas, a partir da concentração de 2,0 mg/mL. Para esse mesmo estágio, foi observada uma mortalidade de 100% para o (*E*)-cinamaldeído, α -bisabolol e acetato de cinamila nas concentrações de 5,0, 10,0 e 10,0 mg/mL respectivamente. Para fêmeas ingurgitadas foi observado percentual de controle superior a 95% para o OE de canela, o (*E*)-cinamaldeído, OE de candeia e o α -bisabolol nas concentrações de 20,0, 20,0, 60,0, 20,0 mg/mL respectivamente; enquanto o acetato de cinamila apresentou baixa atividade, com percentual de controle de 36,2% na sua maior concentração (60,0 mg/mL). Estes resultados demonstram o potencial acaricida desses compostos sobre *R. microplus*.

Palavras-Chave: Carrapatos dos bovinos, canela, candeia, (*E*)-cinamaldeído, (α)-bisabolol

ABSTRACT

The aim of this study was to chemically characterize the essential oils (EOs) of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) and *Eremanthus erythropappus* (candeia) and evaluate acaricidal activity of EOs, together with their major compounds and the cinnamyl acetate derivative, on unfed larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. EOs compounds were identified through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) and flame ionization detection (GC/FID). The acetylated derivative (cinnamyl acetate) was obtained through a reaction between acetic anhydrous and pyridine. The product was confirmed by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR 500 MHz) and carbon-13 (^{13}C NMR 125 MHz). The Larval Packet Test (LPT) at concentrations ranging from 0.31 to 10.0 mg/mL and Adult Immersion Test (AIT) at concentrations ranging from 2.5 to 60.0 mg/mL, were performed. (*E*)-cinnamaldehyde was the major compound in the *C. zeylanicum* (86.93%) EO, whereas α -bisabolol was the main compound in the *E. erythropappus* (78.41%) EO. In LPT, these EOs result in larval mortality rate higher than 90% from the concentration 2.0 mg/mL, while (*E*)-cinnamaldehyde, α -bisabolol and cinnamyl acetate resulted in 100% larval mortality rate in the concentrations of 5.0, 10.0 and 10.0 mg/mL, respectively. In AIT, the percent control greater than 95% was observed for cinnamon EO, (*E*)-cinnamaldehyde, candeia EO and α -bisabolol at concentrations of 20.0, 20.0, 60.0 and 20.0 mg/mL respectively; while cinnamyl acetate showed low activity, with a percent control of 36.2% in the highest concentration (60.0 mg/mL). We can conclude that EOs of cinnamon and candeia and major compounds showed high acaricidal activity, while the acetylated derivative of (*E*)-cinnamaldehyde showed low activity.

Keywords – Cattle tick, cinnamon, candeia, (*E*)-cinnamaldehyde, α -bisabolol

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888), conhecido como carrapato dos bovinos, pode causar diversos prejuízos, tanto na pecuária leiteira, quanto na criação de gado de corte; sendo considerados uma limitação para o sucesso produtivo na pecuária bovina (LABRUNA; MACHADO, 2006; FURLONG et al., 2007). Somente no Brasil, os prejuízos causados por esse ectoparasito podem chegar a 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al. 2014), enquanto no mundo, são estimados prejuízos anuais entre 22 a 30 bilhões de dólares (LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016).

A utilização de carrapaticidas sintéticos é o método predominante de controle de carrapatos, devido à sua ação relativamente rápida, econômica, e de fácil disponibilidade no mercado (ABBAS et al., 2014). Contudo, o uso contínuo pode gerar alguns problemas como contaminação do ambiente, intoxicação de animais, morte de organismos não-alvo, resíduos no leite e carne, além do desenvolvimento de populações resistentes (SONENSHINE, 1993; KOUL et al., 2008, MENDES et al., 2013, KUMAR et al., 2019). Tais aspectos tem motivado a busca por desenvolvimento de novas tecnologias de controle de carrapatos (ADENUBI et al, 2018).

Nesse sentido, estudos com óleos essenciais (OEs), obtidos de plantas aromáticas, podem mitigar o uso de produtos sintéticos no controle de carrapatos, apresentando-se como uma opção ecológica e sustentável (*Eco-friendly*). A obtenção a partir de recursos renováveis, o retardo na seleção de indivíduos resistentes, por apresentarem uma mistura complexa de compostos e o menor risco de contaminação para o ambiente e animais, devido à baixa toxicidade para mamíferos e alta biodegradabilidade, são alguns dos aspectos favoráveis para o uso de OEs (BORGES, 2011; CATTO, 2013; CHAGAS et al., 2014). Entre as plantas que possuem OEs com potencial para controle de carrapatos, podemos citar espécies das famílias Asteraceae e Lauraceae.

Cinnamomum zeylanicum Blume (Canela) (sinonímia - *Cinnamomum verum*) é uma planta da família Lauraceae, cujo OE já teve sua atividade biológica demonstrada sobre bactérias (CHAO et al., 2000; DUSAN et al., 2006; SHAHVERDI et al., 2007; MISHRA et al., 2008), fungos (RANASINGHE et al., 2002; CARMO et al., 2008), insetos (YANG et al., 2005) e carrapatos (MONTEIRO et al., 2017; JYOTI et al., 2019). O principal constituinte do óleo essencial da casca de *C. zeylanicum* é o (*E*)-cinamaldeído, um fenilpropanóide que também já teve sua atividade demonstrada para bactérias, insetos e carrapatos (ALI et al., 2005; LEE et al., 2008; SHEN et al., 2012; SENRA et al., 2013a,b; NOVATO et al., 2015).

Eremanthus erythropappus (DC.) MacLeish (Candeia) (sinonímia - *Vanillosmopsis erythropappa*), espécie arbórea nativa do Brasil, é uma planta da família Asteraceae. Seu OE apresenta atividade biológica para fungos (HILLEN, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2015) e até onde sabemos, não há relatos da atividade carrapaticida. O OE *E. erythropappus* é a principal fonte do α -bisabolol, sesquiterpeno que já teve sua atividade evidenciada para diferentes bactérias (SOUSA et al., 2008; KAMATOU; VILJOEN 2010) e também, atividade anti-inflamatória (LEITE et al., 2008, VILA et al., 2010) e anticancerígena (KAMATOU; VILJOEN 2010).

Estudos com a realização de modificações estruturais em substâncias extraídas de OE, através da alteração de grupos funcionais, têm sido realizados no intuito de potencializar a atividade biológica ou aumentar a biossegurança dessas substâncias (KIM et al., 2015). Entre as possíveis modificações, encontra-se o processo de acetilação, com a introdução de um grupo acetato. O processo de acetilação, substituindo o grupo hidroxila (-OH) pelo grupo acetato, confere a molécula maior permeabilidade cuticular, o que facilita a absorção no artrópode (LANUSSE; PRICHARD, 1993), além de apresentar menor toxicidade para

mamíferos (ANDRE et al. 2016; 2017), tornando sua utilização como acaricida mais seguro para o animal e para o ambiente. Em alguns estudos também foi demonstrado que o processo de acetilação pode aumentar a atividade dessas substâncias sobre bactérias, insetos e carrapatos (JACK et al., 2006; MATHELA et al., 2010; SCOTTI et al., 2014, RAMIREZ et al., 2016).

O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização química e avaliar a atividade carrapaticida dos óleos essenciais do caule de *E. erythropappus*, e da casca de *C. zeylanicum*, bem como, dos seus compostos majoritários e do derivado acetilado do (*E*)-cinamaldeído (=acetato de cinamila), sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das substâncias

O OE de *E. erythropappus* (Candeia) foi gentilmente fornecido pela empresa Atina - Ativos Natural - Ltda (Pouso Alegre, Minas Gerais - MG) que obtém o óleo por destilação a vapor do caule das espécies vegetais cultivadas em Minas Gerais. Já o OE de *C. zeylanicum* (Canela) foi adquirido comercialmente da empresa Laszlo® (Belo Horizonte - MG). Este óleo é originário do Sri Lanka e obtido por destilação a vapor da casca de *C. zeylanicum*. O α -bisabolol foi fornecido pela Citróleo Indústria e Comércio LTDA (Torrinha, São Paulo, Brasil) (95% de pureza), enquanto o (*E*)-cinnamaldeído e álcool cinamílico (usado para a produção de acetato de cinamila) (Figura 1) foram comprados da Sigma-Aldrich (98% de pureza).

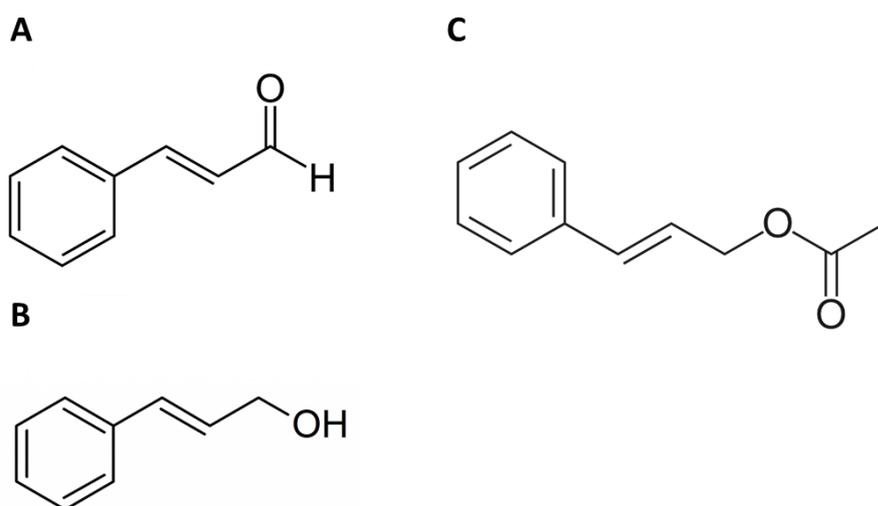


Figura 1 – Estrutura química do (*E*)-cinamaldeído (A), álcool cinamílico (B) e acetato de cinamila (C).

2.2 Análises químicas dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram submetidos à análise qualitativa da composição química em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM), equipamento Shimadzu modelo GC-2010 (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna RTX-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Restek), modo de injeção com divisão de fluxo 1:100, gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da linha de transferência de 250 °C e fonte de íons a 230 °C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min).

A análise quantitativa da composição química dos óleos foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização por chama (CG/DIC), instrumento Shimadzu modelo CG-2010 Plus, com coluna RTX-5 metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador nitrogênio com fluxo 1,0 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector de 280°C. A programação do forno cromatográfico foi similar à usada na análise realizada em CG/EM.

O percentual dos constituintes foi calculado através da área de integral de seus respectivos picos, relacionadas com a área total de todos os constituintes da amostra. Os diversos constituintes do óleo essencial foram identificados através da comparação visual de seus espectros de massas com aqueles existentes na literatura (ADAMS, 2009), espectros fornecidos pelo banco de dados (NIST08) do equipamento e pela comparação dos índices de retenção disponíveis na literatura (ADAMS, 2009; EL-SAYED, 2018). Uma solução padrão de n-alcenos (C7-C30) foi injetada nas mesmas condições cromatográficas da amostra, e foi utilizada para obter os índices de retenção conforme descrito por Van Den Dool e Kratz (1963).

2.3 Preparação do derivado acetilado

No presente estudo o (*E*)-cinamaldeído apresentou maior atividade do que o α -bisabolol, por isso, utilizamos apenas esse fenilpropanoide para produção de um derivado acetilado (acetato de cinamila). O processo de acetilação do (*E*)-cinamaldeído foi realizado de acordo com Oliveira et al., (1999), no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Para realização desse processo, foi utilizado o álcool cinamílico. Em um balão com capacidade de 25 mL, foi adicionado o álcool cinamílico (4,44 g), o anidrido acético (8,88 mL) e piridina (6,66 mL). Os reagentes foram colocados sobre agitação com o auxílio de um agitador magnético e placa agitadora, durante 24 horas. Ao produto da reação foi adicionado clorofórmio e a solução residual foi lavada com solução de ácido clorídrico (10%) até que toda a piridina fosse retirada do sistema através da formação do sal solúvel.

2.4 Confirmação do produto acetilado

Para confirmação do produto, foi realizada análise com espectros de Ressonância Magnética Nuclear (1D), sendo obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE II 11,5 T (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C), central analítica IQ-UFRRJ. Como padrão interno para referência de deslocamento químico foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J)

em Hertz (Hz). Para as análises de RMN foi utilizado solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃).

2.5 Origem dos carrapatos

Os carrapatos foram coletados de bovinos, naturalmente infestados, cedidos pelo Laboratório de Parasitologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

2.6 Teste de pacote de larvas (TPL)

Nos testes de larvas não alimentadas, os OEs e os compostos puros, foram diluídos em etanol 70% (água-etanol v/v), enquanto o α -bisabolol foi diluído em etanol 50% (água-etanol v/v). Foram utilizadas as concentrações de 0,31, 0,62, 1,25, 2,0, 2,5, 5,0 mg/mL, sendo acrescida a concentração de 10,0 mg/mL nos testes realizados com o acetato de cinamila e α -bisabolol.

Para avaliação da atividade dos OEs e compostos puros foi utilizado o teste de pacote de larvas proposto por Stone e Haydock (1962) e adaptado por Monteiro et al. (2012). Aproximadamente 100 larvas não alimentadas foram adicionadas no centro de papel de filtro (6 x 6 cm), que em seguida, foi dobrado ao meio e vedado nas extremidades com cliques. Na sequência, cada lado do papel filtro foi umedecido com 90 μ L das soluções teste, totalizando 180 μ L. Também foram formados três grupos controles (etanol 50%, etanol 70%, água destilada), e para cada grupo foram feitas 10 repetições.

Os pacotes foram armazenados em estufa climatizada a 27°C e UR>80% por 24 horas, e após esta etapa, foi feita a quantificação de larvas mortas e vivas.

2.7 Teste de imersão de adultos (TIA)

Nos testes com fêmeas, foi utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO) 3% (água-DMSO v/v) como solvente. Foi utilizada a metodologia proposta por Drummond et al. (1973), no qual grupos com 10 fêmeas ingurgitadas (cada fêmea = 1 unidade experimental), com pesos homogêneos ($p>0,05$), foram imersos por cinco minutos nas concentrações de 2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0, 60,0 mg/mL (10 por concentração). Além desses tratamentos, foram realizados dois grupos controles (DMSO 3% e água destilada). Após a imersão, cada fêmea foi pesada individualmente e acondicionada em placa de Petri (6x6 cm), individuais, para realização de ovipostura, os grupos foram mantidos em câmara climatizada, nas condições citadas anteriormente, para realização da ovipostura. Após quinze dias, cada postura foi pesada, colocada em uma seringa individual, com a extremidade distal cortada, sendo fechada com algodão hidrófilo e levada a câmara climatizada, nas mesmas condições citadas anteriormente, por quinze dias. Após essa etapa, foi realizada a leitura do percentual de eclosão das larvas.

Foram avaliados o peso da fêmea antes da postura (mg), peso da postura (mg) e o percentual de eclosão das larvas (%). Esses valores foram utilizados para avaliação do percentual de controle (DRUMMOND et al., 1973).

2.8 Análise estatística

As análises estatísticas utilizadas nos dois testes foram realizadas no programa Biostat 5.0 (AYRES et al., 2007). Os tratamentos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Para dados distribuídos de forma não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Para o cálculo da concentração letal 50 (CL₅₀), a análise Probit foi realizada no software R-Studio (versão 1.2.5001 - 2019).

3 RESULTADOS

3.1 Composição química

No óleo essencial da casca de *C. zeylanicum* foi observado predominância de fenilpropanóides (94,06%), entre eles, o composto majoritário foi o (*E*)-cinamaldeído (86,93 %). Na análise química do óleo essencial do caule de *E. erythropappus*, foram identificados sesquiterpenos oxigenados (82,19%), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (13,17%), e o sesquiterpeno α -bisabolol foi o composto majoritário (78,41%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química, índice de retenção calculado (IR_C), índice de retenção obtido da literatura (IR_{LIT}) (ADAMS, 2007), percentagens dos componentes identificados e das classes (%) no óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum* e do caule de *Eremanthus erythropappus*.

Componentes	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>			<i>Eremanthus erythropappus</i>		
	IR _C	IR _{LIT}	(%)	IR _C	IR _{LIT}	(%)
<i>Aldeído aromático</i>			3,71	-	-	-
Benzaldeído	966	960	3,71	-	-	-
<i>Fenilpropanóides</i>			94,06	-	-	-
(<i>E</i>)-Cinamaldeído	1280	1270	86,93	-	-	-
(<i>E</i>)- <i>o</i> -Metóxi cinamaldeído	1537	1528	7,13	-	-	-
<i>Ácido graxo saturado</i>	-	-	-			1,10
Ácido isovalérico	-	-	-	849	835	1,10
<i>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</i>						13,17
γ -curcumeno	-	-	-	1483	1482	0,61
β -selineno	-	-	-	1486	1490	0,25
α -selineno	-	-	-	1496	1498	0,27
(<i>Z</i>)- α -bisaboleno	-	-	-	1505	1504	3,36
β - bisaboleno	-	-	-	1513	1505	1,86
(<i>E</i>)- γ -bisaboleno	-	-	-	1517	1531	0,95
(<i>E</i>)- α -bisaboleno	-	-	-	1547	1547	5,87
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>						82,19
2, (<i>7Z</i>)-bisaboladien-4-ol	-	-	-	1627	1619	0,29
Óxido de α -bisabolol B	-	-	-	1664	1658	1,72
(<i>E</i>)-bisabol-11-ol	-	-	-	1675	1668	1,77
α -bisabolol	-	-	-	1700	1685	78,41
Total Identificado			97,77			96,46

3.2 Confirmação da acetilação

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) e de carbono-13 (RMN¹³C), para confirmação do produto acetilado, estão representados na figura 2. O produto final foi pesado, apresentando massa de 5,25 g com rendimento de 90%.

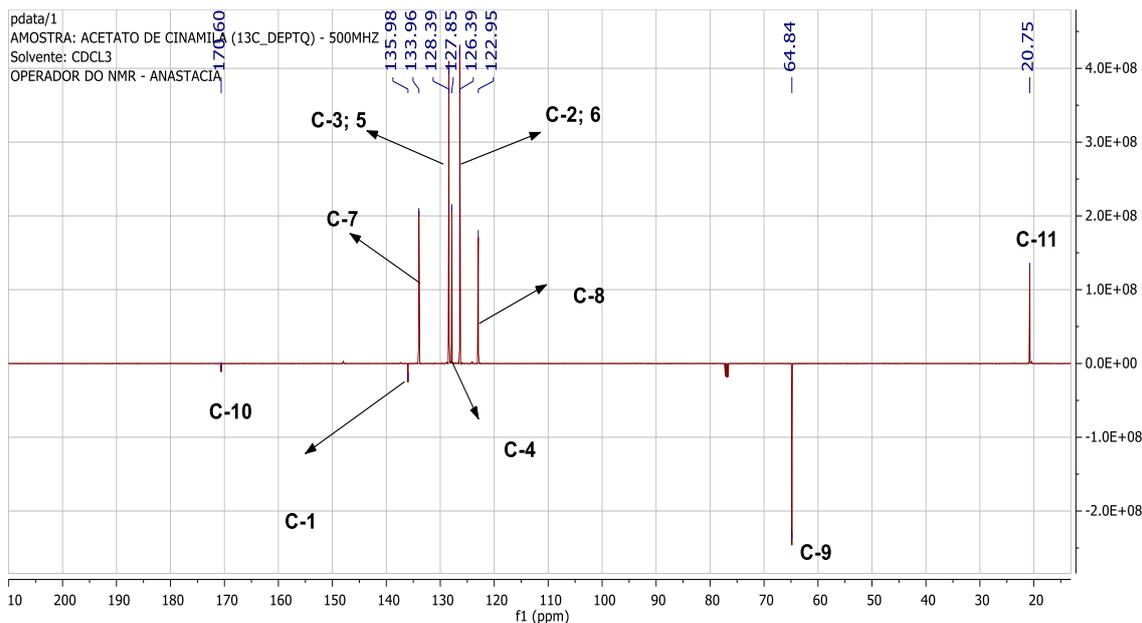


Figura 2 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) para confirmação do acetato de cinamila.

3.3 Teste pacote de larvas

O óleo essencial da casca de *C. zeylanicum* resultou em mortalidade de 64% na concentração de 1,25 mg/mL, com diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (0,0%). A mortalidade foi superior a 95% a partir da concentração 2,0 mg/mL, chegando a 100% na concentração de 2,5 mg/mL (Tabela 2). O (*E*)-cinamaldeído resultou em mortalidade de larvas com diferenças ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, a partir da concentração de 1,25 mg/mL (29,2%). Foi observado mortalidade superior a 95% a partir da concentração de 2,5 mg/mL, e somente a maior concentração (5,0 mg/mL) ocorreu mortalidade de 100% das larvas. Com relação ao derivado acetilado do (*E*)-cinamaldeído, a concentração de 2,0 mg/mL resultou em mortalidade de 44% das larvas, com diferenças em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Nas maiores concentrações (5,0 e 10,0 mg/mL), a mortalidade foi de 99 e 100% (Tabela 2).

O OE de *E. erythropappus* ocasionou mortalidade de larvas não alimentadas de *R. microplus* acima de 90% a partir da concentração de 2,0 mg/mL, chegando a 100% na concentração de 2,5 mg/mL, com diferenças ($p < 0,05$) em relação ao controle (0,0%). O α -bisabolol na concentração de 2,0 mg/mL resultou em mortalidade de 32,1%, com diferenças ($p < 0,05$) em relação ao controle. Mortalidade superior a 95% foi observada a partir da concentração 5,0 mg/mL, com mortalidade de 96,7%, chegando a 100% na concentração de 10,0 mg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade média de larvas não alimentadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e α -bisabolol em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$) (Média \pm desvio padrão).

Tratamentos	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	(<i>E</i>)-cinamaldeído	Acetato de cinamila	<i>Eremanthus erythropappus</i>	α -bisabolol
Controle - H ₂ O	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
Controle -Solvente*	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
0,31 mg/mL	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
0,62 mg/mL	21,0 ^a \pm 4,5	15,9 ^{ab} \pm 18,9	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
1,25 mg/mL	64,0 ^b \pm 6,4	29,2 ^{bc} \pm 7,2	6,0 ^b \pm 8,9	4,0 ^a \pm 4,66	0,0 ^a \pm 0,0
2,00 mg/mL	99,0 ^c \pm 2,9	63,7 ^c \pm 6,2	44,0 ^{bc} \pm 22,9	92,6 ^b \pm 6,31	32,1 ^{bc} \pm 25,3
2,50 mg/mL	100,0 ^c \pm 0,0	95,3 ^{cd} \pm 3,4	47,0 ^{bc} \pm 11,3	100,0 ^b \pm 0,0	80,4 ^{cd} \pm 13,1
5,00 mg/mL	100,0 ^c \pm 0,0	100,0 ^d \pm 0,0	99,0 ^c \pm 2,8	100,0 ^b \pm 0,0	96,7 ^d \pm 5,2
10,00 mg/mL	100,0 ^c \pm 0,0	...	100,0 ^d \pm 0,0

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas no nível de 5%.

*Controle *Cinnamomum zeylanicum*, *Eremanthus erythropappus*, (*E*)-cinamaldeído e Acetato de cinamila = etanol 70%.

*Controle α -bisabolol = etanol 50%

... – Concentração não testada.

Os valores de CL₅₀ para *C. zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *E. erythropappus* e α -bisabolol sobre larvas de *R. microplus* foram de 0,94, 1,38, 2,31, 1,61, 2,20 mg/mL, respectivamente, ocorrendo sobreposição de intervalo de confiança entre (*E*)-cinamaldeído e *E. erythropappus* e entre acetato de cinamila e α -bisabolol (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração letal (CL₅₀) de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e α -bisabolol sobre larvas não alimentadas de *Rhipicephalus microplus*.

Tratamentos	CL ₅₀	IC	Valor de <i>p</i>
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0,94	0,50-1,05	<0,01
(<i>E</i>)-cinamaldeído	1,38	1,21-1,58	<0,01
Acetato de cinamila	2,31	2,02-2,65	<0,01
<i>Eremanthus erythropappus</i>	1,61	1,47-1,77	<0,01
α -bisabolol	2,20	1,92-2,53	<0,01

IC – Intervalo de confiança (95%),

3.4 Teste de imersão de adultos

Como não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos controle água e controle solvente, foi utilizado os dados de biologia reprodutiva do grupo controle solvente para o cálculo do percentual de controle dos demais tratamentos. O peso das fêmeas antes da postura, não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$). Com relação ao óleo de *C. zeylanicum*, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para o peso da massa de ovos entre as concentrações testadas e o grupo controle. O percentual de eclosão referente ao tratamento com a menor concentração (2,5 mg/mL) foi de 16,6% ($p < 0,05$), enquanto no grupo controle, foi observado percentual de eclosão de 85,4%. Nas maiores concentrações (40,0 e 60,0 mg/mL), não ocorreu eclosão de nenhuma larva. O percentual de controle do óleo foi superior a 90% a partir da concentração de 5,0 mg/mL, chegando a 99 e 100% nas concentrações de 10,0 e 40,0 mg/mL (Tabela 4).

No tratamento com (*E*)-cinamaldeído, a média do peso da massa de ovos dos grupos tratados variou entre 101 e 0 mg, diferindo ($p < 0,05$) do valor encontrado no grupo controle (145,0 mg). O mesmo foi observado para o percentual de eclosão, com valores dos grupos tratados variando entre 28,5 e 9,4%, enquanto no controle foi observado valor de 96,3%. Na menor concentração (2,5 mg/mL) o percentual de controle foi de 73,4%, chegando a 100% na concentração de 20,0 mg/mL (Tabela 4).

Para o acetato de cinamila não foi observada diferença entre o peso médio da postura das fêmeas do grupo controle em relação aos grupos tratados ($p > 0,05$). Para o percentual de eclosão, as três maiores concentrações (20,0, 40,0 e 60,0 mg/mL) resultaram em valores inferiores (58,1, 58,0 e 56,6% - $p < 0,05$, respectivamente) ao valor observado no grupo controle (80,1%). Nenhum dos tratamentos resultou em percentual de controle superior a 50%, chegando ao máximo 42,6% na concentração de 20,0 mg/mL (Tabela 4).

Para o OE de *E. erythropappus*, a partir da concentração de 10,0 mg/mL, foi observado redução ($p < 0,05$) no peso da massa de ovos (21,4 mg) se comparado ao grupo controle (67,7 mg). Com relação ao percentual de eclosão larval, ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle (84,2%) e os grupos tratados a partir da concentração de 5,0 mg/mL, com valores variando entre 39,7 e 0,0%. O percentual de controle na concentração de 2,5 mg/mL foi de 52,4%, chegando a 100% na maior concentração (60,0 mg/mL) (Tabela 4).

Nos testes com o α -bisabolol, com relação ao peso da massa de ovos, foi observado diferenças ($p < 0,05$) a partir da concentração de 10,0 mg/mL (76,1 mg), enquanto no controle, foi observado valor de 145,0 mg. Para o percentual de eclosão, a concentração de 5,0 mg/mL resultou em percentual de 47,3% de eclosão, com diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle 96,3%. O percentual de controle foi de 100% a partir da concentração de 20,0 mg/mL (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores referente a média do peso das fêmeas antes da postura (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas e percentuais de eclosão larval e controle de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes concentrações de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e α -bisabolol, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$) (Média \pm desvio padrão).

EO ou composto	Tratamentos	Peso das fêmeas antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão (%)	Percentual de controle (%)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Controle (n)	221,9 ^a \pm 17,8 (10)	81,0 ^a \pm 18,7 (10)	85,4 ^a \pm 7,5 (10)	
	2,5 mg/mL (n)	222,2 ^a \pm 31,1 (10)	50,8 ^a \pm 54,1 (10)	16,6 ^b \pm 10,1 (06)	88,9
	5,0 mg/mL (n)	222,6 ^a \pm 20,7 (10)	33,2 ^a \pm 33,7 (10)	4,4 ^b \pm 2,8 (07)	97,8
	10,0 mg/mL (n)	222,0 ^a \pm 15,9 (10)	32,2 ^a \pm 41,4 (10)	1,4 ^b \pm 1,9 (07)	99,3
	20,0 mg/mL (n)	222,9 ^a \pm 18,4 (10)	38,3 ^a \pm 40,2 (10)	0,3 ^b \pm 0,8 (06)	99,8
	40,0 mg/mL (n)	222,5 ^a \pm 14,2 (10)	33,5 ^a \pm 45,4 (10)	0,0 (4)	100,0
	60,0 mg/mL (n)	222,4 ^a \pm 20,7 (10)	36,6 ^a \pm 39,0 (10)	0,0 (5)	100,0
	<i>(E)</i> -cinamaldeído	Controle (n)	251,4 ^a \pm 26,5 (10)	145,0 ^a \pm 13,7 (10)	96,3 ^a \pm 2,4 (10)
2,5 mg/mL (n)		251,8 ^a \pm 35,6 (10)	101,1 ^b \pm 42,4 (10)	28,5 ^b \pm 24,7 (10)	73,4
5,0 mg/mL (n)		251,9 ^a \pm 30,3 (10)	95,3 ^{bc} \pm 40,9 (10)	35,7 ^b \pm 27,1 (10)	68,6
10,0 mg/mL (n)		251,4 ^a \pm 26,6 (10)	58,0 ^c \pm 41,6 (10)	9,4 ^b \pm 1,8 (07)	94,9
20,0 mg/mL (n)		251,5 ^a \pm 33,9 (10)	0,0 (10)	... (0)	100,0
40,0 mg/mL (n)		251,8 ^a \pm 24,1 (10)	0,0 (10)	... (0)	100,0
60,0 mg/mL (n)		251,3 ^a \pm 21,7 (10)	0,0 (10)	... (0)	100,0
Acetato de cinamila		Controle (n)	226,3 ^a \pm 11,8 (10)	132,4 ^a \pm 18,2 (10)	80,1 ^a \pm 9,4 (10)
	2,5 mg/mL (n)	226,7 ^a \pm 17,9 (10)	129,8 ^a \pm 12,3 (10)	77,0 ^a \pm 11,1 (10)	1,4
	5,0 mg/mL (n)	227,2 ^a \pm 19,9 (10)	115,3 ^a \pm 44,2 (10)	74,4 ^{ab} \pm 13,7 (09)	16,0
	10,0 mg/mL (n)	226,2 ^a \pm 7,5 (10)	127,5 ^a \pm 6,8 (10)	68,0 ^{ab} \pm 8,8 (10)	14,8
	20,0 mg/mL (n)	227,6 ^a \pm 13,6 (10)	101,0 ^a \pm 54,8 (10)	58,1 ^b \pm 28,6 (08)	42,6
	40,0 mg/mL (n)	226,9 ^a \pm 22,3 (10)	113,4 ^a \pm 43,3 (10)	58,0 ^b \pm 25,1 (09)	35,5
	60,0 mg/mL (n)	225,5 ^a \pm 16,6 (10)	112,7 ^a \pm 41,3 (10)	56,6 ^b \pm 8,2 (09)	36,2

<i>Eremanthus erythropappus</i>	Controle (n)	201,8 ^a ±12,8 (10)	67,7 ^a ±22,2 (10)	84,2 ^a ±12,3 (10)	
	2,5 mg/mL (n)	202,0 ^a ±22,3 (10)	49,2 ^{ab} ±37,3 (10)	55,2 ^a ±36,3 (08)	52,4
	5,0 mg/mL (n)	201,0 ^a ±11,0 (10)	41,2 ^{ab} ±39,9 (10)	39,7 ^b ±32,0 (08)	71,1
	10,0 mg/mL (n)	201,1 ^a ±12,7 (10)	21,4 ^{bc} ±26,2 (10)	37,5 ^{ab} ±29,9 (06)	85,9
	20,0 mg/mL (n)	201,9 ^a ±18,9 (10)	58,3 ^a ±30,6 (10)	16,5 ^b ±19,7 (08)	83,1
	40,0 mg/mL (n)	202,4 ^a ±21,7 (10)	23,4 ^{bc} ±23,4 (10)	11,7 ^b ±15,2 (07)	89,9
	60,0 mg/mL (n)	202,6 ^a ±17,5 (10)	2,0 ^c ±6,3 (10)	0,0 (01)	100,0
	<i>α</i> -bisabolol	Controle (n)	251,4 ^a ±26,5 (10)	145,0 ^a ±13,7 (10)	96,3 ^a ±2,4 (10)
2,5 mg/mL (n)	251,7 ^a ±20,7 (10)	136,0 ^a ±14,7 (10)	74,5 ^{ab} ±16,9 (10)	3,2	
5,0 mg/mL (n)	251,6 ^a ±26,4 (10)	94,6 ^{ab} ±54,6 (10)	47,3 ^b ±33,1 (09)	45,6	
10,0 mg/mL (n)	251,6 ^a ±26,6 (10)	76,1 ^b ±58,4 (10)	47,5 ^b ±23,7 (07)	51,7	
20,0 mg/mL (n)	251,6 ^a ±17,9 (10)	5,5 ^b ±22,9 (10)	0 (02)	100,0	
40,0 mg/mL (n)	251,3 ^a ±26,3 (10)	0,0 ^b ±0,0 (10)	... (0)	100,0	
60,0 mg/mL (n)	251,3 ^a ±24,6 (10)	0,0 ^b ±0,0 (10)	... (0)	100,0	

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas no nível de 5% para o mesmo OE ou o mesmo composto

(n) Tamanho da amostra

Controle = DMSO 3.

... – Dado de percentual de eclosão não coletado devido a ausência de postura no tratamento.

O cálculo da CL₅₀ para *C. zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, *E. erythropappus* e *α*-bisabolol sobre as fêmeas de *R. microplus*, resultou em valores de 0,57, 1,50, 1,93, 6,99 mg/mL, respectivamente. Para o acetato de cinamila, essa análise não foi realizada, uma vez que o percentual de controle observado não atingiu 50% (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentração letal (CL₅₀) de *Cinnamomum zeylanicum*, (*E*)-cinamaldeído, acetato de cinamila, *Eremanthus erythropappus* e *α*-bisabolol sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Tratamentos	CL ₅₀	IC	Valor de <i>p</i>
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0,57	0,10-3,25	<0,01
(<i>E</i>)-cinamaldeído	1,50	0,58-3,86	<0,01
Acetato de cinamila
<i>Eremanthus erythropappus</i>	1,93	1,0-3,53	<0,01
<i>α</i> -bisabolol	6,99	6,06-8,05	<0,01

IC – Intervalo de confiança (95%),

... – não calculado.

4. DISCUSSÃO

Análise fitoquímica para caracterização dos constituintes de OEs têm sido uma ferramenta amplamente utilizada para identificação de compostos com atividades biológicas. Além disso, a busca por análogos desses compostos bioativos tem sido foco de estudos recentes, na tentativa de potencialização da atividade e aumento da biossegurança dessas moléculas (KIM et al., 2015; KONIG et al., 2019). No presente estudo apresentamos dados sobre a caracterização química de dois OEs e atividade acaricida desses óleos, juntamente com seus compostos majoritários, (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, sobre *R. microplus*; além de trazer dados a respeito da atividade do acetato de cinamila sobre esse mesmo ixodídeo.

A atividade do OE de *C. zeylanicum* sobre *R. microplus* já foi evidenciada em alguns estudos (MONTEIRO, 2013; MONTEIRO et al., 2017; SANTOS et al., 2017; JYOTI et al., 2019). No entanto, esses estudos diferem em relação a composição química do OEs, e tais diferenças podem estar relacionadas a biogeografia do local de coleta, genética da planta, parte da planta utilizada para extração e diferentes métodos utilizado para obtenção do OE (PAVELA; BENELLI et al., 2016). Jyoti et al. (2019), avaliaram o OE da casca de *C. zeylanicum*, contendo 64,4% do (*E*)-cinamaldeído, sobre larvas de *R. microplus*, e observaram uma CL₅₀ de 0,86 mg/mL. De forma semelhante, no presente estudo, o OE da casca de canela, contendo 86,93% de (*E*)-cinamaldeído, resultou em uma CL₅₀ de 0,94 mg/mL. Com relação ao composto majoritário, (*E*)-cinamaldeído, observamos uma mortalidade de 95,3% das larvas tratadas na concentração de 2,5 mg/mL, corroborando com os resultados encontrados por Senra et al. (2013a), que na mesma concentração observaram uma mortalidade de 99,2%.

Para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* não encontramos relatos sobre a atividade do OE da casca de canela. No entanto, Monteiro et al. (2017) relataram um percentual de controle de 27,3%, com a utilização do OE obtido das folhas de *C. zeylanicum*, na concentração de 25,0 mg/mL, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. No estudo realizado por Monteiro et al., (2017), o OE essencial apresentava apenas 4,0% de (*E*)-cinamaldeído, e o constituinte majoritário foi o benzoato de benzila (65,4%). Em outro estudo, Santos et al. (2017), observaram eficácia de 100% com exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* ao OE de canela, na concentração de 100,0 mg/mL. A amostra de OE utilizada por Santos et al. (2017) apresentava 41,27% de (*E*)-cinamaldeído em sua constituição química, nesse estudo os autores não especificaram qual a parte vegetal que foi utilizada para obtenção do OE. Em nosso estudo, já na concentração de 2,5 mg/mL, foi observado um percentual de controle de 88,9%, e na forma pura, o (*E*)-cinamaldeído, na concentração de 2,5 mg/mL, resultou em um percentual de controle de 73,4%. O conjunto de dados apresentados no presente estudo, somado aos resultados apresentados por outros autores indicam que o (*E*)-cinamaldeído puro possui boa atividade acaricida, e o percentual desse fenilpropanoide na composição química do OE de canela apresenta importante influência na atividade acaricida desse OE.

Diniz (2014) observou a ação do OE de *Siparuna guianensis* Aublet, com 62,6% de α -bisabolol, sobre larvas de *R. microplus* e verificou um percentual de mortalidade de 86,6% na concentração de 10 mg/mL. No presente estudo, a ação do OE de *E. erythropappus* na concentração de 2,0 mg/mL ocasionou mortalidade superior a 90,0% de larvas de *R. microplus*, e percentual de controle superior a 85,0% sobre fêmeas ingurgitadas, a partir da concentração de 10,0 mg/mL. El-Moneim et al. (2012) também avaliaram ação do OE de *Chamomilla recutita* (L.) Rauscher, rico em α -bisabolol (35,2%), sobre o ácaro *Tetranychus urticae* e verificaram 100,0% de mortalidade na concentração de 4,0% do óleo.

Esses resultados demonstram ação de mais um óleo essencial, *E. erythropappus*, rico em sesquiterpeno (78,41% α -bisabolol) no controle de carrapatos. De acordo com Paluch et al. (2009) os sesquiterpenos, produzidos por diferentes famílias de plantas, podem ser

utilizados para afetar o comportamento e até mesmo ocasionar a mortalidade de alguns artrópodes. Para carrapatos, a ação de OE, ricos em sesquiterpenos, já foi registrada para plantas da família Araucariaceae (LEBOUVIER et al., 2013), Asteraceae (RIBEIRO et al., 2011, LAGE et al., 2014), Cupressaceae (LEBOUVIER et al., 2013), Lamiaceae (FACEY et al., 2005), Winteraceae (RIBEIRO et al., 2008).

A atividade do α -bisabolol puro já foi evidenciada para larvas e fêmeas de *R. microplus*, resultando em mortalidade de 98,9% na concentração de 5,0 mg/mL para larvas e um percentual de controle de 98,1% sobre fêmeas, a partir da concentração de 40,0 mg/mL (DINIZ, 2014). No presente trabalho, a mortalidade de larvas na concentração de 5,0 mg/mL foi de 96,7%, enquanto para fêmeas, esse sesquiterpeno resultou em percentual de controle de 100,0% na concentração de 20,0 mg/mL, percentual este maior do que o encontrado no OE de candeia nessa mesma concentração (83,1%). Essa diferença nos resultados com fêmeas ingurgitadas pode estar relacionada com o solvente utilizado. No estudo realizado por Diniz (2014), o solvente utilizado foi o Tween 80, enquanto no presente estudo foi utilizado o DMSO. Pesquisas tem demonstrado que determinados tipos de solventes podem potencializar o efeito de OEs (DAEMON et al., 2012), e o DMSO tem sido apontado como bom veículo para preparação de soluções para testes carrapaticidas em testes com fase ingurgitada de carrapatos (Comunicação pessoal).

Outro aspecto interessante, é que no estudo realizado por Diniz (2014), avaliando a atividade de 4 amostras de OE de *S. guianensis*, foi observado que as duas amostras que continham o sesquiterpeno α -bisabolol (> 62,6%) apresentaram maior atividade sobre larvas e fêmeas de *R. microplus*, do que as duas amostras que não tinham esse composto na composição química. Esses resultados indicam que a presença do α -bisabolol pode ser um fator primordial para a elevada atividade acaricida desses OEs.

Comparando os valores de CL₅₀ entre os OEs e seus compostos majoritários (OE de canela x (*E*)-cinamaldeído e OE de candeia x α -bisabolol), verificamos que os OEs apresentaram maior atividade sobre larvas não alimentadas de *R. microplus*. Para fêmeas ingurgitadas o OE de candeia também apresentou maior atividade do que o α -bisabolol. Essa maior atividade dos OEs pode ser resultado de um efeito sinérgico ou aditivo, devido a associação dos compostos majoritários com outras moléculas presentes nos OEs de canela e candeia, que podem potencializar a atividade acaricida. Esse fato tem sido demonstrado por diversos estudos que avaliam a atividade de OEs sobre diferentes artrópodes pragas (MIRESMALLI et al., 2006; SINGH et al., 2009; MONTEIRO et al. 2017; JYOTI et al., 2019).

Recentemente, alguns estudos têm explorado a busca por análogos de moléculas bioativas a fim de potencializar a sua ação, e nesse sentido, a produção de derivados acetilados, com a substituição do grupo hidroxila por um grupo acetato é uma das alternativas que vem sendo investigada (NOVATO et al., 2018). No presente estudo, tanto nos testes com larvas como nos testes com fêmeas ingurgitadas, foi observado que o acetato de cinamila apresentou menor atividade acaricida do que o (*E*)-cinamaldeído. Essa diferença na atividade foi mais acentuada nos testes com fêmeas ingurgitadas, uma vez que na maior concentração (60,0 mg/mL%) o percentual de controle foi somente de 36%. Lee et al. (2019) compararam a atividade acaricida do OE de casca de canela, do (*E*)-cinamaldeído e do acetato de cinamila sobre *Dermanyssus gallinae* (De Geer), e observaram que o acetato de cinamila foi o único que não apresentou resposta repelente e acaricida sobre esses ácaros.

Para carrapatos, essa potencialização de compostos acetilados é controversa. Ramirez et al. (2016) observaram menor atividade do carvacrol em relação ao seu derivado acetilado (acetato de carvacrol), para larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Entretanto, Novato et al. (2018) observaram que o carvacrol, timol e eugenol apresentaram maior atividade sobre larvas de *R. microplus*, do que os seus derivados acetilados.

Com a exceção do acetato de cinamila, todos os compostos analisados nesse estudo ocasionaram redução significativa na viabilidade dos ovos produzidos pelas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Esses resultados corroboram com outros estudos que avaliaram a atividade de OEs sobre fêmeas ingurgitadas e verificaram marcante redução na viabilidade dos ovos. O fato observado no presente estudo pode estar relacionado com a ação dos OEs sobre o ovário e órgão de Gené das fêmeas ingurgitadas. Alguns estudos demonstraram que os OEs e compostos isolados ocasionam uma série de alterações morfofisiológicas sobre os oócitos de fêmeas ingurgitadas, como danos no núcleo e vesícula germinativa, vacuolização no citoplasma, rompimento e deformação de membrana e redução no número de grânulos de vitelo (ARNOSTI et al., 2011; MATOS et al., 2014; KONIG et al., 2019; SOUZA et al., 2019). Além do ovário, recentemente um trabalho evidenciou a ação deletéria do monoterpeneo timol no órgão de Gené (MATOS et al., 2019). Futuramente, estudos sobre a ação dos OEs de canela e candeia, bem como, do (*E*)-cinamaldeído e do α -bisabolol sobre esses órgãos, utilizando ferramentas de análises morfológicas e bioquímicas podem elucidar melhor os mecanismos que resultam na redução da viabilidade dos ovos produzidos pelas fêmeas ingurgitadas.

Concluimos que os OEs de *C. zeylanicum* e *E. erythropappus*, e os seus compostos puros, possuem atividade acaricida sobre *R. microplus*, apresentando potencial para o desenvolvimento de novos carrapaticidas; e que os OEs apresentaram maior atividade do que os compostos puros. Por outro lado, o acetato de cinamila apresentou baixa atividade acaricida. Estudos adicionais devem ser conduzidos para elucidar os possíveis modos de ação dos OEs e seus compostos majoritários, ação para outras espécies e estágios de carrapatos, além da realização de testes de toxicidade e desenvolvimento de formulações para implementação de um possível produto comercial.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R.Z.; ZAMAN, M.A.; COLWELL, D.D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6-20, 2014.

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, IL, USA, 2009.

ADENUBI, O.T.; AHMED, A.S.; FASINA, F.O.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: a systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 779-806, 2018.

ALI, S.M.; KHAN, A.A.; AHMED, I.; MUSADDIQ, M.; AHMED, K.S.; POLASA, H., RAO, L.V.; HABIBULLAH, C.M.; SECHI, L.A.; AHMED, N. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.4, n. 20, 2005.

ANDRE, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C.; CAVALCANTE, G.S.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; FREITAS, R.M.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V.; BEVILAQUA, C.M.L. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 52-58, 2016.

ANDRE, W.P.P.; CAVALCANTE, G.S.; RIBEIRO, W.L.C.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; MORAIS, S.M.; MELO, J.V., BEVILAQUA, C.M.L. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p. 323-330, 2017.

ARNOSTI, A.; BRIENZA, P.D.; FURQUIM, K.C.S.; CHIERICE, G.O.; CLARONETO, S.; BECHARA, G.H.; SAMPIERI, B.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I., 2011. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 569-574, 2011.

AYRES, M.; AYRES J.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A. S. Bioestat 5.0: **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, Brasil, 2007.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 4126-4133, 1998.

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

CARMO, E.S.; LIMA, E.D.; DE SOUZA, E.L.; DE SOUSA, F.B. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially

pathogenic *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 91-97, 2008.

CATTO, J.B. Potencial acaricida de plantas como componente de sistema integrado para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Andreotti, R., Koller, W.W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas**. Campo Grande: Embrapa. pp. 119-135, 2013.

CHAGAS, A.C.S.; DOMINGUES, L.F.; FANTATTO, R.R.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M.C.S.; OLIVEIRA, D.H.; MANO, R.A.; JACOB, R.G. In vitro and in vivo acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 277-284, 2014.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.G.; OBERG, C.J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 5, p. 639-649, 2000.

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

DINIZ, J.A. 2014. *Siparuna guianensis* Aublet como nova fonte de α -bisabolol para o controle de *Rhipicephalus microplus*. Dissertação de mestrado. 94p. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

DUSAN, F.; MARIAN, S.; KATARINA, D.; DOBROSLAVA, B.; Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology In Vitro**, v. 20, p. 1435-1445, 2006.

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

EL-MONEIM, M.R.A.A.; ALI, F.S.; TURKY A.F. Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of chamomile, marjoram and Eucalyptus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 24-30, 2012.

EL-SAYED, A.M., 2018. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com/>, acesso em 07 Julho de 2019.

FACEY, P.C.; PORTER, R.B.R.; REESE, P.B.; WILLIAMS, L.A.D. Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4774-4777, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 1-7, 2007.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.; BARROS, A.T.; CANCADO, P.H.D. Reassessment of economic impact by cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

HAJAJI, S.; SIFAOU, I.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; REYES-BATLLE, M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; VALLADARES, B.; AKKARI, H.; LORENZO-MORALES, J.; PIÑERO, J.E. Leishmanicidal activity of α -bisabolol from Tunisian chamomile essential oil. **Parasitology Research**, v.117, n. 9, p. 2855-2867, 2018.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOKAZI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

JACK, I.R.; OKOROSAYE-ORUBITE, K.; BOBMANUEL, R.B. Assessment of the larvicidal potentials of thymol derivatives on *Anopheles* mosquitoes. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 10, p. 63-65, 2006.

JYOTI.; SINGH, N.K.; SINGH, H.; MEHTAB, N.; RATH, S.S. In vitro assessment of synergistic combinations of essential oils against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 201, 42-48, 2019.

KIM, E.; MOORE, B.S.; YOON, Y.J. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. **Nature Chemical Biology**, v. 11, p. 649-659, 2015.

KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society Coverage**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KONIG, I.F.M.; GONÇALVES, R.R.P.; OLIVEIRA, M.V.S.; SILVA, C.M.; THOMASI, S.S.; PECONICK, A.P.; REMEDIO, R.N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 766-774, 2019.

KUMAR, A.K.G.; FULAR, A.; CHIGURE, G.; SHARMA, A.K.; NAGAR, G.; SOUZA, F.F.; BECHARA, G.H.; GHOSH, S. Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*, **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1085-1095, 2019.

LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. in: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. (Eds.), **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. Instituto Butantan, São Paulo, pp.155-164, 2006.

LAGE, T.C.A.; MONTANARI, R.M.; FERNANDES, S.A.; MONTEIRO, C.M.O.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R.S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its

constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 148, 24-29, 2014.

LANUSSE, C.E.; PRICHARD, R.K. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. **Veterinary Parasitology**, v. 49, p. 123-158, 1993.

LEBOUVIER, N.; HUE, T.; HNAWIA, E.; LESAFFRE, L.; MENUT, C.; NOUR, M. Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1379-1384, 2013.

LEE, E.J.; KIM, J.R.; CHOI, D.R.; AHN, Y.J. 2008. Toxicity of cassia e cinnamon oil compounds and cinnamaldehyde-related compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1960-1966, 2008.

LEITE, G.O.; LEITE, L.H.I.; SAMPAIO, R.S.; ARARUNA, M.K.A.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; CAMPOS, A.R. (-)- α -bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia**, v. 82, p. 208-211, 2011.

LEW-TABOR, A.E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick- borne diseases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 573-585, 2016.

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

MATOS, R.S.; ROSA, P.; BRITO, L.C.M.; PAULA, L.G.F.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol: effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, 2019.

MATHELA, C.S.; SINGH, K.K.; GUPTA, V.K. Synthesis and in vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, p. 375-380, 2010.

MIRESMAILLI, S.; BRADBURY, R.; ISMAN, M.B. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. **Pest Management Science**, v. 62, p. 366-371, 2006.

MISHRA, A.K.; MISHRA, A.; BHARGAVA, A.; PANDEY, A.K. Antimicrobial activity of essential oils from the leaves of *Cinnamomum* spp. **National Academy Science Letters**, v. 31, p. 341-345, 2008.

MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JR, F.E.A.; CALMON, F.; SENRA, T.O.S.; FAZZA, A.P.; CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of

eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1295-1300, 2012.

MONTEIRO, I.N. Composição química e avaliação da atividade carrapaticida do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* no controle de *Rhipicephalus microplus*. **Dissertação de Mestrado**. 63p. Universidade Federal do Maranhão, São Luís Maranhão, Brasil, 2013.

MONTEIRO, I.N.; MONTEIRO, O.D.S.; COSTA-JUNIOR, L.M.; DA SILVA, L.A.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; MOUCHREK FILHO, V.E. Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 54-57, 2017.

NOVATO, T.P.L.; ARAÚJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, 3-4, p. 331-335, 2015.

NOVATO, T.; GOMES, G.A.; ZERINGÓTA, V.; FRANCO, C.T.; DE OLIVEIRA, D.R.; MELO, D.; DECARVALHO, M.G.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C.M. In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 260, p. 1-4, 2018.

OLIVEIRA, M.C.C.; CARVALHO, M.G.; FERREIRA, D.T.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. **Química Nova**, v. 22, p. 182-184, 1999.

PALUCH, G.E.; ZHU, J.; BARTHOLOMAY, L.; COATS, R.J. Amyris and Siam-wood Essential Oils: Insect Activity of Sesquiterpenes. **Pesticides in Household, Structural and Residential Pest Management**, v. 1015, p. 5-18, 2009.

PAVELA, R; BENELLI, G. Essential oils as eco-friendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Science**, v. 21, p. 1000-1007, 2016.

RAMÍREZ, C.; IBARRA, F.; PÉREZ, H.I.; MANJARREZ, N.; SALGADO, H.J.; ORTEGA, L. Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, p. 72-77, 2016.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K., 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 208-221, 2002.

RIBEIRO, V.L.S.; ROLIM, V.; BORDIGNON S.; HENRIQUES, A.T.; DORNELES, G.G.; LIMBERGER, R.P.; VON POSER, G. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miens (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v. 102, p. 531-535, 2008.

RIBEIRO, V.L.S.; DOS SANTOS, J.C.; MARTINS, J.R.; SCHRIPSEMAD, J.; SIQUEIRA, I.R.; VON POSERB, G.L.; APEL, M.A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 195-198, 2011.

SANTOS, D.S.; BOITO, J.P.; SANTOS, R.C.V.; QUATRIN, P.M.; OURIQUE, A.F.; DOS REIS, J.H.; GEBERT, R.R.; GLOMBOWSKY, P.; KLAUCK, V.; BOLIGON, A.A. Nanostructured cinnamon oil has the potential to control *Rhipicephalus microplus* ticks on cattle. **Experimental and Applied Acarology**, v. 73, p. 129-138, 2017.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; SILVA, V.B.; SANTOS, S.R.L.; CAVALCANTI, S.C.H.; MENDONÇA, F.B.M.J.R. Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. **Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 201-210, 2014.

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

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

SHAHVERDI, A.R.; MONSEF-ESFAHANI, H.R.; TAVASOLI, F.; ZAHERI, A.; MIRJANI, R. Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. 55-58, 2007.

SHEN, F.; XING, M.; LIU, L.; TANG, X.; WANG, W.; WANG, X.; WU, X.; WANG, X.; WANG, X.; WANG, G.; ZHANG, J.; LI, L.; ZHANG, J.; YU, L. 2012. Efficacy of trans-cinnamaldehyde against *Psoroptes cuniculi* in vitro. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1321-1326, 2012.

SINGH, R.; KOUL, O.; RUP, P.J.; JINDAL, J. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 29, p. 93-101, 2009.

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

SOUSA, O.V.; DUTRA, R.C.; YAMAMOTO, C.H.; PIMENTA, D.S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 113-116, 2008a.

SOUSA, O.V.; SILVÉRIO, M.S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; MATHEUS, F.C.; YAMAMOTO, C.H.; ALVES, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the

essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 771-777, 2008b.

SOUZA, J.R.; OLIVEIRA, P.R.; ANHOLETO, L.A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R.N.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Effects of carvacrol on oocyte development in semiengorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66-72, 2019.

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

TEIXEIRA, J.G.; LATORRACA, J.V.F.; TREVISAN, H.; PAE, J.B. Efficiency of neem oil and *Eremanthus erythropappus* residues on the xylophagus fungi inhibition. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 106, p. 417-426, 2015.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VILA, R.; SANTANA, A. I.; PÉREZ-ROSÉS, R.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M.V.; MENDONÇA, S.; ZACCHINO, S.; GUPTA, M.P.; CAÑIGUERAL, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2510-2514, 2010.

YANG, Y.C.; LEE, H.S.; LEE, S.H.; CLARK, J.M.; AHN, Y.J. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 14, p. 1595-1600, 2005.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE CARRAPATICIDA DO (*E*)-CINAMALDEÍDO E α - BISABOOL SOBRE POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) COM DIFERENTES PERFIS DE RESISTÊNCIA

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade acaricida do (*E*)-cinamaldeído e do α -bisabolol sobre populações de *Rhipicephalus microplus*, com diferentes perfis de resistência. Para caracterização da suscetibilidade das populações aos carrapaticidas, foi realizado o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (50 populações de campo) com os carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós. Para determinar os valores de CL₅₀ para o (*E*)-cinamaldeído (populações 1 a 25) e α -bisabolol (populações 26 a 50), foi utilizado o teste de pacote de larvas nas concentrações de 0,31, 0,62, 1,25, 2,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mg/mL. Nessa etapa também foi realizado um teste com a cepa suscetível Porto Alegre (POA), que foi utilizada como referência para cálculo da Razão de Resistência (RR₅₀). A deltametrina não resultou eficácia superior a 95% para nenhuma das populações (não ultrapassando 35%), enquanto o amitraz e o clorfenvinfós resultaram em eficácia superior a 95% para 3 (6%) e 15 (30%) populações, respectivamente. Nos testes de larva, os valores da CL₅₀ do (*E*)-cinamaldeído variaram entre 0,3 e 2,36 mg/mL e para o α -bisabolol variaram entre 1,57 a 3,01 mg/mL. A RR₅₀ para o (*E*)-cinamaldeído indicou que vinte populações (80%) apresentaram valor inferior a 1,0 e nenhuma população teve RR₅₀ superior a 1,5. Para o α -bisabolol, apenas duas populações (8%) apresentaram RR₅₀ inferior a 1,0, enquanto 3 populações (12%) apresentaram resistência incipiente a esse sesquiterpeno (RR₅₀ entre 1,5 a 2,0). Os resultados indicam que todas as populações estudadas apresentaram baixa suscetibilidade a pelo menos um dos carrapaticidas comerciais testados. Além disso, comparado os resultados de CL₅₀ do (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol para as populações de campo e cepa suscetível (POA), é possível inferir que não existe resistência cruzada do (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol com os carrapaticidas avaliados, e que as diferenças nos resultados de CL₅₀ se devem a variações populacionais.

Palavras-chave: Carrapato bovino, carrapaticidas botânicos, fenilpropanoide, sesquiterpeno, resistência cruzada

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the acaricidal activity of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol on populations of *Rhipicephalus microplus* with different resistance profiles. The Adult Immersion Test (AIT) was used to characterize the susceptibility of engorged female tick populations (50 field populations) at the package insert concentration of the following pesticides: deltamethrin, amitraz, and chlorfenvinphos. The Larval Packet Test (LPT) was used to determine the LC₅₀ values for the (*E*)-cinnamaldehyde (populations 1 to 25) and α -bisabolol (populations 26 to 50) botanical acaricides at the concentrations of 0.31, 0.62, 1.25, 2.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/mL. At this stage, a test was also performed with the susceptible strain Porto Alegre (POA), which was used as a reference for calculating the resistance ratio (RR). Deltamethrin did not show efficacy >95% for any of the populations, whereas amitraz and chlorfenvinphos presented efficacy >95% for three (6%) and 15 (30%) populations, respectively. In the larval tests, the LC₅₀ values of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol varied from 0.3 to 2.36 mg/mL and from 1.57 to 3.01 mg/mL, respectively. The RR₅₀ for (*E*)-cinnamaldehyde showed twenty (80%) populations with values <1.0 and no population with values >1.5. As for α -bisabolol, only two (8%) populations presented RR₅₀ values <1.0, whereas three (12%) populations showed incipient resistance to this sesquiterpene (RR₅₀ between 1.5 and 2.0). The results indicate that all studied tick populations showed low susceptibility to at least one of the commercial pesticides tested. In addition, comparison between the LC₅₀ values of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol for field populations and the susceptible strain POA suggests that there is no cross-resistance of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol for the ticks evaluated, and that the differences in the LC₅₀ values are due to population variations.

Keywords: Bovine tick, botanical acaricides, phenylpropanoid, sesquiterpene, cross-resistance

1 INTRODUÇÃO

O carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), é um ectoparasito de relevância mundial, que se caracteriza por cargas parasitárias elevadas, gerando consideráveis perdas econômicas. No Brasil, que apresenta o segundo maior rebanho bovino do mundo (218,23 milhões de cabeças) (IBGE, 2016), o parasitismo por esse carrapato ocasiona perdas anuais estimadas em 3,24 bilhões de dólares (GRISI et al., 2014). Esses prejuízos são decorrentes da ação direta do carrapato, ocasionando perda de sangue, reações alérgicas e inflamatórias, estresse dos animais e predisposição a miíases; e indiretas, pela transmissão de agentes patogênicos e custos com medicamentos, equipamentos e mão de obra para o tratamento dos animais (FURLONG et al., 2004).

Atualmente, o uso de carrapaticidas sintéticos é a ferramenta mais utilizada no controle desse carrapato. Contudo, por ser o método mais efetivo e com melhor custo benefício, esses produtos tem sido amplamente utilizados; e essa constante utilização, as vezes sem critérios técnicos, somado ao ciclo de vida curto e elevadas taxas de reprodução, tem propiciado a seleção de populações resistentes (FURLONG et al., 2007; ABBAS et al. 2014; GUERRERO et al., 2014). Atualmente, já existem registros de populações resistentes a todas as classes químicas utilizadas como carrapaticidas, incluindo populações multirresistentes (RECK et al., 2014; KLAFKE et al., 2017). Diante do atual cenário, novas alternativas de controle têm sido investigadas, e nesse sentido, os óleos essenciais (OEs) tem recebido atenção especial (ROSADO AGUILAR et al., 2017; ADENUBI et al., 2018).

Os OEs são constituídos por complexas misturas naturais, com diferentes moléculas que podem ser divididas em dois grupos de acordo com a sua biossíntese: um grupo composto pelos terpenos e terpenóides, do qual fazem parte os monoterpenos e os sesquiterpenos; e um grupo contendo compostos aromáticos e alifáticos, denominados de fenilpropanóides (derivados do fenilpropano) (BAKKALI et al., 2008; ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Presente no OE de plantas do gênero *Cinnamomum* (canela), o fenilpropanóide (*E*)-cinamaldeído já teve a sua atividade biológica evidenciada para fungos (SHREAZ et al. 2011), bactérias (CHANG et al. 2008), insetos (CHENG et al., 2008; CHENG et al., 2009) e diferentes espécies de carrapatos (Senra et al., 2013a, Senra et al., 2013b, Novato et al., 2015; MONTEIRO et al., 2017). Já o sesquiterpeno α -bisabolol é uma das principais substâncias presentes nos OE da *Matricaria chamomilla* (camomila) e *Eremanthus erythropappus* (candeia) (AMARAL et al., 2008; SOUSA et al., 2008). Esse sesquiterpeno apresenta atividade antihelmíntica (SOUZA et al., 2008), anti-inflamatória (LEITE et al., 2011, VILA et al., 2010), antimicrobiana e anticancerígena (KAMATOU e VILJOEN, 2010).

Pouco se sabe sobre a variação de toxicidade que um OE e/ou substância isolada de OE pode apresentar em diferentes populações de uma determinada espécie de artrópode; bem como se as populações resistentes a pesticidas comerciais também seriam resistentes aos OEs (resistência cruzada). Em insetos, existem informações divergentes, com estudos que evidenciam que populações resistentes aos inseticidas também apresentam certa resistência aos OEs (LEE, 2002; TAK et al., 2020), e pesquisas que não observam essa resistência cruzada (CHOI et al., 2010). Costa Júnior et al. (2016) realizaram um estudo com duas populações de *R. microplus*, uma suscetível e outra resistente a organofosforados, e observaram que o carvacrol (substância encontrada em OE de *Lippia* spp.) foi 3,2 vezes mais tóxico para uma cepa suscetível. Singh et al. (2018) avaliaram a atividade de uma associação de OE e um terpenóide (OE de alecrim + OE de hortelã-pimenta + geraniol) sobre populações suscetíveis e resistentes de *R. microplus* e observaram que quatro populações resistentes aos carrapaticidas químicos, apresentaram resistência incipiente a essa mistura. Assim, o presente trabalho propõe avaliar a atividade acaricida de substâncias de duas classes químicas

encontradas em OEs, o fenilpropanoide (*E*)-cinamaldeído e o sesquiterpeno α -bisabolol, sobre populações de campo de *R. microplus*, com diferentes perfis de resistência aos carrapaticidas sintéticos comerciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Carrapatos

Foram utilizadas populações aleatórias de carrapatos, provenientes de amostras (fêmeas ingurgitadas) enviadas por produtores rurais de diferentes regiões do Brasil ao Laboratório de Parasitologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do estudo foram utilizadas um total de 50 populações, provenientes dos estados de Minas Gerais (36), São Paulo (5), Espírito Santo (3), Paraná (3), Rio de Janeiro (2) e Bahia (1) (Figura 1). Dessas 50 populações, 25 foram utilizadas para os testes com o (*E*)-cinamaldeído (Populações de 1 a 25) e 25 para os experimentos com o α -bisabolol (Populações de 26 a 50). Também foi utilizada uma cepa sensível de referência (Porto Alegre – POA), cedida pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

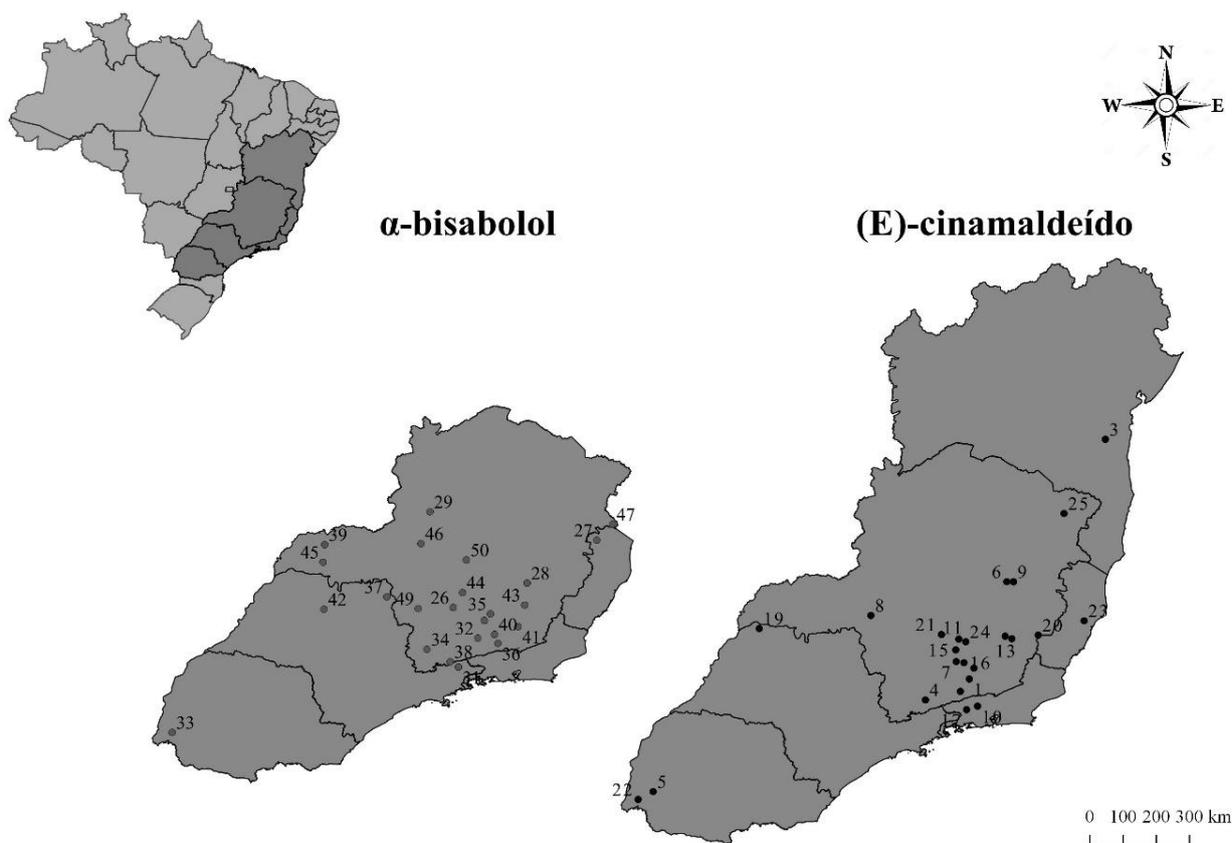


Figura 1 – Distribuição geográfica das populações de *Rhipicephalus microplus* utilizadas nos testes com (*E*)-cinamaldeído (populações de 1 a 25) e α -bisabolol (populações de 26 a 50).

Parte das fêmeas ingurgitadas foi utilizada para realização do teste de imersão de adultos (TIA) com carrapaticidas comerciais, enquanto outra parte foi acondicionada em câmara climatizada, com temperatura e umidade controlada (27 ± 1 °C e UR de 80 ± 10 %), por 15 dias, para realização da postura. Após esse período, a massa de ovos foi pesada em alíquotas de 200 mg e acondicionadas em seringas com extremidade distal cortada e vedadas com algodão hidrófilo. Essas seringas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente, permitindo a obtenção das larvas utilizadas nos testes com (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol. Para realização do teste de pacote de larvas foram utilizadas larvas com 15 a 21 dias de idade, pós eclosão.

2.2 Teste de imersão de adultos (TIA) com carrapaticidas comerciais

O perfil de suscetibilidade aos carrapaticidas comerciais em cada amostra das populações de campo foi realizado através do teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (DRUMMOND et al., 1973). Foi utilizado deltametrina (piretróide sintético), na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Butox®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), amitraz (amidínico), na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Triatox®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e clorfenvinfós (organofosforado), na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Supokill®, UCBVET Saúde Animal, Jaboticabal, SP, Brasil). Todos carrapaticidas foram diluídos em água, conforme recomendado na bula.

Os testes com os carrapaticidas comerciais foram realizados no Laboratório de Parasitologia da EMBRAPA Gado de Leite. As fêmeas de cada população foram separadas em quatro grupos (10 fêmeas por grupo) com pesos homogêneos ($p > 0,05$) (fêmeas pesadas em grupos). Em seguida, cada grupo foi imerso por cinco minutos nas soluções da concentração comercial dos carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós. Também foi formado um grupo controle, utilizando água destilada. Após a imersão, as fêmeas ingurgitadas foram colocadas em placas de Petri (10 fêmeas por placa) e acondicionadas em câmara climatizada (27 ± 1 °C e UR de 80 ± 10 %) para a realização de postura. Ao final do período de postura, as massas de ovos foram transferidas para seringas individuais, e mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente para posterior avaliação do percentual de eclosão, por estimativa visual.

A partir dos valores de peso das fêmeas ingurgitadas antes da postura (mg), peso da massa de ovos (mg) e percentual de eclosão (%), foi realizado o cálculo de eficácia dos tratamentos de acordo com Drummond et al. (1973).

2.3 Teste de pacote de larvas (TPL) com (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol

Foi utilizado o teste de pacote de larvas proposto por Stone e Haydock (1962) e adaptado por Monteiro et al. (2012). O (*E*)-cinamaldeído, com emissão de certificado de grau de pureza igual a 99%, foi adquirido comercialmente junto a empresa Sigma-Aldrich (San Luis, MO, US). O α -bisabolol (grau de pureza igual a 95%) foi gentilmente cedido pela empresa Citróleo Indústria e Comercio LTDA (Torrinha, SP, Brasil). Para realização dos testes de larvas não alimentadas, o (*E*)-cinamaldeído foi diluído em etanol 70% (água destilada + etanol v/v) nas concentrações de 0.31, 0.62, 1.25, 2.0, 2.5, 5.0 (mg/mL), enquanto o α -bisabolol foi diluído em etanol 50% (água destilada + etanol v/v) nas concentrações de 0.62, 1.25, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0 (mg/mL).

Aproximadamente 100 larvas não alimentadas, com 15 a 21 dias de idade, foram colocadas no centro de um papel de filtro (6 x 6 cm), que em seguida, foi dobrado ao meio e vedado nas extremidades com cliques binder. Após a formação dos pacotes, cada lado do papel

filtro foi umedecido com 90 µL das concentrações mencionadas anteriormente, totalizando 180 µL por pacote. Também foi formado um grupo controle, exposto somente ao solvente (etanol) na concentração utilizada para cada substância. Para cada grupo foram feitas 10 replicas, sendo realizado também tratamentos com grupo controle (solvente etanol 50%, etanol 70%, água deslitada).

Os pacotes contendo os carrapatos foram acondicionados em câmara climatizada (27 ± 1 °C e UR de 80 ± 10 %) por 24 h, e transcorrido esse período, foi feita a quantificação de larvas mortas e vivas para obtenção do percentual de mortalidade.

2.4 Análise estatística

Por apresentarem distribuição não normal, de acordo com o teste de Tukey, as médias das eficácias dos carrapaticidas foram comparadas por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keuls, utilizando o software Bioestat 5.3.

A CL_{50} do (*E*)-cinamaldeído e do α -bisabolol foi determinada pela análise de Probit (Finney, 1971), utilizando o programa POLOPC[®] (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA, USA). A razão de resistência (RR_{50}) foi calculada a partir do valor da CL_{50} de determinada população pela CL_{50} da cepa suscetível (POA) (Robertson e Preisler, 1992). De acordo com os valores de RR_{50} , as populações foram classificadas da seguinte forma: $< 1,5$ = população suscetível; 1,5 a 2,0 = resistência incipiente; $> 2,0$ = população resistente (Castro-Janer et al., 2010). A relação entre a maior e menor CL_{50} foi obtida a partir da divisão do valor de maior CL_{50} , pelo valor da menor CL_{50} .

Para investigar possível correlação entre a suscetibilidade das populações de *R. microplus* ao (*E*)-cinamaldeído, α -bisabolol e aos carrapaticidas comerciais, foi aplicado o teste de correlação de Pearson ($p > 0,05$), utilizando o software Biostat 5.3.

3 RESULTADOS

3.1 Eficácia dos carrapaticidas e (*E*)-cinamaldeído

Com relação aos dados obtidos no teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (populações 1 a 25), foi possível verificar que a deltametrina (piretroide) não resultou em eficácia superior a 95% para nenhuma das populações estudadas, apresentando valores entre 0,0 e 35,0%. Para o amitraz (amidínicos), foi observado eficácia superior a 95% para três populações (12%) e valores de eficácia variando entre 0,0 a 99,1%. Os valores de eficácia para clorfenvinfós variaram entre 4,0 e 100%, com eficácia superior a 95% em oito populações (32%) (Tabela 1).

Para o (*E*)-cinamaldeído, os valores de CL_{50} variaram entre 0,23 a 2,36 mg/mL, e a relação entre a maior e menor CL_{50} foi de 10,26 vezes, enquanto para cepa POA, foi observado CL_{50} de 1,57 mg/mL. O cálculo da RR_{50} revelou que vinte populações (80%) apresentaram valor inferior a 1,0, uma vez que para essas populações foram encontrados valores de CL_{50} inferiores ao valor observado para cepa referência POA (CL_{50} 1.57 mg/mL), e nenhuma população apresentou RR_{50} superior a 1,5 (Tabela 1). Sobre a análise de correlação de Pearson, não foram observadas correlações entre os valores de CL_{50} do (*E*)-cinamaldeído e os valores de eficácia para deltametrina ($p = 0,68$ e $R = 0,09$), amitraz ($p = 0,54$ e $R = 0,13$), e clorfenvinfós ($p = 0,38$ e $R = 0,19$).

Tabela 1 – Eficácia de diferentes carrapaticidas (%) e valores de concentração letal 50% (CL₅₀) do (*E*)-cinamaldeído (mg/mL) em populações de *Rhipicephalus microplus*. Estudo conduzindo em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR de 80 ± 10 %).

População	Origem	Carrapaticidas*			<i>(E)</i> -cinamaldeído		
		P (%)	AM (%)	OF (%)	CL ₅₀	I.C.	RR ₅₀
Cepa Sensível	Porto Alegre/RS	1,57	1,3-1,8	1,00
1	Santa Rita do Ibitipoca/MG	0,0	8,4	71,8	0,23	0,1-0,3	0,14 (0,10-0,20)
2	Peçanha/MG	3,9	10,6	44,3	0,50	0,2-0,5	0,31 (0,32-1,17)
3	Ipiaú/BA	0,0	46,1	84,4	0,51	0,4-0,6	0,32 (0,31-0,34)
4	Cristina/MG	19,9	54,4	55,4	0,58	0,5-0,7	0,36 (0,36-0,37)
5	Santa Tereza D'Oeste/PR	10,3	3,2	88,4	0,77	0,3-1,6	0,49 (0,26-0,87)
6	São João Evangelista/MG	8,1	91,5	82,8	0,96	0,8-1,0	0,61 (0,59-0,62)
7	Ritápolis/ES	35,0	67,3	98,4	1,02	0,9-1,1	0,64 (0,64-0,66)
8	Araxá/MG	29,2	60,0	100,0	1,02	0,9-1,1	0,64 (0,62-0,68)
9	Peçanha/MG	0,0	3,2	21,1	1,04	1,0-1,2	0,66 (0,65-0,80)
10	Vassouras/RJ	...	25,4	93,3	1,04	0,9-1,2	0,66 (0,66-0,66)
11	Bonfim/MG	0,0	86,5	4,0	1,05	0,9-1,2	0,66 (0,65-0,68)
12	Santa Cruz do Escalvado/MG	3,5	85,1	96,6	1,13	1,0-2,4	0,71 (0,13-0,75)
13	Santo Antônio do Gramma/MG	0,9	99,0	100,0	1,19	1,0-1,3	0,75 (0,72-0,79)
14	Bom Jardim de Minas/MG	0,0	0,0	100,0	1,23	1,0-1,3	0,78 (0,75-0,80)
15	Desterro de Entre Rios/MG	9,6	56,3	99,9	1,24	1,1-1,4	0,78 (0,76-0,81)
16	Prados/MG	0,0	48,8	33,5	1,28	1,1-1,4	0,81 (0,78-0,85)
17	Pinheiral/RJ	...	0,0	...	1,30	1,1-1,4	0,82 (0,79-0,86)
18	Barbacena/MG	12,3	15,5	84,6	1,38	1,1-1,2	0,87 (0,68-0,89)
19	Ouroeste/SP	22,2	99,1	95,0	1,42	1,2-1,6	0,90 (0,87-0,92)
20	Durandé/SP	1,4	83,2	75,9	1,51	1,3-1,6	0,96 (0,90-1,02)
21	Carmo do Cajuru/MG	0,0	63,7	93,9	1,58	1,4-1,7	1,00 (0,96-1,05)
22	Medianeira/PR	6,9	14,5	98,8	1,70	1,5-1,9	1,12 (1,08-1,17)
23	João Neiva/ES	2,7	0,8	44,3	1,80	1,6-1,9	1,46 (1,09-1,20)
24	Belo Vale/MG	0,0	95,3	82,4	1,90	1,6-2,2	1,21 (1,21-1,20)
25	Jequitinhonha/MG	25,3	34,8	90,2	2,36	1,4-3,8	1,50 (1,08-2,09)
Eficácia média (média ± desvio padrão)		3,5 ^a ± 10,6	48,8 ^b ± 35,8	86,5 ^c ± 27,7			
CL ₅₀ média (média ± desvio padrão)					1,21 ± 0,47		
Diferença – maior CL ₅₀ / menor CL ₅₀					10,26 x		

Carrapaticidas utilizados: P = Piretroide (Deltametrina); AM = Amidina (Amitraz); OF = Organofosforado (Clorfenvinfós).

... = não avaliado.

* - Calculado segundo Drummond et al, (1973). Teste com fêmeas ingurgitadas.

Médias comparadas por Kruskal-Walis/Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.

CL₅₀ = Concentração Letal 50%. Teste com larvas não alimentadas.

I.C. = Intervalo de confiança.

RR₅₀ = Razão de Resistência.

3.2 Eficácia dos carrapaticidas e α -bisabolol

No teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (populações 26 a 50) com os carrapaticidas, foi possível observar que os valores de eficácia para deltametrina variaram de 0,0 a 52,6%, não sendo observada eficácia acima de 95% para nenhuma das populações avaliadas. Os valores de eficácia para o amitraz variaram entre 0,0 e 84,8%, não sendo constatada, novamente, eficácia superior a 95%. Para o clorfenvinfós os valores de eficácia variaram entre 0,0 e 100%, com eficácia superior a 95% em sete populações (28%) (Tabela 2).

Em relação ao α -bisabolol, foram encontrados valores de CL_{50} entre 1,57 e 3,01 mg/mL, enquanto a CL_{50} para cepa POA foi de 1,70 mg/mL e a relação entre a maior e menor CL_{50} foi de 1,92 vezes (Tabela 2). Para o α -bisabolol, apenas duas populações (8%) apresentaram RR_{50} inferior a 1,0, enquanto três populações (12%) apresentaram resistência incipiente, com RR_{50} entre 1,5 e 2,0 (Tabela 2).

Não foram observadas correlações entre os valores de CL_{50} do α -bisabolol e a eficácia da deltametrina ($p = 0,28$ e $R = 0,24$), amitraz ($p = 0,17$ e $R = -0,28$), no entanto, foi observado uma fraca correlação entre a CL_{50} α -bisabolol e a eficácia do clorfenvinfós ($p = 0,04$ e $R = -0,42$).

Tabela 2 – Eficácia de diferentes carrapaticidas (%) e valores de concentração letal 50% (CL₅₀) do α -bisabolol (mg/mL) em populações de *Rhipicephalus microplus*. Estudo conduzindo em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR de 80 ± 10 %).

População	Origem	Carrapaticidas*			α -bisabolol		
		P (%)	AM (%)	OF (%)	CL ₅₀	I.C.	RR ₅₀
Cepa Sensível	Porto Alegre/RS	1,70	1,4-2,0	1,0
26	Candeias/MG	...	60,6	...	1,57	1,3-1,7	0,92 (0,88-0,95)
27	Ecoporanga/ES	0,0	58,2	60,2	1,68	1,4-1,9	0,98 (0,98-0,99)
28	São Domingos do Prata/MG	3,4	68,9	69,6	1,78	1,4-2,1	1,04 (1,02-1,06)
29	João Pinheiro/MG	11,9	56,5	100,0	1,86	1,6-2,1	1,09 (1,08-1,10)
30	São João Del Rei/MG	8,7	18,5	76,2	1,88	1,6-2,1	1,10 (1,07-1,13)
31	Cachoeira Paulista/MG	13,5	56,4	82,3	1,93	1,7-2,1	1,13 (1,09-1,17)
32	São Vicente de Minas/MG	0,0	50,8	100,0	1,93	1,7-2,1	1,13 (1,09-1,17)
33	Matelândia/MG	17,6	63,9	98,6	1,95	1,7-2,2	1,14 (1,05-1,18)
34	Congonhal/MG	18,2	19,3	78,0	1,97	1,7-2,2	1,15 (1,14-1,17)
35	Lagoa Dourada/MG	12,1	0,0	63,3	2,03	1,6-2,1	1,19 (1,08-1,16)
36	Lima Duarte/MG	20,0	56,5	100,0	2,07	1,8-2,3	1,21 (1,15-1,27)
37	Franca/MG	9,1	46,9	100,0	2,10	1,7-2,5	1,23 (1,17-1,29)
38	Delfim Moreira/MG	7,9	62,2	76,7	2,14	1,8-2,4	1,25 (1,23-1,28)
39	Ituiutaba/MG	0,0	44,9	69,9	2,18	1,6-2,5	1,28 (1,11-1,26)
40	Santa Rita do Ibitipoca/MG	0,8	84,8	88,2	2,20	1,9-2,5	1,29 (1,26-1,32)
41	Rio Pomba/MG	0,0	31,2	20,9	2,28	1,9-2,6	1,34 (1,32-1,35)
42	Potirendaba/SP	0,0	0,0	37,3	2,34	2,0-2,7	1,37 (1,36-1,39)
43	Guaraciaba/MG	0,0	17,1	00	2,36	2,0-2,7	1,38 (1,36-1,41)
44	Pompeu/MG	0,0	18,7	0,0	2,39	2,0-2,7	1,40 (1,38-1,42)
45	São Sebastião do Oeste/MG	0,0	70,3	42,7	2,40	2,0-2,8	1,41 (1,40-1,42)
46	Campina Verde/MG	4,9	64,4	99,4	2,46	2,2-2,7	1,44 (1,36-1,53)
47	Lagoa Formosa/MG	0,0	27,3	74,2	2,47	2,2-2,7	1,45 (1,36-1,53)
48	Nanuque/MG	22,0	3,6	53,5	2,62	2,2-3,0	1,54 (1,52-1,56)
49	São João Del Rei/MG	52,6	74,8	98,7	2,68	2,1-3,2	1,57 (1,50-1,64)
50	Alpinópolis/MG	...	19,6	48,5	3,01	2,5-3,5	1,77 (1,76-1,77)
Eficácia média (média ± desvio padrão)		4,9 ^a ± 12,1	50,8 ^b ± 25,1	75,2 ^c ± 30,6			
CL ₅₀ média (média ± desvio padrão)					2,12 ± 0,34		
Diferença – maior CL ₅₀ / menor CL ₅₀					1,92 x		

Carrapaticidas utilizados: P = Piretroide (Deltametrina); AM = Amidina (Amitraz); OF = Organofosforado (Clorfenvinfós).

... = não avaliado.

* - Calculado segundo Drummond et al, (1973). Teste com fêmeas ingurgitadas.

Médias comparadas por Kruskal-Walis/Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.

CL₅₀ = Concentração Letal 50%. Teste com larvas não alimentadas.

I.C. = Intervalo de confiança.

RR₅₀ = Razão de Resistência.

4 DISCUSSÃO

A resistência de *R. microplus* às principais classes carrapaticidas tem sido reportada em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo, como no Brasil (RECK et al., 2014, KLAFKE et al., 2017), México (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2014), Equador (RODRÍGUEZ-HIDALGO et al., 2017), Índia (JYOTI et al., 2016) e África do Sul (ROBBERTSE et al., 2016). O uso de fitoquímicos tem sido apontado como alternativa no controle de artrópodes-pragas, no entanto, há divergências nos estudos sobre a ação dessas substâncias em populações, com diferentes perfis de resistência (LEE, 2002; CHOI et al., 2010; COSTA-JÚNIOR et al., 2016; SINGH et al., 2018). No intuito de melhor compreender essas diferenças intraespecíficas, o presente estudo descreve pela primeira vez a ação de dois compostos puros sobre 51 populações (incluindo cepa suscetível) de uma mesma espécie de carrapato, com diferentes perfis de resistência aos carrapaticidas comerciais.

De acordo o WAAVP (HOLDSWORTH et al., 2006), para ser eficaz, um carrapaticida precisa apresentar uma eficácia igual ou maior a 95%. No presente trabalho foi verificada baixa suscetibilidade das populações de *R. microplus* aos produtos comerciais, em especial a deltametrina, uma vez que não foi observada eficácia superior a 95% em nenhuma das cinquenta populações testadas. Para o amitraz e o clorfenvinfós, eficácia superior a 95% foi observada em três populações (6%) e quinze populações (30%), respectivamente. Esses dados corroboram com diferentes estudos que tem evidenciado um cenário desafiador em relação a resistência de *R. microplus* aos carrapaticidas em diferentes regiões do mundo (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2014; JYOTI et al., 2016; KLAFKE et al., 2016; ROBBERTSE et al., 2016; RODRÍGUEZ-HIDALGO et al., 2017).

A CL₅₀ do (*E*)-cinamaldeído variou de 0,23 a 2,36 mg/mL, indicando uma relação de 10,26x entre a maior e a menor CL₅₀, e um valor médio de 1,21 mg/mL, enquanto que a cepa suscetível (POA) apresentou um valor de CL₅₀ de 1,57 mg/mL. Esta alta diferença sugere variação na suscetibilidade entre diferentes populações em relação a um único composto vegetal. Esses dados expandem o conhecimento existente na literatura a respeito da atividade carrapaticida do (*E*)-cinamaldeído. Estudos anteriores demonstraram que o (*E*)-cinamaldeído na concentração de 2,5 mg/mL resultou em mortalidade de 99,2, 98,5 e 100% para larvas não alimentadas de *R. microplus*, *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (SENRA et al., 2013a) e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (SENRA et al., 2013b), respectivamente. Novato et al. (2015) observaram valores de CL₅₀ para o (*E*)-cinamaldeído sobre larvas não alimentadas de *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888) (1,40 mg/mL) e *D. nitens* (1,68 mg/mL), próximos ao valor médio de CL₅₀ encontrado no presente estudo para *R. microplus* (1,21 mg/mL).

A variação entre as médias de CL₅₀ do α -bisabolol foi menor (1,57 e 3,01 mg/mL), com valor médio de 2,12 mg/mL. A relação entre a maior e menor CL₅₀ foi de 1,92x, valor inferior ao que foi observado para o (*E*)-cinamaldeído. Em estudo realizado por Diniz (2014), a CL₅₀ do α -bisabolol puro para larvas não alimentadas de *R. microplus* foi de 2,40 mg/mL, valor próximo ao encontrado para CL₅₀ média desse sesquiterpeno, no presente estudo (2.12 mg/mL).

Alguns autores apontam que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência aos pesticidas comerciais não são capazes de conferir resistência aos produtos de origem vegetal, uma vez que o modo de ação seria diferente (ROSADO-AGUILAR et al., 2017; TAK et al., 2020), embora existam dados que evidenciem uma possível resistência cruzada (LEE et al., 2002). Também há resultados que sugerem um aumento na eficácia de compostos vegetais em cepas resistentes aos carrapaticidas (COSTA-JUNIOR et al., 2016). Lee et al. (2002) verificaram que uma cepa resistente a organofosforado do coleóptero

Oryzaephilus surinamensis (L.) apresentou resistência ao OE de lavanda, sugerindo a existência de resistência cruzada. Estudo recente, com exposição de *Aedes aegypti* (resistente a piretroides) a dois OEs, evidenciou a existência de discreta resistência cruzada (TAK et al, 2020). Em contraste, Choi et al. (2010) demonstraram que os OEs de cravo e eucalipto apresentaram atividade semelhante para populações de *Pediculus humanus capitis* (De Geer), resistentes e suscetíveis a piretróides.

Para carrapatos, existem apenas dois estudos semelhantes disponíveis na literatura. Costa-Júnior et al. (2016) avaliaram a atividade carrapaticida do timol e carvacrol a duas cepas de *R. microplus* (resistente e suscetível a organofosforados), e observaram que a cepa suscetível foi 3,2x mais resistente ao carvacrol. Singh et al. (2018) investigaram a atividade de um produto botânico comercial sobre 10 populações de *R. microplus* e observaram que duas populações resistentes (pop 1 - piretroides e organofosforados / pop 2 - piretróides, organofosforados, amitraz e fipronil) também apresentaram baixa resistência ao acaricida botânico.

Pouco se sabe sobre os mecanismos de ação dos diferentes compostos vegetais, no entanto alguns estudos têm demonstrado que existem diferenças no modo de ação de cada substância. Um ponto em comum observado é que esses compostos são capazes de alterar a integridade da parede celular e membrana citoplasmática de fungos, bactérias e carrapatos, resultando em lise e subsequente extravasamento de conteúdo intracelular (TURGIS et al., 2009; DEVI et al., 2010; TIAN et al., 2012; MATOS et al., 2019; MATOS et al., 2020). Além disso estudos apontam que compostos botânicos atuam no sistema nervoso de artrópodes, podendo agir no neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico), em receptores nicotínicos, receptores de octopamina, na ação da acetilcolinesterase e no bloqueio dos canais de cloro (REGNAULT-ROGER et al., 2012; PAVELA; BENELLI, 2016).

A ação do (*E*)-cinamaldeído sobre bactérias altera a permeabilidade celular, alterando a integridade e potencial de membrana das células, levando a morte desses microorganismos (ZHANG et al, 2016; WANG et al., 2018; DHARA e TRIPATHI, 2020). Já a ação do α -bisabolol sobre protozoários do gênero *Leishmania* induz alterações ultraestruturais, como ruptura de mitocôndria e condensação de cromatina, sugerindo que o tratamento com o composto vegetal tenha causado apoptose e estresse oxidativo das células, mas sem alterar a integridade da membrana plasmática (CORPAS-LÓPEZ et al, 2016). Para artrópodes, ainda não existem dados a respeito de como (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol atuam.

No presente estudo, nenhuma das populações apresentou RR_{50} superior a 1,5 para o (*E*)-cinamaldeído, indicando ausência de resistência das populações de campo para essa substância, em relação a cepa suscetível (POA). Além disso, também não foi observado correlação entre a CL_{50} do (*E*)-cinamaldeído e os valores de eficácia dos carrapaticidas. Para o α -bisabolol apenas três populações apresentaram RR_{50} superior a 1,5, indicando resistência incipiente. Também não foram observadas correlação entre a CL_{50} do α -bisabolol e os valores de eficácia para deltametrina e amitraz, e uma correlação fraca para clorfenvinfós. Esses resultados vão na contramão da hipótese de resistência cruzada, sugerindo que as variações de CL_{50} encontradas estariam associadas a características específicas de cada população de *R. microplus*, podendo estar relacionadas com uma plasticidade fenotípica.

Diante do exposto, concluímos que os compostos (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, apresentam variada toxicidade sobre populações de *R. microplus*, contudo, não foi observado correlação entre a resistência aos carrapaticidas sintéticos e maior resistência aos compostos vegetais testados nas diferentes populações. Tal fato é positivo para esforços futuros para desenvolvimento de carrapaticidas utilizando OEs como ingredientes ativos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R.Z.; ZAMAN, M.A.; COLWELL, D.D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6-20, 2014.

ADENUBI, O.T.; AHMED, A.S.; FASINA, F.O.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: a systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 779-806, 2018.

AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; FAVARETTO, N.; KOELER, H.S.; SHEER, A.P., YAMAMOTO, C., CÔCCO, C.L. Desenvolvimento, rendimento e composição de óleo essencial de camomila [*Chamomila recutita* (L.) Rauschert] sob adubação orgânica e mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 1-8, 2008.

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

CHANG, C.W.; CHANG, W.L.; CHANG, S.T.; CHENG, S.S. Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. **Water resources**, v. 42, p. 278-286, 2008.

CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; LIN, C.Y.; HSUI, Y.R.; JU, M.C.; WU, W.J.; CHANG, S.T. Terminating red imported fire ants using *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 889-893, 2008.

CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; HUANG, C.G.; HSU, Y.R.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 100, 457-464, 2009.

CHOI, H.Y.; YANG, Y.C.; LEE, S.H.; CLARK, J.M.; AHN, Y.J. Efficacy of spray formulations containing binary mixtures of clove and eucalyptus oils against susceptible and pyrethroid/malathion-resistant head lice (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p. 387-391, 2010.

CORPAS-LÓPEZ, V., MERINO-ESPINOSA, G., DÍAZ-SÁEZ, V., MORILLAS-MÁRQUEZ, F., NAVARRO-MOLL, M. C., AND MARTÍN-SÁNCHEZ, J. The sesquiterpene (-)-alpha-bisabolol is active against the causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis through the induction of mitochondrial-dependent apoptosis. **Apoptosis**, v. 21, p. 1071-1081, 2016.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; MILLER, R.J.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; LI, A.Y.; PÉREZ DE LEÓN, A.A. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60-64, 2016.

DEVI, K.P., NISHA, S.A., SAKTHIVEL, R., PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular

membrane. **Journal Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115, 2010.

DHARA1, L., TRIPATHI, A. Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, p. 65-73, 2020.

DINIZ, J.A. *Siparuna guianensis* Aublet como nova fonte de α -bisabolol para o controle de *Rhipicephalus microplus*. Dissertação de Mestrado. 94p. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil, 2014.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**, v. 66, p. 30-133, 1973.

FINNEY, D.S., 1971. Probit Analysis, 30 ed. Cambridge University Press, Cambridge.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 23, p. 53-56, 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 1-7, 2007.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.; BARROS, A.T.; CANCADO, P.H.D. Reassessment of economic impact by cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GUERRERO, F.D.; DE LEÓN, A.A.P.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; JONSSON, N.N.; MILLER, R.J.; ANDREOTTI, R. Acaricide research and development, resistance, and resistance monitoring. In: Sonenshire, D.E; Roe, R.M. editors. *Biology of Ticks*. Volume 2. 2nd ed. New York: Oxford University Press., 2014.

HOLDSWORTH, P.A.; KEMP, D.; GREEN, P.; PETER, R.J.; DE BRUIN, C.; JONSSON, N.; LETONJA, T.; REHBEIN, S.; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 29-43, 2006.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>. Acesso em: Fevereiro de 2019.

JYOTI.; SINGH, N.K.; SINGH, H.; SINGH, N.K.; RATH, S.S. Multiple mutation in the acetylcholinesterase 3 gene associated with organophosphate resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick from Punjab, India. **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 108-117, 2016.

KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabololrich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87(1), p. 1-7, 2010.

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B.D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L.H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M.F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state. Southern Brazil **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 8(1), p. 73-80, 2017.

LEE, S. Biochemical mechanisms conferring cross-resistance to fumigant toxicities of essential oils in a chlorpyrifos-methyl resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 38, p. 157-166, 2002.

LEITE, G.O.; LEITE, L.H.I.; SAMPAIO, R.S.; ARARUNA, M.K.A.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; CAMPOS, A.R. (-)- α -bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia**, 82: 208-211, 2011.

MATOS, R.S., DELMONTE, C., MARCHESINI, P., MONTEIRO, C.M.O., SAMPIERI, B., DAEMON, E., CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 10, p. 314-320, 2019.

MATOS, R.S., ROSA, P., BRITO, L.C.M., PAULA, L.G.F., ZERINGOTA, V., MONTEIRO, C.M.O., DAEMON, E., CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol: effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 11(1), 101308, 2020.

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

MONTEIRO, I.N.; MONTEIRO, O.S.; COSTA-JUNIOR, L.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; MOUCHREK FILHO, M.E. Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 54-57, 2017.

NOVATO, T.P.L.; ARAÚJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212 (3-4), p. 331-335, 2015.

PAVELA, R., BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Science**, v. 21, p. 1000-1007, 2016.

RECK, J.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, R.O.; SOUZA, U.A.; WEBSTER, A.; LEITE, R.C.; GONZALES, J.C.; KLAFKE, G.M.; MARTINS, J.R. Does *Rhipicephalus microplus* tick

infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive Veterinary Medicine**, (Epub ahead of print), 2013.

RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J.S.; 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 (1-2), p. 128-136, 2014.

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C., ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

ROBBERTSE, L.; BARON, S.; VAN DER MERWE, N.A.; MADDER, M.; STOLTSZ, W.H.; MARITZ-OLIVIER, C. Genetic diversity, acaricide resistance status and evolutionary potential of a *Rhipicephalus microplus* population from a disease-controlled cattle farming area in South Africa. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 7(4), p. 595-603, 2016.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K. Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC, Boca Raton, FL, 1992.

RODRÍGUEZ-HIDALGO, R.; PEREZ-OTANEZ, X.; GARCES-CARRERA, S.; VANWAMBEKE, S.O.; MADDER, M.; BENITEZ-ORTIZ, W. The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. **PLoS One**, v. 12, 2017.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; PÉREZ-COGOLLO, L.C.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; OJEDACHI, M.M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; MILLER, R.J.; LI, A.Y.; DE LEÓN, A.P.; GUERRERO, F.; KLAFKE, G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 113-122, 2014.

ROSADO-AGUILAR, J.A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ALZINA-LÓPEZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR-CABALLERO, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66-76, 2017.

SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (*E*)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112(4), p. 1461-1466, 2013a.

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

SHREAZ S.; SHEIKH R.A.; BHATIA R.; NEELOFAR K.; IMRAN S.; HASHMI A.A.; MANZOOR N.; BASIR S.F.; KHAN L.A. Antifungal activity of α -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. **BioMetals**, v. 24, p. 923-933, 2011.

SINGH, N. K.; MILLER, R. J.; KLAFKE, G. M.; GOOLSBY, J. A.; THOMAS, D. B.; PEREZ DE LEON, A. A. In-vitro efficacy of a botanical acaricide and its active ingredients against larvae of susceptible and acaricide-resistant strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 9, p. 201-206, 2018.

SOUSA, O. V.; DUTRA, R. C.; YAMAMOTO, C. H.; PIMENTA, D. S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, p. 113-116, 2008.

SOUZA, A. T.; BENAZZIA, T. L.; GRINGSA, M. B. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 182-187, 2008.

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

TAK, J.H.; COQUEREL, Q.R.R.; TSIKOLIA, M.; BERNIER, U.R.; LINTHICUM, K.; BLOOMQUIST, J.R.. Screening for Enhancement of Permethrin Toxicity by Plant Essential Oils Against Adult Females of the Yellow Fever Mosquito (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. XX(X), p. 1-8, 2020. doi: 10.1093/jme/tjaa014

TIAN, J., BAN, X., ZENG, H., HE, J., CHEN, Y., WANG, Y. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **PLoS One** 7, 2012.

TURGIS, M., HAN, J., CAILLET, S., LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, v. 20, p. 1073-1079, 2009.

VILA, R.; SANTANA, A. I.; PÉREZ-ROSÉS, R., VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M.V.; MENDONÇA, S.; ZACCHINO, S.; GUPTA, M.P.; CAÑIGUERAL, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2510-251, 2010.

ZHANG, Y., LIU, X., WANG, Y., JIANG, P., QUEK, S.Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016.

WANG, Y., ZHANG, Y., SHI, Y.Q., PAN, X.H., LU, Y.H., CAO, P. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 26-32, 2018.

CAPÍTULO III

PERFIL LIPÍDICO DO CORPO GORDUROSO E OVOS DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus* EXPOSTAS AO (*E*)-CINAMALDEÍDO E α -BISABOLOL

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil lipídico no corpo gorduroso e ovos de *Rhipicephalus microplus* após a exposição de fêmeas com (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol. Fêmeas ingurgitadas, coletadas de bovinos artificialmente infestados, foram imersas em uma concentração de 10,0 mg/mL de cada substância. Em diferentes tempos (72h e 120h), foi realizada dissecação dos corpos gordurosos dessas fêmeas, para subsequente extração de lipídios, a partir da utilização de solventes orgânicos. Além disso, no quinto dia de postura, foram coletadas alíquotas de 50,0 mg de massa de ovos de cada tratamento, para o mesmo procedimento de extração de lipídios dos ovos. Após extração, foram realizadas duas técnicas cromatográficas (cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa) para caracterização do perfil lipídico. Também foi realizada uma análise *in silico* para predição dos possíveis alvos moleculares do (*E*)-cinamaldeído e do α -bisabolol. Os resultados gerados na análise de cromatografia em camada delgada revelaram a presença de triacilglicerídeos (TG), ácidos graxos (AG) e colesterol (CHO) no corpo gorduroso das fêmeas ingurgitadas, e de colesterol-éster (CHOE), TG, AG e CHO nos ovos. Os resultados também evidenciaram um aumento ($p < 0,05$) de CHO no corpo gorduroso após tratamento com (*E*)-cinamaldeído entre 72h (0,12 μ g/corpo gorduroso) e 120h (0,46 μ g/corpo gorduroso), enquanto nos ovos provenientes de fêmeas tratadas com essa substância, houve redução ($p < 0,05$) na quantidade de CHO (0,21 μ g), em comparação com o grupo controle água (0,45 μ g). Na técnica de cromatografia gasosa, foram encontradas seis classes químicas, nos quatro tratamentos e foram observadas variações entre essas substâncias, principalmente hidrocarbonetos e esteroides, nos diferentes grupos, sendo o (*E*)-cinamaldeído a substância que promoveu as maiores alterações. As predições do estudo *in silico* demonstraram 763 possíveis alvos moleculares para o (*E*)-cinamaldeído (dos quais 38 alvos foram selecionados), e 219 alvos para o α -bisabolol (dos quais 20 alvos foram selecionados), relacionados ao metabolismo energético, sistema imune e sistema nervoso, demonstrando ser uma excelente ferramenta para direcionamento de estudos futuros. Este estudo fornece o primeiro relato de alterações no metabolismo de lipídios de *R. microplus* expostos a compostos vegetais.

Palavras – Chave: Carrapato do boi, óleos essenciais, fenilpropanoide, terpeno, metabolismo energético

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the lipid profile in the fatty body and *Rhipicephalus microplus* eggs after exposure of females with (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol. Engorged females, collected from artificially infested cattle, were immersed in a concentration of 10.0 mg / mL of each substance. At different times (72h and 120h), the dissection of the fatty bodies of these females was carried out, for subsequent lipid extraction, using organic solvents. In addition, on the fifth day of laying, 50.0 mg aliquots of egg mass were collected from each treatment, for the same lipid extraction procedure from the eggs. After extraction, two chromatographic techniques were performed (thin layer chromatography and gas chromatography coupled to a mass spectrometer) to characterize the lipid profile. An *in silico* analysis was also performed to predict the possible molecular targets of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol. The results generated in the analysis of thin layer chromatography revealed the presence of triacylglycerides (TG), fatty acids (AG) and cholesterol (CHO) in the fatty body of engorged females, and cholesterol-ester (CHOE), TG, AG and CHO on the eggs. The results also showed an increase ($p < 0.05$) of CHO in the fatty body after treatment with (*E*)-cinnamaldehyde between 72h (0.12 μg / fatty body) and 120h (0.46 μg / fatty body), while in eggs from females treated with this substance, there was a reduction ($p < 0.05$) in the amount of CHO (0.21 μg), compared to the water control group (0.45 μg). In the gas chromatography technique, six chemical classes were found in the four treatments and variations were observed between these substances, mainly hydrocarbons and steroids, in the different groups, with (*E*)-cinnamaldehyde being the substance that promoted the greatest changes. The predictions of the *in silico* study demonstrated 763 possible molecular targets for (*E*)-cinnamaldehyde (of which 38 targets were selected), and 219 targets for α -bisabolol (of which 20 targets were selected), related to energy metabolism, system immune system and nervous system, proving to be an excellent tool for directing future studies. This study provides the first report of changes in the metabolism of *R. microplus* lipids exposed to plant compounds.

Keywords: Bovine tick, essential oils, phenylpropanoid, terpene, energy metabolism

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888), conhecido popularmente como carrapato bovino, pode causar prejuízos, tanto na pecuária leiteira quanto na pecuária de corte, sendo considerado como um fator limitante no sucesso produtivo. Tradicionalmente, o controle desses artrópodes é realizado com a utilização de carrapaticidas sintéticos (FURLONG et al., 2007; ABBAS et al. 2014). Entretanto, a aplicação constante desses produtos tem resultado na seleção de carrapatos resistentes a todas classes carrapaticidas disponíveis no mercado (FURLONG et al., 2007; GUERRERO et al., 2014). Estudos recentes têm evidenciado um cenário ainda mais preocupante, com registro de populações multirresistentes (RECK et al., 2014; KLAFKE et al., 2017).

Diante de cenário mundial onde os conceitos de sustentabilidade e Saúde Única ganham cada vez mais força, existe uma demanda para desenvolvimento de novas tecnologias de controle de carrapatos que possibilitem menor dependência do uso de carrapaticidas químicos (SAMISH, 2000). Nesse sentido, moléculas oriundas do metabolismo secundário de plantas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos carrapaticidas (ELLSE; WALL, 2014). Dentre elas, destacam-se o fenilpropanoide (*E*)-cinamaldeído e o sesquiterpeno α -bisabolol, que são substâncias que já tiveram sua atividade carrapaticida demonstrada para *R. microplus* (SENRA et al., 2013; NOVATO et al., 2015; MARCHESINI et al., 2020). Esses dois compostos são geralmente reconhecidos como substâncias seguras ("GRAS") por órgãos fiscalizadores como *Food and Drug Administration* (FAO), *Food and Drug Administration* (FDA) e *Flavor and Extract Manufacturers Association* (FEMA). O (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol já são utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, com estimativas anuais de produção variando entre 100 e 1000 toneladas e 120 toneladas por ano, respectivamente (BICKERS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; HOOTH et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que moléculas encontradas na composição química de óleos essenciais (OEs), como o monoterpeneo timol, possuem a capacidade de reduzir a quantidade e a viabilidade de ovos produzidos por fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (MONTEIRO et al., 2010; MATOS et al., 2020). Também tem sido demonstrado o efeito citotóxico do timol e do carvacrol sobre ovários de diferentes espécies de carrapatos (MATOS et al., 2014; KONIG et al., 2019; SOUZA et al., 2019) e do timol sobre o órgão de Gené (MATOS et al., 2020). Contudo, além dos danos celulares nos ovários e no órgão de Gené, podem existir outros mecanismos relacionados com a atividade dessas substâncias que resultem na redução da quantidade e viabilidade dos ovos produzidos por fêmeas ingurgitadas, como por exemplo, impacto sobre o metabolismo energético de carrapatos. De acordo com Guizzo et al. (2012), ao longo do desenvolvimento embrionário, grande parte dos lipídios, que constituem os ovos, são consumidos até o momento da eclosão, indicando que essas substâncias são essenciais para o processo de embriogênese.

O corpo gorduroso dos carrapatos é caracterizado por estocar reservas nutricionais, sendo importante no metabolismo e armazenamento de lipídios, carboidratos e proteínas, além de promover síntese de peptídeos antimicrobianos e atuar na detoxificação de compostos nocivos (ARRESE; SOULAGES, 2010; SONENSHINE; ROE, 2013). Por ser um tecido de preenchimento, este órgão pode ser classificado, de acordo com a sua localização, em corpo gorduroso parietal e corpo gorduroso perivisceral (DENARDI et al., 2008). Além disso, é um órgão que apresenta grande importância no processo reprodutivo, promovendo a síntese de vitelogenina (Vg), principal proteína do vitelo e fonte nutricional para embriogênese, e de ecdisteróides que promovem degeneração da glândula salivar (pós-ingurgitamento) e estimulam o crescimento do ovário e biossíntese de Vg (LOMAS; KAUFMAN, 1992; SONENSHINE; ROE, 2013).

Dessa forma, o metabolismo dos lipídios é fundamental para o desenvolvimento e reprodução dos carrapatos (ARRESE; SOULAGES 2010). Existem poucas informações a respeito do efeito de carrapaticidas sobre o metabolismo dos lipídios em carrapatos, e até onde sabemos, estudos nesse sentido, com compostos vegetais ainda não foram realizados. Um melhor entendimento de como esses compostos agem no metabolismo energético desses ectoparasitos poderá vir a acrescentar novas informações sobre os mecanismos de ação dessas moléculas e propiciar avanço no uso de OEs para controle de carrapatos. O presente estudo objetivou caracterizar o perfil lipídico do corpo gorduroso e ovos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostas ao (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol além de avaliar os possíveis alvos moleculares desses compostos através de uma análise farmacodinâmica *in silico*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização do estudo

Os bioensaios e a análise do perfil lipídico dos ovos e do corpo gorduroso de fêmeas de *R. microplus*, por cromatografia em camada delgada, foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano (LCM) do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A análise por cromatografia gasosa foi realizada no Instituto Oswaldo Cruz, através da Plataforma Analítica de Produtos Naturais de Farmanguinhos/RJ.

2.2 Origem e diluição das substâncias

O (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol, com grau de pureza superior a 95%, foram adquiridos comercialmente juntos a empresa Sigma-Aldrich (San Luis, MO, US) e Citróleo Indústria e Comércio LTDA (Torrinha, São Paulo, Brasil), respectivamente. Para realização dos testes, essas substâncias foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) 3% (água destilada / DMSO – v /v), na concentração de 10 mg/mL. A concentração foi selecionada com base em testes anteriores (Marchesini et al., capítulo 1). Também foram formados dois grupos controles, um com carrapatos expostos ao solvente (DMSO 3%) e outro com água destilada.

2.3 Obtenção dos carrapatos

Para realização do estudo, foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, obtidas através de infestações artificiais em bezerros, sem contato com carrapaticidas químicos, mantidos na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IV/UFRRJ – protocolo 9714220419). As fêmeas ingurgitadas recém desprendidas, naturalmente, foram coletadas, levadas para o laboratório e lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,05%, para assepsia da cutícula.

2.4 Exposição das fêmeas ingurgitadas ao (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol

Nessa etapa, quatro grupos contendo trinta fêmeas ingurgitadas cada, com pesos homogêneos ($p > 0,05$), foram imersos por cinco minutos nas soluções de (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol na concentração de 10,0 mg/mL e nas soluções dos grupos controle (água destilada e DMSO 3%). Após a imersão, as fêmeas foram colocadas em placa de Petri (12 cm de diâmetro) e mantidas em câmara climatizada a $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ e UR% de $80 \pm 10\%$, (10 fêmeas por placa). A

dissecção dos corpos gordurosos, 10 fêmeas para cada grupo, foi realizada com 72 h e 120 h após o tratamento.

As dez fêmeas restantes, de cada grupo, foram mantidas em câmara climatizada para realização de postura e a partir desses ovos foram feitas as avaliações de perfil lipídico. Para essa análise foram utilizados ovos no quinto dia de postura, de forma a uniformizar a condição nutricional desses ovos.

Os experimentos foram repetidos quatro vezes em cada tempo, em momentos distintos, usando novas soluções de (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol.

2.5 Dissecção e extração dos lipídios do corpo gorduroso

A dissecção das fêmeas ingurgitadas de cada grupo foi realizada em tampão fosfato pH 7,4 a 4°C, com a utilização de um microscópio estereoscópico, sendo que 10 fêmeas de cada grupo foram dissecadas após 72h e 10 fêmeas após 120h. Na sequência, os corpos gordurosos parietais foram colocados em eppendorfs (cinco órgãos por tubo) e, armazenados em freezer a -20°C até o momento do processamento. O conteúdo de um eppendorf foi usado para análise por cromatografia em camada delgada e outro para análise em cromatografia gasosa. Para o processamento, os corpos gordurosos foram macerados em tampão fosfato pH 7,4 a 4°C, centrifugados a 3.000 rpm durante cinco minutos. Após essa etapa, o infranatante foi separado e submetido à extração dos lipídios.

Os lipídios foram extraídos conforme metodologia de Bligh e Dyer (1959), utilizando clorofórmio: metanol: água (1: 2: 0,8) (v/v). Os corpos gordurosos periféricos, de cada grupo, foram homogeneizados em tubo cônico de vidro, um tubo por grupo testado, sendo acrescido água destilada para um volume final de 800 μ L. Logo após, foi acrescentado 2 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio. Esses tubos foram agitados no vórtex, de cinco em cinco minutos, no período de uma hora. Na sequência, todas as amostras foram centrifugadas por dez minutos em uma velocidade de 3.000 rpm. Com o auxílio de uma Pipeta Pasteur, a fase inferior (análoga a fase orgânica, contendo os lipídios) foi transferida para um outro tubo cônico. Foram acrescidos a essas amostras, 1 mL de clorofórmio e 1 mL de água destilada, e o processo de centrifugação foi repetido por dez minutos a 3.000 rpm. Finalizada essa etapa, a fase orgânica foi transferida para outro tubo, seca por arraste de nitrogênio e armazenada a -20°C para futura análise.

2.6 Extração dos lipídios dos ovos

A massa de ovos do quinto dia de postura de 10 fêmeas ingurgitadas foi homogeneizada e em seguida, duas alíquotas de 50 mg de cada grupo foram acondicionadas em eppendorf (um para cada técnica de cromatografia). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C até o momento de extração dos lipídios.

Para extração dos lipídios, os ovos congelados foram macerados em 1 mL de água, e na sequência foi realizado o mesmo procedimento descrito no tópico 2.5, utilizando clorofórmio: metanol: água (1: 2: 0,8) (v/v). Após essa etapa, os lipídios foram analisados pelas diferentes técnicas de cromatografia.

2.7 Análise dos lipídios por cromatografia em camada delgada

Os lipídios extraídos do corpo gorduroso e dos ovos foram analisados por cromatografia em camada delgada unidimensional, em placas de sílica gel (Merck®). Para aplicação nas placas, os lipídios foram ressuspensos em 60 μ L de clorofórmio, sendo que, antes da aplicação das amostras, as placas foram previamente ativadas (aquecidas, entre placas de vidro, por

170°C, durante 10 minutos). Os lipídios neutros foram separados por uma solução de hexano: éter etílico: ácido acético (proporção 60:40:1, v/v) (KAWOOWA; LAW, 1988).

Na sequência, as placas de cromatografia foram mergulhadas em uma solução de Cherring, constituída de sulfato de cobre 10% (p/v) e ácido fosfórico 8% (v/v). As placas foram secas e, posteriormente, queimadas em forno Pasteur a 170°C por, aproximadamente, dez minutos (RUIZ; OCHOA, 1997). Logo após, as placas foram digitalizadas para a análise de densitometria através do software Image Master Total Lab versão 1.11 (GE Healthcare® - Brazil Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil). A quantificação dos lipídios foi realizada usando como base a curva padrão através de marcadores de ácido graxo (AG), colesterol (CHO), colesterol éster (CHOE) e triacilglicerol (TG) adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®, nas concentrações de 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 10 µg.

2.7.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa Biostat (versão 5.0), sendo os percentuais de média, de cada lipídio neutro encontrado, avaliados por ANOVA seguido do Teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os dados não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Student Newman Keulls ($p < 0,05$).

2.8 Análises dos lipídios por cromatografia gasosa

Foram analisadas amostras do corpo gorduroso e dos ovos dos diferentes tratamentos, em triplicata, por meio de cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), utilizando um cromatógrafo com fase gasosa Hewlett Packard 6890 e MS HP5972, munido de um banco de dados WILEY 7n.1. Foi usada uma coluna capilar do tipo HP5MS com 0,25 µm de espessura do filme, de 30 m de comprimento e 250 µm de diâmetro interno. Para arraste foi utilizado o gás hélio (1mL/min) e as separações foram realizadas com injetor a 250 °C, detector a 280 °C e a seguinte programação de temperatura: 70°C aumentando, 2°C por minuto, até a temperatura total de 290°C. Os parâmetros da operação de EM foram 70 eV, fonte iônica 250 °C, impacto de elétrons e a semelhança dos constituintes químicos foi comparada de acordo com o perfil de fragmentação por Banco de dados WILEY.

2.9 Estudo *in silico*

Foi realizado um estudo *in silico* a fim de verificar as propriedades farmacodinâmicas do (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol. Para avaliar os possíveis alvos moleculares/ atividades biológicas dos compostos nas fêmeas e ovos de *R. microplus*, foi elaborada a notação SMILES dos compostos no software livre *Molinspiration Chem Informatics*®.

As notações SMILES foram então inseridas na versão online do software *PASS online* para análise farmacodinâmica. A partir dos resultados, foram selecionados os alvos moleculares relacionados com o metabolismo de lipídios, devido ao objetivo central desse estudo. Contudo também foram selecionados outros alvos relacionados a resposta imune, sistema nervoso e síntese de quitina, com probabilidade de atividade superior a 0,3, que futuramente poderiam ser estudados na tentativa de melhor compreender os mecanismos de ação do (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol em carrapatos.

3 RESULTADOS

3.1 Análise dos lipídios por cromatografia em camada delgada

Os corpos gordurosos parietais apresentaram em sua composição triacilglicerídeos (TG), ácidos graxos (AG) e colesterol livre (CHO), sendo realizado o cálculo de $\mu\text{g}/\text{corpo}$ gorduroso. No período de 72h, não ocorreu diferença significativa ($p>0,05$) nas concentrações de TG, AG e CHO, nos diferentes tratamentos (Figura 1). O mesmo foi observado na análise após 120 horas ($p>0,05$). (Figura 1). Com relação a comparação entre as classes lipídicas, nos diferentes tempos, em um mesmo tratamento, o (*E*)-cinamaldeído resultou em aumento significativo ($p<0,05$) de CHO, com média de 0,12 e 0,46 $\mu\text{g}/\text{corpo}$ gorduroso para os tratamentos de 72 e 120h respectivamente (Figura 2).

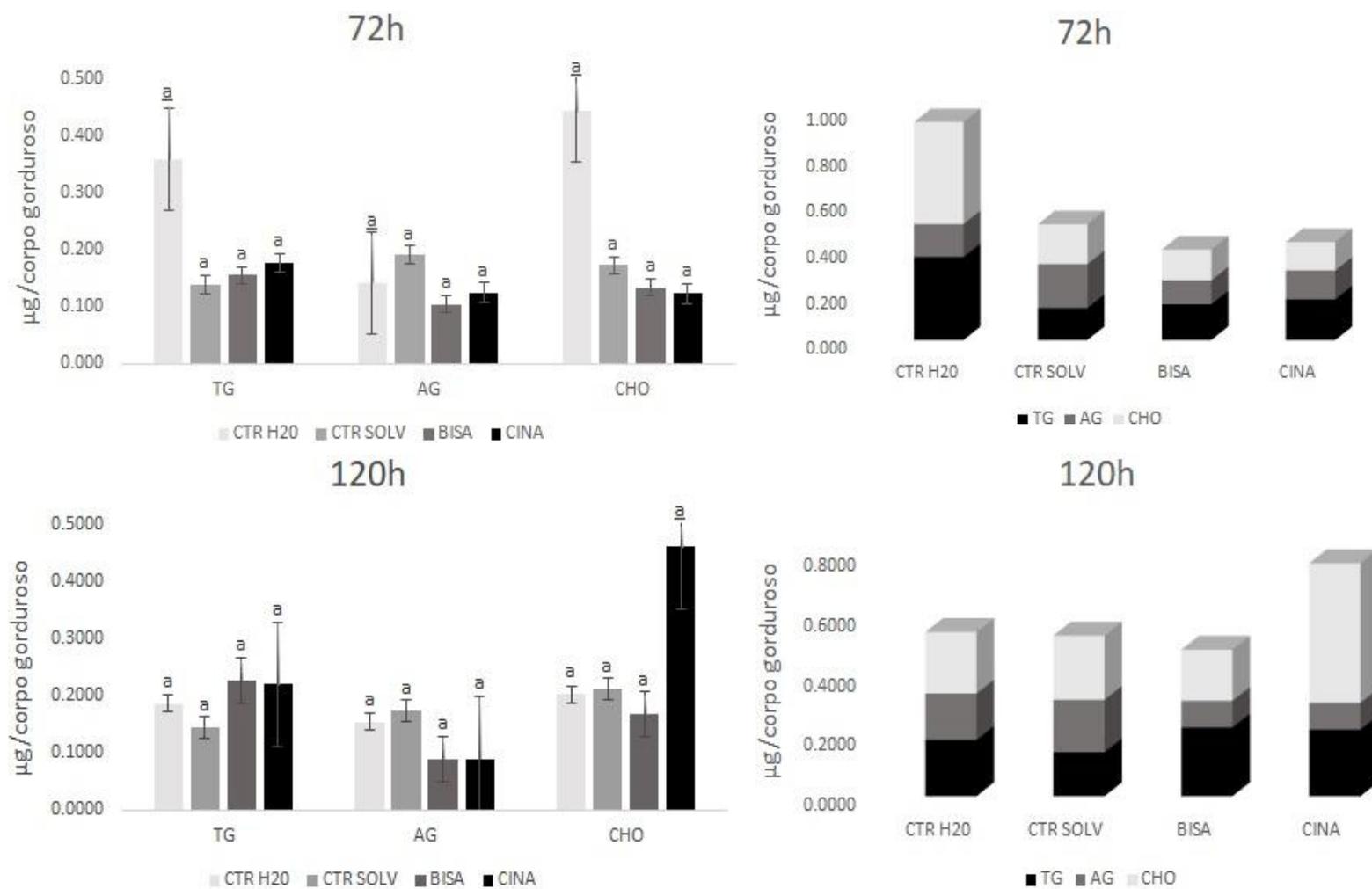


Figura 1 – Média quantitativa (µg/corpo gorduroso) dos lipídios neutros triacilglicerol (TG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO) presentes no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). Valores obtidos a partir da análise densitométrica.

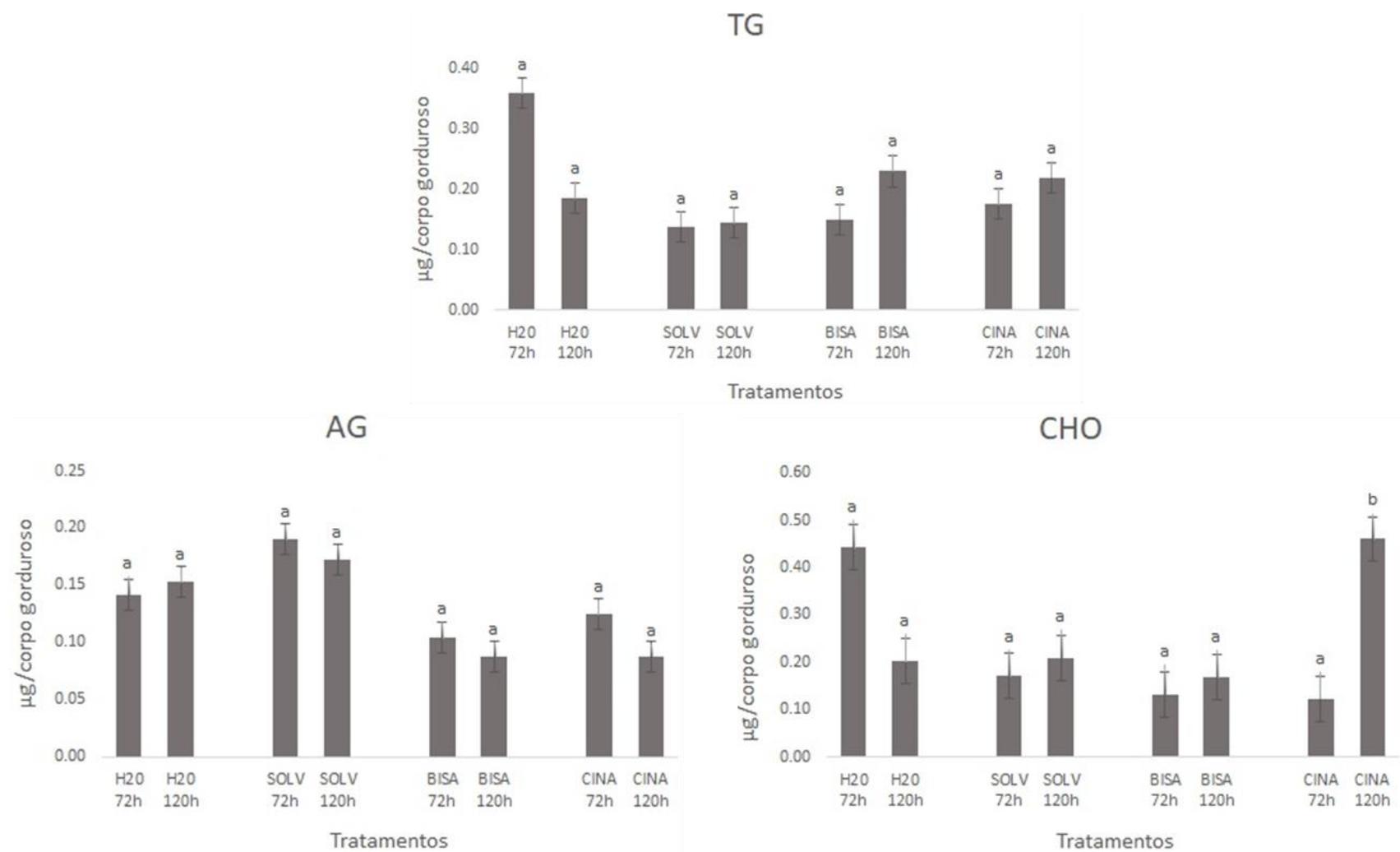


Figura 2 – Concentração ($\mu\text{g}/\text{corpo gorduroso}$) de triacilglicerol (TG), ácido graxo (AG) e colesterol livre (CHO), presentes no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste Kruskal wallis seguido do Student Newman Keulls.

Com relação aos ovos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, as classes lipídicas identificadas foram colesterol-éster (CHOE), TG, AG e CHO (Figura 3). Na comparação entre os tratamentos foi possível observar diferença ($p < 0,05$) na concentração de CHO do grupo tratado com (*E*)-cinamaldeído (0,21 μg) em relação ao grupo controle água (0,45 μg), grupo controle solvente (0,33 μg) e grupo tratado com α -bisabolol (0,36 μg) (Figura 4).

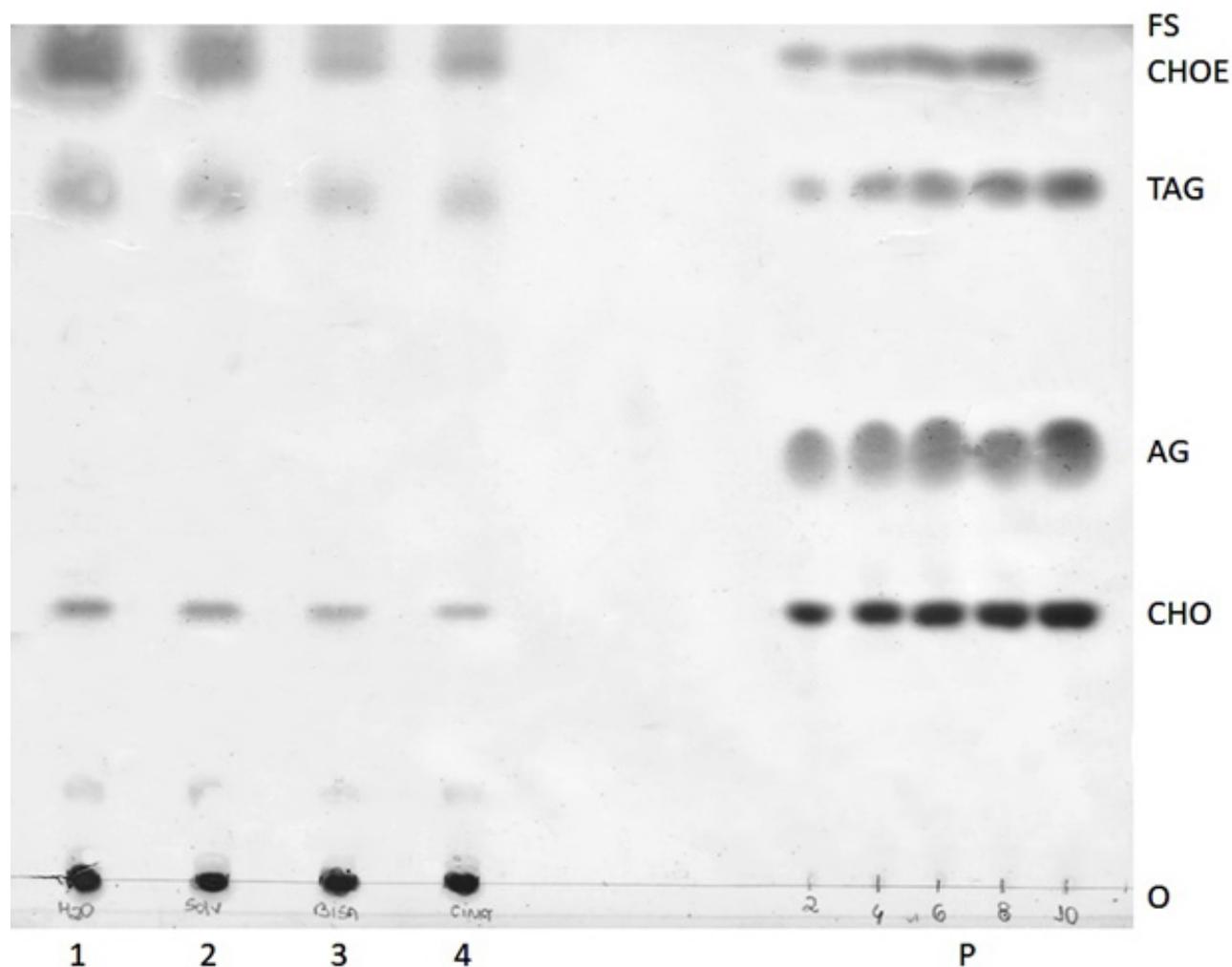


Figura 3 – Cromatograma dos lipídios neutros presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). A placa de sílica da cromatografia em camada delgada foi escaneada e submetida à análise densitométrica. FS: frente do solvente. O: origem. Cada *lane* na imagem representa um grupo experimental: 1 - controle água; 2 - controle solvente; 3 - α -bisabolol; 4 - (*E*)-cinamaldeído. P - amostras padrão: 2; 4; 6; 8; 10 mg/mL. Colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AG), colesterol livre (CHO). Cada grupo continha 50 mg de ovo no momento da extração de lipídios.

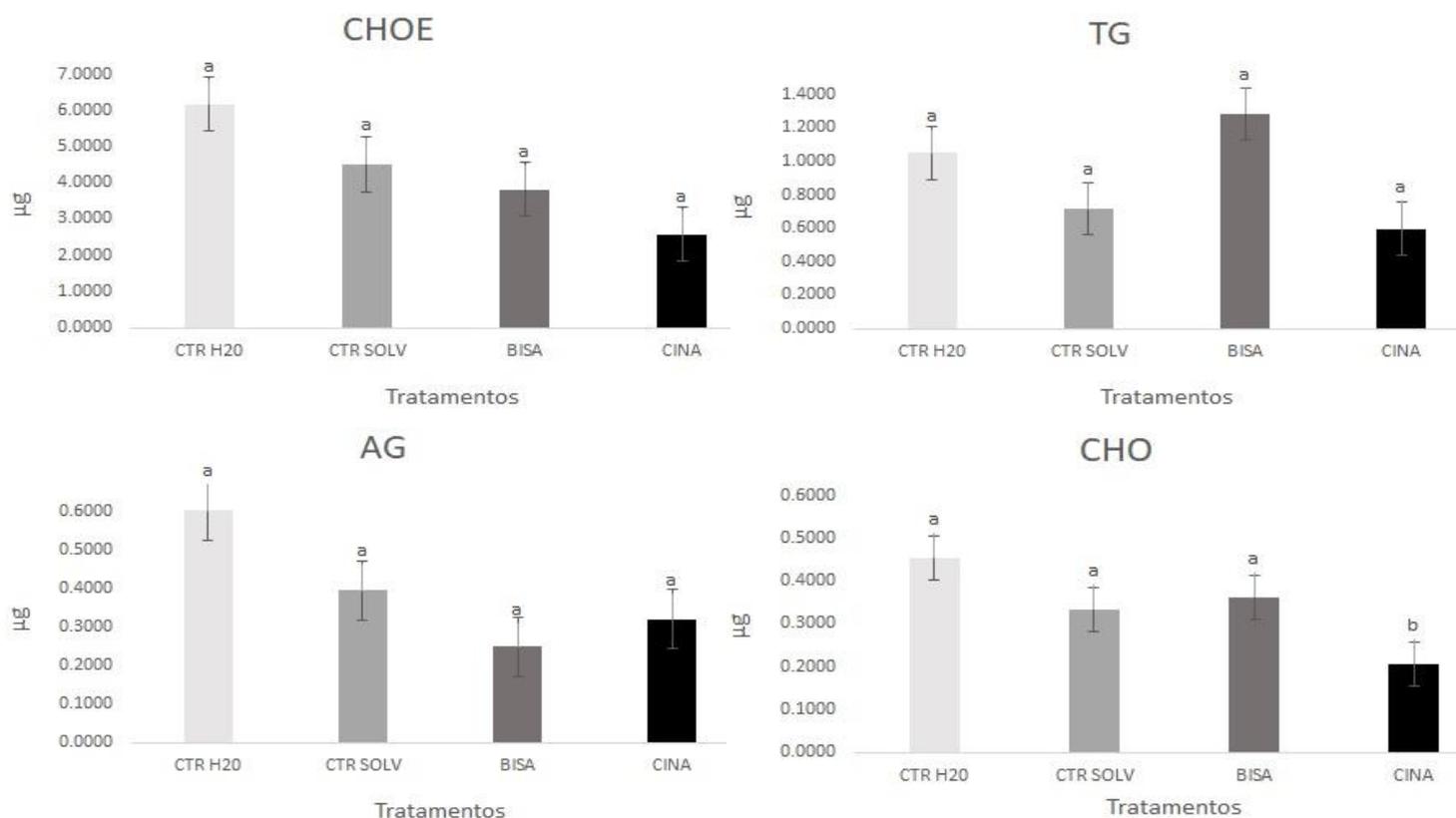


Figura 4 – Concentração (µg) de colesterol éster (CHOE), triacilglicerol (TG), ácido graxo (AG) e colesterol livre (CHO), presentes nos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, expostas ao (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol (10,0 mg/mL). Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste Kruskal wallis seguido do Student Newman Keulls.

3.2 Análise dos lipídios por cromatografia gasosa

Nas análises por CG/EM do corpo gorduroso, nos dois períodos de avaliação, foram encontrados: hidrocarbonetos, fenol, fosfolipídios, esteroides, naftoquinona e substância contendo o núcleo oxaspiro. No entanto, foram constatadas diferentes constituições de hidrocarbonetos e esteroides, indicando a presença de diferentes substâncias entre 72 e 120h após tratamento (Tabela 1).

Com relação aos diferentes tratamentos, 72h após exposição, foram observadas diferenças nas classes químicas presentes. A naftoquinona presente nos grupos controles, água e DMSO 3%, estava ausente nos grupos tratados com compostos vegetais. Os hidrocarbonetos tetradecano e pentadecano estavam presentes nos controles (água e solvente) e α -bisabolol, e ausentes no tratamento com (*E*)-cinamaldeído. Além disso, foi observado que três esteroides presentes no grupo controle água estavam ausentes nos demais tratamentos, incluindo o controle solvente (Tabela 1). Já com relação a avaliação após 120h, foi observado a presença de cinco hidrocarbonetos no grupo controle água que não estavam presentes nos demais grupos. Sobre a classe dos esteroides, três deles, incluindo o colesterol, estavam ausentes nos dois grupos controles (água e solvente) e estavam presentes nos grupos tratados com (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol (Tabela 1).

Na análise dos ovos, foram observadas alterações entre os tratamentos, com relação aos esteroides. Foi verificado a presença de três esteroides nos controles (água e DMSO 3%), que estavam ausentes nos grupos tratados com (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol. Em contrapartida, foi verificado a presença de cinco esteroides presentes nos quatro grupos experimentais, dentre os quais estava o colesterol (Tabela 2).

Tabela 1 - Substâncias ou classes de substâncias encontradas na análise de cromatografia gasosa do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL, após 72h e 120h de tratamento.

Tempo de exposição	Nº	Classe Química	Substância	T.R.	Água	Solvente	Bisa	Cina
72 h	1	Hidrocarboneto	Tetradecano	19,534	+	+	+	-
	2	Hidrocarboneto	Pentadecano	22,005	+	+	+	-
	3	Fenol	2,4-Di-tert-butilfenol	22,389	+	+	+	+
	4	Hidrocarboneto	Hexadecano	24,348	+	-	+	-
	5	Oxaspiro	7,9-Di-tert-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-diene-2,8-diona	31,279	+	+	+	+
	6	Naftoquinona dimetoxilada	Desconhecido	33,156	+	+	-	-
	7	Fosfolípido	Desconhecido	35,204	+	+	+	+
	8	Fosfolípido	Desconhecido	38,694	+	+	+	+
	9	Esteróide	Desconhecido	42,104	+	-	-	-
	10	Esteróide	Desconhecido	42,301	+	-	-	-
	11	Esteróide	Cholesta 3,5 diene	42,569	+	-	-	-
	12	Esteróide	Colesterol	50,040	+	-	+	-
120 h	1	Hidrocarboneto	Decano	16,935	+	+	-	-
	2	Hidrocarboneto	Tetradecano	19,531	+	+	-	-
	3	Hidrocarboneto	Desconhecido	22,003	+	+	-	-
	4	Fenol	2,4-Di-tert-butilfenol	22,392	+	+	+	+
	5	Hidrocarboneto	Hexadecano	24,357	+	+	-	-
	6	Hidrocarboneto	Desconhecido	26,826	+	+	-	-
	7	Oxaspiro	7,9-Di-tert-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-diene-2,8-diona	31,279	+	-	+	+
	8	Naftoquinona dimetoxilada	Desconhecido	33,151	+	+	-	-
	9	Fosfolípido	Desconhecida	35,206	+	+	+	+
	10	Esteróide	Desconhecida	41,990	+	-	-	-
	11	Esteróide	Desconhecido	42,104	+	+	-	-
	12	Esteróide	Desconhecido	42,306	+	-	+	-
	13	Esteróide	Desconhecido	42,589	+	-	-	-
	14	Esteróide	Colesterol	50,047	-	-	+	+
	15	Esteróide	Desconhecido	54,422	-	-	+	+
	16	Esteróide	Desconhecido	58,377	-	-	+	+

T.R. = tempo de retenção (minutos); Solvente = DMSO 3%; Cina = (*E*)-cinamaldeído; Bisa = α -bisabolol.

Tabela 2 - Substâncias ou classes de substâncias encontradas na análise de cromatografia gasosa do quinto dia de postura de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol na concentração de 10 mg/mL.

Nº	Classe Química	Substância	T.R.	Água	Solvente	Bisa	Cina
1	Fenol	2,4-Di-tert-butilfenol	22,392	+	+	+	+
2	Oxaspiro	7,9-Di-tert-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-diene-2,8-diona	31,279	+	+	+	+
3	Fosfolípido	Desconhecida	35,207	+	+	+	+
4	Fosfolípido	Desconhecida	38,699	+	+	+	+
5	Ester	Desconhecido	40,589	+	+	+	+
6	Esteróide	Desconhecido	42,108	+	+	-	-
7	Esteróide	Desconhecido	42,307	+	+	+	+
8	Esteróide	Desconhecido	42,416	+	+	+	+
9	Esteróide	Cholesta 3,5 diene	42,569	+	+	-	-
10	Esteróide	Desconhecido	48,471	+	+	-	-
11	Esteróide	Colesterol	50,041	+	+	+	+
12	Esteróide	Desconhecido	54,422	+	+	+	+
13	Esteróide	Desconhecido	58,377	+	+	+	+

T.R. = tempo de retenção (minutos); Solvente = DMSO 3%; Cina = (*E*)-cinamaldeído; Bisa = α -bisabolol.

3.3 Estudo *in silico*

Após a realização das análises com a plataforma *PASS online*, foram encontrados 763 alvos moleculares/atividade para o (*E*)-cinamaldeído e de acordo com os critérios mencionados na metodologia, foram selecionados 38 alvos, descritos na Tabela 3. Desses, 20 alvos estão relacionados ao metabolismo energético, 11 com resposta imune, sete com sistema nervoso e um relacionado com a síntese de quitina (Tabela 3). Para o α -bisabolol, foram 219 possíveis alvos/mecanismo de ação, sendo selecionados 20, dos quais 12 são referentes ao metabolismo dos lipídios, quatro à resposta imune, três com sistema nervoso e um com o processo de oviposição (Tabela 3).

Esses resultados demonstram que ambos compostos apresentaram potencial para funcionarem como reguladores do metabolismo lipídico e serem antagonistas do colesterol. O (*E*)-cinamaldeído apresentou ainda potencial para funcionar como inibidor da síntese de esteróides e da enzima 27-hidroxicolesterol 7-alfa-monooxigenase, enquanto o α -bisabolol apresentou potencial para funcionar como inibidor da síntese de colesterol e da enzima colesterol oxidase.

Tabela 3 - Alvos farmacodinâmicos do (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol, selecionados a partir de análise na plataforma *PASS* online.

Atividade	<i>(E)</i> -cinamaldeído		α -bisabolol	
	Probabilidade de atividade	Atividade/Alvo molecular	Probabilidade de atividade	Atividade/Alvo molecular
Indução de alterações lipídicas	0,764	Inibidor da acil-CoA sintase do ácido graxo	0,711	Inibidor da fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferase
	0,738	Inibidor da glicosilfosfatidilinositol fosfolipase D	0,689	Inibidor da ecdisona 20-hidroxilase
	0,668	Inibidor da permeabilidade da membrana	0,588	Inibidor da acil-CoA sintase do ácido graxo
	0,650	Inibidor da ATPase translocadora de fosfolipídios	0,531	Antagonista de colesterol
	0,593	Inibidor da 27-hidroxicoesterol 7-alfa-monooxigenase	0,478	Inibidor da hidrolase de alcenilglicerofosfocolina
	0,533	Inibidor da ecdisona 20-hidroxilase	0,471	Regulador do metabolismo lipídico
	0,527	Inibidor da hidrolase de alcenilglicerofosfoetanolamina	0,431	Inibidor da síntese de colesterol
	0,525	Inibidor da prostaglandina-A1-Delta-isomerase	0,401	Inibidor do colesterol oxidase
	0,434	Regulador do metabolismo lipídico	0,366	Inibidor da hidrolase de alcenilglicerofosfoetanolamina
	0,432	Inibidor da síntese de esteroides	0,338	Inibidor do esteróide N-acetilglucosaminiltransferase
	0,420	Inibidor da lipoproteína lipase	0,308	Inibidor da prostaglandina-A1-Delta-isomerase
	0,414	Inibidor da citidililtransferase etanolamina-fosfato	0,306	Inibidor da lipoproteína lipase
	0,401	Inibidor da fosfatidilglicerofosfatase		
	0,391	Antagonista do colesterol		
	0,377	Inibidor da fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferase		
	0,365	Inibidor da Inositol-polifosfato 5-fosfatase		
	0,330	Inibidor da fosfatidilinositol diacilglicerol-liase		
	0,327	Inibidor da fosfolipase C		
	0,310	Antagonista de colesterol		
	0,304	Inibidor da alquilglicerofosfoetanolamina fosfodiesterase		
Indução de alterações em resposta imune	0,819	Inibidor de expressão de JAK2	0,311	Antioxidante
	0,587	Inibidor da serina endopeptidase específica de IgA	0,308	Inibidor de expressão de JAK2

	0,529	Inibidor da fosfatidilserina descarboxilase	0,459	Estimulante da caspase 3
	0,673	Inibidor da catepsina T	0,350	Substrato GST A
	0,832	Substrato GST P		
	0,822	Substrato GST P1-1		
	0,814	Estimulante da caspase 3		
	0,812	Substrato GST M		
	0,604	Estimulante do citocromo P450		
	0,457	Inibidor da catalase		
	0,389	Estimulante da caspase 8		
Sistema nervoso	0,612	Inibidor de GABA aminotransferase	0,326	Inibidor da acetilsterase
	0,485	Agonista do receptor GABA C	0,309	Ativador do canal de cálcio (sensível à tensão)
	0,455	Antagonista Octopamina	0,306	Inibidor de GABA aminotransferase
	0,422	Antagonista de neurotransmissor		
	0,407	Inibidor da captação de neurotransmissores		
	0,385	Inibidor da glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase		
	0,319	Bloqueador de canal de sódio classe Ib		
Síntese de quitina	0,443	Inibidor da quitinase		
Oviposição			0,367	Inibidor da ovulação - Inseticida

4. DISCUSSÃO

Os lipídios desempenham diversas funções nos artrópodes, como fonte e armazenamento de energia, composição de membranas celulares, mensageiros químicos (hormônios), produção, composição e viabilidade dos ovos (CANAVOSO et al., 2001; RYAN; VAN DER HORST, 2000). Dessa forma, alterações no metabolismo dos lipídios nos carrapatos, devido à exposição com compostos de plantas, sinalizam um possível mecanismo de ação dessas substâncias, reforçando o seu potencial carrapaticida. O presente estudo descreve pela primeira vez, a ação de substâncias de origem vegetal, encontrada em OEs, sobre a composição lipídica do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, a dinâmica de mobilização de lipídios para os ovos dessas fêmeas, além de apresentar resultados de um estudo *in silico* com possíveis alvos moleculares dessas substâncias, que podem estar relacionados com a atividade sobre carrapatos.

O CHO foi a classe lipídica mais abundante no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, seguido do TG e AG. Angelo et al. (2013) também observaram que o CHO foi o principal lipídio encontrado no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, diferindo dos dados da literatura sobre composição lipídica do corpo gorduroso de insetos (CANAVOSO et al., 2001; PONTES et al., 2008), que apresentam maior composição de TG. Esses resultados indicam que em carrapatos, possivelmente a mobilização de lipídios se dá de forma diferente. Segundo Sonenshine e Roe (2013), muito do que sabemos sobre a fisiologia de artrópodes é baseado na classe Insecta, uma vez que é o grupo mais estudado, e muitas extrapolações são feitas para outros indivíduos desse Filo, devido as aparentes semelhanças nos mecanismos regulatórios, forma de desenvolvimento (metamorfose do estado juvenil para adulto) e postura de ovos. No entanto, com o avanço nos estudos sobre ácaros, é possível observar que esta hipótese se sustenta até certo ponto, sendo encontradas algumas particularidades importantes entre insetos e carrapatos. Os achados do presente estudo, a respeito das classes lipídicas predominantes no corpo gorduroso de carrapatos reforçam esse aspecto.

No presente estudo, a análise do perfil lipídico por meio da TLC, dentro de um mesmo intervalo de tempo, demonstrou que os tratamentos com (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol não ocasionaram alterações na concentração de TG, AG e CHO no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas. Gaudêncio (2016) ao investigar a atividade do acaricida fluazuron no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, também não constatou diferenças significativas entre valores dos percentuais das classes lipídicas, entre o 4º e 8º dia pós-tratamento. Em alguns trabalhos que avaliaram alterações no perfil lipídico do corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* frente a infecção por diferente isolados fúngicos, foi possível observar que os níveis de TG aumentaram, no decorrer do tempo (Angelo et al., 2013; Sá et al, 2018), sendo observado, também um aumento de colesterol esterificado, 48h após a infecção por *Metarhizium anisopliae* s.l. (Angelo et al., 2013). Esses autores atribuíram essa alteração devido ao processo de infecção, gerando uma maior demanda energética, a fim de combater a infecção (Angelo et al., 2013; Sá et al, 2018). Essa diferença nos resultados pode indicar que o mecanismo de ação e/ou a resposta do carrapato quando desafiado por uma substância química é diferente, quando comparado com a resposta a infecção por um agente biológico.

Comparando a concentração de CHO ($\mu\text{g}/\text{corpo gorduroso}$) no corpo gorduroso nos dois períodos de avaliação (72 – 120h), foi possível observar que o (*E*)-cinamaldeído propiciou um aumento na quantidade dessa classe lipídica após 120h. De forma concomitante, foi verificado redução na quantidade de CHO nos ovos das fêmeas tratadas com (*E*)-cinamaldeído. Segundo Cherry (1976), um terço do colesterol presente nas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* é transportado para os ovos. Assim, a maior concentração de CHO no corpo gorduroso do grupo

tratado com esse fenilpropanoide sugere que o (*E*)-cinamaldeído pode ter reduzido o aporte de CHO para os ovos, durante o processo de ovipostura, fato que pode resultar na menor viabilidade dos ovos. Esses resultados vão de encontro aos dados da biologia reprodutiva de *R. microplus*, em que foi observado redução na quantidade e viabilidade dos ovos de fêmeas ingurgitadas expostas ao (*E*)-cinamaldeído, na concentração de 10,0 mg/mL (Marchesini et al., capítulo 1).

No presente, a análise de cromatografia gasosa do corpo gorduroso evidenciou diferenças entre as classes químicas encontradas nos grupos controles, no qual haviam substâncias (hidrocarboneto e esteroides) presentes no controle água que não foram encontradas no controle solvente. Em estudos para determinar a atividade de substâncias de origem vegetal, o ideal é escolher solventes que tenham pouco ou nenhum efeito sobre o carrapato alvo, com intuito de determinar, de forma mais precisa, a atividade da molécula estudada (RESENDE et al., 2012). Estudos demonstraram que o DMSO, em concentrações inferiores a 5%, não causa morte e alterações consideráveis na biologia reprodutiva de *R. microplus* (GONÇALVES et al., 2007; SHARMA et al., 2011). Talvez alterações de certas substâncias utilizadas com solventes, só sejam detectadas em análises mais específicas, permitindo observar alterações que não aparecem em avaliações de mortalidade e biologia reprodutiva. Estudos tem demonstrado que o etanol em concentrações inferiores a 50% não ocasiona mortalidade e alterações na biologia reprodutiva de *R. microplus* e *Rhipicephalus annulatus* Neumann, 1904 (GONÇALVES et al., 2007; SHARMA et al., 2011; RAVINDRAM et al., 2011; MATOS et al., 2014a); contudo, em análises histológicas, foi demonstrado que etanol, na concentração de 30%, ocasiona algumas alterações morfofisiológicas, incluindo vacuolização citoplasmática nos ovócitos (I e II) de *R. sanguineus* s.l. (MATOS et al., 2014b).

Embora a análise por cromatografia gasosa tenha demonstrado algumas diferenças no perfil das classes químicas, ocasionadas pelo solvente, cabe destacar que as alterações foram mais acentuadas nos grupos expostos ao α -bisabolol e ainda mais, no tratamento com o (*E*)-cinamaldeído. A capacidade de alterar os constituintes do corpo gorduroso e impactar o metabolismo energético de *R. microplus* pode ser um dos mecanismos de ação dessas substâncias sobre carrapatos. Além disso, é possível perceber que o (*E*)-cinamaldeído foi capaz de suprimir um maior número de classes químicas do que o α -bisabolol, fato que pode estar relacionado com sua maior atividade sobre carrapatos. Em estudo com larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, Marchesini et al., (dados não publicados – capítulo 1) demonstraram que o (*E*)-cinamaldeído apresentou maior atividade que o α -bisabolol, tanto para larvas quanto para fêmeas ingurgitadas. Em outro estudo, que avaliou a atividade dessas substâncias sobre 51 populações de *R. microplus*, também foram observados menores valores de CL₅₀ para o (*E*)-cinamaldeído (Marchesini et al., 2020).

Ainda com relação a cromatografia gasosa, no período de 120h pós-tratamento, foi observado que o CHO estava presente no corpo gorduroso dos grupos tratados com (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol e ausente nos grupos controles (água e solvente), ao passo que estava presente na cromatografia gasosa dos ovos, nos quatro tratamentos. Embora o colesterol esteja presente nos ovos, pode ser que ele esteja em uma quantidade inferior, contudo, para tal confirmação, seria necessário realizar a quantificação dessa molécula. Na análise *in silico* foi verificado que essas duas substâncias apresentam potencial de inibição da lipoproteína lipase. A lipase promove a quebra dos lipídios e a lipoproteína é responsável por carrear os lipídios para os demais tecidos (NELSON; COX 2014). Se há uma inibição da lipoproteína lipase, não há a quebra dos lipídios, então há um acúmulo de lipídios no órgão, corroborando com os resultados da cromatografia gasosa, indicando um possível efeito do (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, impactando a capacidade das fêmeas metabolizar essa classe de lipídios e transportá-la, resultando em prejuízos sobre o processo da embriogênese. Os achados na TLC, com a maior

concentração de CHO no corpo gorduroso, no período de 120h, e menor concentração de CHO nos ovos, no tratamento com (*E*)-cinamaldeído, reforçam essa hipótese.

Na cromatografia gasosa do corpo gorduroso, não foi possível detectar a presença de ecdisteróides em nenhum dos grupos tratados, mas foram observados fragmentos de massa referentes a substâncias esteroidais, dentre eles o m/z 281 e m/z 207, que são característicos de alguns derivados de hormônios esteroidais (YILMAZ, 2015; LEE et al., 2010). O sinal base ou fragmentos com grande intensidade relativa em m/z 207 pode ser uma indicação de esteroides que sofreram fragmentação de massas no núcleo dos anéis A, B e C e que apresentam duas duplas ligações e uma hidroxila ligada ao carbono 3 no anel A de sua estrutura (THURMAN et al., 2015). O sinal em m/z 281, por sua vez, pode ser devido ao fragmento de massas referente aos anéis A, B, C, D e C₂₀ e C₂₁ após clivagem (GRIFFITHS et al., 2012). Da mesma forma, Renthal et al. (2019) não conseguiram identificar a ecdisterona (20-hidroxiecdisona) ao analisar machos e fêmeas alimentados de *Amblyomma americanum* Linnaeus, 1758, mas detectaram espectros compatíveis com um isômero de desidrodeoxicdisona (m/z 464.338), sendo o nível desse esteroide cinco vezes maior em fêmeas ingurgitadas, sugerindo que esta molécula seja um derivado da ecdisterona.

Na análise *in silico*, dos 38 alvos selecionados para o (*E*)-cinamaldeído, 20 apresentam o potencial de atividade na indução de alterações lipídicas; para o α -bisabolol, dos 20 alvos selecionados, 12 estão relacionados com lipídios. Em relação ao (*E*)-cinamaldeído, foi encontrado potencial de inibição da enzima que hidroxila o colesterol (27-hidroxicolesterol 7-alfa-monooxigenase), que promove uma reação de oxirredução, enquanto para o α -bisabolol, foi observado potencial de inibir a síntese de colesterol e inibir a enzima colesterol oxidase, que transforma o colesterol em colesterol oxidado (oxisterol). Um estudo recente detectou enzimas relacionadas com o metabolismo de esteroides em *R. microplus*, incluindo enzimas que catalisam a desidrogenação de hidroxiesteroides e enzimas oxidorredutases, relatando a presença de proteínas de ligação com o oxisterol no órgão de Gené (XAVIER et al., 2019). Estas proteínas estão relacionadas com o metabolismo lipídico, transporte de esterol e sinalização celular (OLKKONEN; LI, 2013; RAYCHAUDHURI; PRINZ, 2010). Além disso, de acordo com Veirlink e Ghisla (2009), a manipulação da enzima colesterol oxidase é uma ferramenta biotecnológica com potencial uso inseticida. Dessa forma, alterações no metabolismo do colesterol, provenientes ao uso do (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol, poderiam caracterizar novos sítios de ação de substâncias encontradas em OEs com potencial acaricida.

Ainda com relação ao metabolismo lipídico, foi observado que essas duas substâncias possuem potencial de inibição da permeabilidade da membrana. Ao perder essa permeabilidade, a célula perde o controle de osmorregulação, ocasionando uma série de efeitos deletérios, incluindo a lise celular (variação oriunda da perda do meio isotônico). Sabe-se que a ação sobre a permeabilidade de membranas celulares, de eucariotas e procariotas, é um dos principais mecanismos de ação de OEs e substâncias encontradas nesses óleos (CAMPOS et al., 2019). Em carrapatos, estudos recentes têm demonstrado que os monoterpenos timol e carvacrol, encontrados em diferentes OEs, possuem a capacidade de ocasionar danos nas membranas de células do órgão de Gené, ovários, singânglio e glândula salivar, podendo ocasionar inclusive o rompimento da membrana (MATOS 2018; KONIG et al, 2019; SOUZA et al., 2019).

O (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol apresentaram o potencial de inibir ecdisona 20-hidroxilase, ecdisteróide que estimula a síntese, secreção e absorção de Vg (THOMPSON et al. 2005). Além disso, o (*E*)-cinamaldeído apresentou capacidade de inibição da quitina (o que poderia vir a interferir na muda) e o α -bisabolol tem o potencial de interferir no processo de oviposição. Um estudo que pode reforçar essas predições avaliou o triterpeno azadiractina, isolado da planta *Azadirachta indica* A. Juss, e observou uma redução no desenvolvimento de oócitos de fêmeas de *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859), afetando diretamente o índice de

produção de ovos, além de reduzir os níveis de ecdisteróides da hemolinfa, interferindo no sistema neuroendócrino e inibindo o processo de muda (GARCIA; AZAMBUJA, 2004).

A análise *in silico* apontou 11 possíveis alvos relacionados a resposta imune que poderiam ser alterados pela ação do (*E*)-cinamaldeído e quatro para o α -bisabolol. Dentre esses alvos, para as duas substâncias, está a atuação como substrato da enzima glutationa-S-transferase (GST) (relacionada ao estresse oxidativo) e estimulante da enzima caspase 3 (relacionada com o processo de morte celular). Para o (*E*)-cinamaldeído, também foi observado potencial para inibir a enzima catalase (relacionado a regulação do estresse oxidativo). Matos (2018), analisou a atividade do timol sobre o sistema enzimático de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* (s.l.), e demonstrou que o timol ocasionou um aumento na concentração de GST e da caspase 3, presente nos ovários e órgão de Gené, contudo não foram observadas alterações nos níveis de catalase. Em adicional, esse estudo demonstrou o potencial do (*E*)-cinamaldeído na inibição de peptídeos, o que poderia interferir na resposta imune, uma vez que o carrapato está sendo desafiado por esse composto, podendo vir a ativar alguma via de forma a tentar debelar a concentração desse princípio ativo no organismo. Para *R. microplus*, já foram descritos alguns peptídeos como a defensina e ixodidina, identificadas nos hemócitos (FOGAÇA et al., 2004; 2006) e a microplusina, encontrada na hemolinfa, ovos e órgão de Gené (FOGAÇA et al., 2004; ESTEVES et al., 2009; XAVIER et al., 2019), que estão relacionados com a resposta imune desse parasito.

A ação no sistema nervoso é uma das possíveis atividades previstas no estudo *in silico*, sendo registrados sete possíveis alvos moleculares para o (*E*)-cinamaldeído (inibidor de GABA aminotransferase, agonista do receptor GABA C, antagonista de octopamina, antagonista de neurotransmissor, inibidor da captação de neurotransmissores, inibidor da glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase e bloqueador de canal de sódio classe Ib) e três para o α -bisabolol (inibidor da acetilesterase, ativador do canal de cálcio, inibidor de GABA aminotransferase). A maior parte das classes de carrapaticidas sintéticos são conhecidas por apresentarem ação no sistema nervoso de carrapatos, como organofosforados e carbamatos, que atuam na inibição da acetilcolinesterase (AChE) e o amitraz que age na insensibilização do receptor de octopamina (ANDERSON; COATS, 2012; TEMEYER et al., 2013; JONSSON et al., 2018). Recentemente, Cardoso et al. (2020) avaliaram pela primeira vez o potencial de diferentes terpenos na inibição da AChE e observaram alta inibição frente a cinco substâncias (carvacrol, timol, eucaliptol, citral e R-(-)-carvona). Estudos similares ainda são escassos para carrapatos, contudo, para insetos, onde existe um número maior de investigações, existem dados demonstrando atividade sobre os receptores de octopamina (timol, eugenol, álcool cinâmico), tiramina (timol, carvacrol, α -terpineol), no bloqueio dos canais de cloro controlados pelo GABA (timol) e inibição do citocromos P450 (*Piper* ssp.) (BELZILE 2000; ENAN, 2001; ENAN, 2005a,b; LOPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; PAVELA; BENELLI, 2016).

Concluimos que o (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol possui efeito deletério sobre o metabolismo energético de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, alterando o perfil de lipídios encontrados no corpo gorduroso e ovos, indicando que esse é um dos mecanismos de ação dessas moléculas em carrapatos. Além disso, no estudo *in silico*, apresentamos uma série de outros alvos onde essas moléculas podem estar atuando; informações que podem direcionar estudos futuros para investigar outros mecanismos de ação do (*E*)-cinamaldeído e o α -bisabolol em carrapatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R.Z.; ZAMAN, M.A.; COLWELL, D.D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6-20, 2014.
- ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; QUINELATO, S.; SÁ, F.A.; PONTES, E.G. Neutral lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal infections, **Parasitology Research**, v.112, p.501-509, 2013.
- ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L.; Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.
- BELZILE, A.S.; MAJERUS, S.L.; PODESZFINSKI, C.; GUILLET, G.; DURST, T.; ARNASON, J.T. Dillapiol derivatives as synergists: structure-activity relationship analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 66, p. 33-40, 2000.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, v. 115, p. 2545-2560, 2016.
- BICKERS, D.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 799-836, 2005.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- CAMPOS, E.V.; PROENÇA, P.L.; OLIVEIRA, J.L.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P.; FRACETO, L.F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: future perspectives. **Ecological Indicators**, v. X, p. XX, 2019.
- CANAVOSO, L.E.; KARNAS, J. K.; JOUNI, Z.E.; PENNINGTON, J.E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 23-46, 2001.
- DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; MATHIAS, M. I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 39, n. 7, p. 875-83, 2008.
- ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, p. 233-243, 2014.
- ENAN, E.E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry, Physiology, Toxicology and Pharmacology**, v. 130, p. 325-337, 2001.
- ENAN, E.E. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 309-321, 2005a.

ENAN, E.E. Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 59, p. 161-171, 2005b.

ESTEVES, E.; FOGAÇA, A.C.; MALDONADO, R.; SILVA, F.D.; MANSO, P.P.; PELAJOMACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Development and Comparative Immunology**, v.33, n.8, p.913-919, 2009.

FOGAÇA, A.C.; ALMEIDA, I.C.; EBERLIN, M.N.; TANAKA, A.S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v.27, p.667-674, 2006.

FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M.; KAKU, L.M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental and Comparative Immunology**, v.28, p.191-200, 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Vetelinária**, 27: 1-7, 2007.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. **Toxicon**, v. 44, p. 431-440, 2004.

GAUDÊNCIO, F.N. 2016. Efeito do fluazuron sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Tese de Doutorado. 88p. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil

GONCALVES, K.; TOIGO, E.; ASCOLI, B.; VAN POSER, G.L.; RIBEIRO, V.L.S. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v. 71, p. 443-50, 2007.

GRIFFITHS, W.J.; OGUNDARE, M.; MELJON, A.; WANG, Y. MASS SPECTROMETRY FOR STEROID ANALYSIS Chapter 14. Mass Spectrometry Handbook, First Edition. John Wiley e Sons, 2012, p.297-337.

GUERRERO, F.D.; DE LEÓN, A.A.P.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; JONSSON, N.N.; MILLER, R.J.; ANDREOTTI, R. Acaricide research and development, resistance, and resistance monitoring. In: Sonenshine DE, Roe RM, editors. Biology of Ticks. Volume 2. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2013.

GUIZZO, M.G.; ABREU, L.; MASUDA, A.; LOGULLO, C.; VAZ JUNIOR, I.S. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 40, n.1, p.1-12, 2012.

HOOTH, M.J.; SILLS, R.C.; BURKA, L.T.; HASEMAN, J.K.; WITT, K.L.; OREZECH, D.P.; GRAVES, S.; BUCHER, J.R. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated

transcinnamaldehyde in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1757-1768, 2004

JONSSON, N. N.; KLAFKE, G.; CORLEY, S. W.; TIDWELL, J.; BERRY, C. M.; KOH-TAN, H. H. C. Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 23, n. 2, p. 796-810, 2018.

KAWOOYA, J.K.; LAW, J.H. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8748-8753, 1988.

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B.D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L.H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M.F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state Southern Brazil. **Ticks Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p.73-80, 2017.

KONIG, I.F.M.; GONÇALVES, R.R.P.; OLIVEIRA, M.V.S.; SILVA, C.M.; THOMASI, S.S.; PECONICK, A.P.; REMEDIO, R.N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 766-774, 2019.

LEE, S.H.; CHOI, M.H; LEE, W.Y.; CHUNG, B.C. Isotope-Dilution Mass Spectrometry for Quantification of Urinary Active Androgens Separated by Gas Chromatography. **Mass Spectrometry Letters**, v.1, n.1, 2010.

LOMAS, L.O.; KAUFMAN, W.R. An indirect mechanism by which a protein from the male gonad ha stens salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 21, n.3, p.169-178, 1992.

LÓPEZ, M.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 284-288, 2010.

MARCHESINI, P.; NOVATO, T.P.; CARDOSO, S.J.; PRATA, M.C.A.; NASCIMENTO, R.M.; KLAFKE, G.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; MATURANO, R.; LOPES, W.D.Z.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; MONTEIRO, C.M.O. Acaricidal activity of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol on populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) with different resistance profiles. **Veterinary Parasitology**, v. XX, p. XX, 2020.

MATOS, R.S.; MELO, D.R.; MONTEIRO, C.M.O.; ZERINGÓTA, V.; SENRA, T.O. S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; PRATA, M.C.A.; DAEMON, E. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, v. 113, p. 669-673, 2014a.

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

MATOS, R.S.; DELMONTE, C.; MARCHESINI, P.; MONTEIRO, C.M.O.; SAMPIERI, B.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 10, p. 314-320, 2019.

MATOS, R.S.; ROSA, P.; BRITO, L.C.M.; PAULA, L.G.F.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Thymol: effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 11, n. 1, 101308, 2020.

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

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª ed. Porto Alegre: W.H. Freeman, 2014. 1220 p.

NOVATO, T.; ARAUJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (*E*)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 331-335, 2015.

OLIVEIRA, A.D.; RIBEIRO, I.S.A.; SCOLFORO, J.R.S.; MELLO, J.M.; ACERBI JR.; F.W.A.; CAMOLESI, J.F. Market chain analysis of Candeia Timer (*Eremanthus erythropappus*). Lavras. **Cerne**, v. 15, p. 257-264, 2009.

OLKKONEN, V.M.; LI, S. Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 529-538, 2013.

PONTES, E.G.; LEITE, P.; MAJEROWICZ, D.; ATELLA, G.C.; GONDIM, K.C. Dynamics of lipid accumulation by the fat body of *Rhodnius prolixus*: The involvement of lipophorin binding sites. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 790-797, 2008.

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

RAYCHAUDHURI, S.; PRINZ, W.A. The diverse functions of oxysterol-binding proteins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, p. 157-177, 2010.

RENTHAL, R., LOHMEYER, K., BORGES, L. M. F., PÉREZ DE LEÓN, A. A. Surface lipidome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, provides leads on semiochemicals and lipid metabolism. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 138-145, 2019.

RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J.S.; 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, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

RESENDE, J.D.R.A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; PRATA, M.C.A.; RODRIGUES, A.F.S.F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, v.131, n.2, p. 139-142, 2012.

RUIZ, J.I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p.1482-1489, 1997.

RYAN, R.O.; VAN DER HORST, D.J. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. **Annual Review of Entomology**, v. 45, 233-260, 2000.

SÁ, F.A.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; ANGELO, I.C.; FIOROTTI, J.P.; ATELLA, G.C.; BITTENCOURT, V.R.E.; SILVA-NETO, M.A.C. *Metarhizium anisopliae* sl modulation of lipid metabolism during tick infection is independent of AMPK and ERK pathways. **Parasitology Research**, v. 117, p. 793-799, 2018.

SAMISH, M. Biocontrol of ticks. **Annals of New York Academy of Sciences**. v. 916, p. 172-178, 2000.

SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, 1461-1466, 2013.

SHARMA, A.K.; KUMAR, S.; TIWARI, S.S.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, R.; RAY, D.D.; CHAUDHURI, P.; RAWAT, A.K.S.; GHOSH, S. Comparative acaricidal properties of different solvents and surfactants on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 82, n. 2, p. 154-158, 2012.

SONENSHINE, D. E. e ROE, R. M. *Biology of Ticks*, New York, 2013.

SOUZA, J.R.; OLIVEIRA, P.R.; ANHOLETO, L.A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R.N.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Effects of carvacrol on oocyte development in semiengorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66-72, 2019.

THURMAN, E.M; WRITER, J.H; FERRER, I. Injection Port Derivatization for GC/MS-MS: Analysis of hormones in water Chapter 5. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, v. 61, p.115-141, 2013.

THOMPSON, D.M.; KHALIL, S.M.; JEFFERS, L.A.; ANANTHAPADMANABAN, L.A.U.; SONENSHINE, D.E.; MITCHELL, R.D.; OSGOOD, C.J.; APPERSON, C.; ROE, R.M. In vivo role of 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the regulation of the vitellogenin message and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 11050-11116, 2005.

VRIELINK, A.; GHISLA, S. Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 23, p. 6826-6843, 2009.

XAVIER, M.A.; TIRLONI, L.; PINTO, A.F.M.; DIEDRICH, J.K.; YATES, J.R.; GONZALES, S.; FARBER, M.; VAZ, I.D.; TERMIGNONI, C. Tick Gene's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 787-797, 2019.

YILMAZ, B. GC-MS and HPLC Methods for Determination of Estriol Hormone in Pharmaceutical Preparations. **Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry**, v.2, n.5, p.1-5, 2015.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

CAPÍTULO I

1. Os óleos essenciais (OEs) de *Cinnamomum zeylanicum* e *Eremanthus erythropappus* e seus respectivos compostos majoritários, (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol apresentam atividade sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.
2. Os valores de CL₅₀ dos OEs de *C. zeylanicum* e *E. erythropappus* foram menores que os valores de CL₅₀ dos compostos (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol para larvas e fêmeas, mostrando uma maior atividade dos OEs.
3. O acetato de cinamila mostrou menor atividade acaricida em comparação com o seu precursor (*E*)-cinamaldeído.

CAPÍTULO II

1. Em média, o (*E*)-cinamaldeído mostrou maior atividade do que α -bisabolol.
2. Existe variação na susceptibilidade de diferentes populações de *R. microplus* frente ao fenilpropanóide (*E*)-cinamaldeído e ao sesquiterpeno α -bisabolol.
3. Não existe correlação entre valores de eficiência dos carrapaticidas com os compostos de origem vegetal, (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol, não sendo observado, dessa forma, resistência cruzada entre os princípios ativos.

CAPÍTULO III

1. Os compostos (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol alteram o metabolismo lipídico de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
2. Com o decorrer do tempo, o fenilpropanóide (*E*)-cinamaldeído altera, quantitativamente, as reservas de colesterol presentes no corpo gorduroso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
3. O (*E*)-cinamaldeído reduz, significativamente, o teor de colesterol na postura oriunda de fêmeas tratadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alternativas que possam vir a potencializar o controle de carrapatos têm despertado o interesse da comunidade científica, e a utilização de substâncias botânicas tem ganhado destaque devido as inúmeras vantagens que podem propiciar, como a redução nos custos e impactos ambientais e menor espectro de ação nos organismos ditos como não alvos. Os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Eremanthus erythropappus* e os compostos (*E*)-cinamaldeído e α -bisabolol apresentam atividade *in vitro*, sobre larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Embora o acetato de cinamila tenha resultado em baixa atividade carrapaticida, ele é um composto de elevada biossegurança. Dessa forma, futuras investigações com o intuito de melhorar sua atividade, através de associações com agentes de controle biológico ou até mesmo carrapaticidas sintéticos, poderiam vir a intensificar a eficiência de controle desses artrópodes.

A crescente preocupação com a perda de eficácia de carrapaticidas sintéticos, nos faz refletir se os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência a esses fármacos poderiam vir a influenciar a susceptibilidade dos carrapatos a compostos de origem vegetal. Os dados gerados no capítulo II, evidenciam ausência de correlação entre eficácia de carrapaticidas comerciais e as substâncias botânicas estudadas, demonstrando que não ocorre resistência cruzada, reforçando, dessa forma, o potencial destes metabólitos secundários de plantas no controle de carrapatos.

O metabolismo energético dos carrapatos é de extrema importância para sua sobrevivência, uma vez que está relacionado com diversos processos fisiológicos. O capítulo III desta tese, destacou alterações no perfil lipídico de fêmeas de *R. microplus* tratadas com compostos vegetais, que levam a uma redução no sucesso reprodutivo desses parasitos, uma vez que há uma queda na quantidade de massa de ovos postos pelas fêmeas e redução no percentual de eclosão das larvas, o que contribui para um melhor entendimento do mecanismo de ação desses compostos.

Estudos *in vitro* são de fundamental importância para selecionar compostos com potencial carrapaticida para diferentes estágios e espécies de carrapatos, no entanto, nem sempre os resultados obtidos em laboratório conseguem ser reproduzidos nos testes *in vivo*. Dessa forma, é necessário intensificar estudos a campo e promover o desenvolvimento de formulações, de forma a confirmar a atividade desses compostos vegetais e verificar sua toxicidade sobre outros organismos não alvo. Em adicional, uma análise comparativa sobre os custos, facilidade de obtenção e aplicação se faz necessário a fim de se eleger compostos que propiciem melhor custo benefício.

ANEXOS

Anexo A. Obtenção de amostras de carrapatos enviadas para realização de testes de biocarrapaticidograma na Embrapa Gado de Leite

As populações de *Rhipicephalus microplus* utilizadas nos experimentos dos capítulos I e II foram obtidas a partir de bovinos, naturalmente infestados. Amostras de carrapatos foram enviadas por produtores rurais, via sedex, à Embrapa Gado de Leite, para realização do teste de eficácia com diferentes carrapaticidas.

A realização do biocarrapaticidograma é uma prática realizada pela EMBRAPA, desde 1997, de forma gratuita, com o intuito de determinar o melhor produto carrapaticida a ser aplicado na propriedade rural. Para tal, os produtores precisam seguir algumas recomendações para enviar amostras de carrapatos, como: deixar cerca de 2 animais sem contato com carrapaticidas por um tempo determinado (25 dias para produto de contato e 35 dias para produto sistêmico); coletar 150 - 200 carrapatos; acondicionar esses carrapatos em um recipiente fechado com pequenos furos para entrada de ar; colocar esse recipiente em uma caixa, devidamente identificada, para ser enviada pelos correios; enviar por sedex para o endereço indicado.

Identificação da caixa enviada pelos correios: EMBRAPA GADO DE LEITE (carrapatos). Rua Eugênio do Nascimento, 610 Dom Bosco - Juiz de Fora – MG. CEP 36038-330.

Anexo B. Manutenção das colônias de *Rhipicephalus microplus*

Os experimentos do capítulo III, foram realizados com a utilização de carrapatos obtidos através de bezerros artificialmente infestados na estação experimental de estudos para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), CEUA/IV – protocolo 9714220419.

As infestações dos bezerros foram realizadas com larvas, a partir da utilização de seringas de 20 mL, com extremidade distal corta e fechada com algodão hidrófilo, que continham, previamente, 500 mg de ovos. Fêmeas ingurgitadas que começaram a se desprender dos animais (a partir do 21º dia de infestação), foram coletadas no estrado das baias, na qual os bezerros estavam inseridos, e levadas ao Laboratório de Controle Microbiano (LCM) do Departamento de Parasitologia Animal (UFRRJ), para serem higienizadas.

Parte das fêmeas recuperadas foi acondicionada em placa de Petri (12 cm de diâmetro) e levada para câmara climatizada ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}>80\%$) para realização de postura, para obtenção de larvas e manutenção da colônia. A outra parte de fêmeas foi utilizada para realização dos experimentos.

Anexo C. Protocolo de aprovação do comitê de ética permitindo manutenção da colônia de *Rhipicephalus microplus* por meio de infestações artificiais em bezerros



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Manutenção de colônia de *Rhipicephalus microplus* visando a avaliação do efeito de fungos entomopatogênicos no seu controle", protocolada sob o CEUA nº 9714220419 (00 001419), sob a responsabilidade de **Vânia R. E. Pinheiro Bittencourt** e equipe; *Patrícia Silva Gólo; Isabele da Costa Ângelo; Mariana Guedes Camargo; Amanda Costa da Rocha Corval; Laura Nóbrega Meirelles; Allan Felipe Marciano; Emily Mesquita da Silva; Fernanda Sousa Faria ; Ricardo de Oliveira Barbosa; Jéssica Fiorotti de Paulo; Julie Rhanna Tavares Ferreira; Thaís Almeida Corrêa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 30/08/2019.

We certify that the proposal "Maintenance of *Rhipicephalus microplus* colony aiming to evaluate the entomopatogenic effect of fungi", utilizing 3 Bovines (3 males), protocol number CEUA 9714220419 (00 001419), under the responsibility of **Vânia R. E. Pinheiro Bittencourt** and team; *Patrícia Silva Gólo; Isabele da Costa Ângelo; Mariana Guedes Camargo; Amanda Costa da Rocha Corval; Laura Nóbrega Meirelles; Allan Felipe Marciano; Emily Mesquita da Silva; Fernanda Sousa Faria ; Ricardo de Oliveira Barbosa; Jéssica Fiorotti de Paulo; Julie Rhanna Tavares Ferreira; Thaís Almeida Corrêa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 08/30/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 09/2019 a 09/2024

Área: **Parasitologia Animal**

Origem: **Setor de Bovinocultura da UFRRJ**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 48 meses**

N: **3**

Linhagem: **Mestiços das raças Holandesa e Gir**

Peso: **100 a 400 kg**

Local do experimento: Os animais serão mantidos em baias na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neltz do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da UFRRJ.

Seropédica, 01 de outubro de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Anexo D. Fórmulas utilizadas para cálculo de eficácia dos tratamentos

O teste de imersão de adultos é o método preconizado pela Food and Agriculture Organization (FAO, Estados Unidos), para avaliar a susceptibilidade dos carrapatos frente aos carrapaticidas, levando em conta a utilização de fórmulas que avaliam o percentual de controle do produto de acordo com a redução do número de carrapatos da próxima geração.

No presente estudo, o cálculo do percentual de controle foi realizado conforme metodologia proposta por Drummond et al. (1973), no qual:

- Reprodução estimada (RE) = $\frac{PM}{PI} \times PE \times 20.000$
- Percentual de controle (%C) = $\frac{RE \text{ do grupo controle} - RE \text{ do grupo tratado}}{RE \text{ do grupo controle}} \times 100$

Onde:

PM = Peso médio da massa de ovos – média do peso da massa de ovos produzidos pela fêmea, individualmente;

PI = Peso médio inicial – peso médio das fêmeas ingurgitadas pós-tratamento, antes de iniciarem a oviposição;

PE = Percentual médio de eclosão – média da estimativa visual do percentual de larvas eclodidas em relação a massa de ovos postos de cada fêmea.

Anexo E. Artigo referente ao capítulo I submetido na Veterinary Parasitology

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary
Parasitology or its open access mirror
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Acaricidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (Cinnamon) and *Eremanthus erythropappus* (Candeia), major compounds and cinnamyl acetate on *Rhipicephalus microplus*

Article Type: Original research paper

Keywords: Cattle tick, cinnamon, candeia, (E)-cinnamaldehyde, α -bisabolol

Corresponding Author: Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro, M

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Goiás

First Author: Paula Marchesini

Order of Authors: Paula Marchesini; Debora Ramos Oliveira; Geovany Gomes; Tigressa Helena Soares Rodrigues; Ralph Maturano; Queli Cristina Fidelis; Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior; Mario Geraldo Carvalho; Vania Rita Elias Pinheiro Bittencourt; Caio Márcio de Oliveira Monteiro, M

Abstract: The aim of this study was to chemically characterize the essential oils (EOs) of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) and *Eremanthus erythropappus* (candeia) and evaluate acaricidal activity of EOs, together with their major compounds and the cinnamyl acetate derivative, on unfed larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. EOs compounds were identified through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) and flame ionization detection (GC/FID). The acetylated derivative (cinnamyl acetate) was obtained through a reaction between acetic anhydrous and pyridine. The product was confirmed by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR 500 MHz) and carbon-13 (^{13}C NMR 125 MHz). The Larval Packet Test (LPT) at concentrations ranging from 0.31 to 10.0 mg/mL and Adult Immersion Test (AIT) at concentrations ranging from 2.5 to 60.0 mg/mL, were performed. (E)-cinnamaldehyde was the major compound in the *C. zeylanicum* (86.93%) EO, whereas α -bisabolol was the main compound in the *E. erythropappus* (78.41%) EO. In LPT, these EOs result in larval mortality rate higher than 90% from the concentration 2.0 mg/mL, while (E)-cinnamaldehyde, α -bisabolol and cinnamyl acetate resulted in 100% larval mortality rate in the concentrations of 5.0, 10.0



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Research paper

Acaricidal activity of (*E*)-cinnamaldehyde and α -bisabolol on populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) with different resistance profiles

Paula Marchesini^a, Tatiane Pinheiro Novato^{a, *}, Simone Jaqueline Cardoso^b,
Márcia Cristina de Azevedo Prata^c, Rafael Moreira do Nascimento^d, Guilherme Klafke^e,
Lívio M. Costa-Júnior^f, Ralph Maturano^d, Welber Daniel Zaneti Lopes^g,
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt^a, Caio Monteiro^g

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7 - Seropédica, RJ, 23897-000, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil

^c Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, Juiz de Fora, MG, 36038-330, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil

^e Centro de Pesquisa em Saúde Animal (IPVDF), Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Estrada Municipal do Conde, 6000, Eldorado do Sul, RS, Brazil

^f Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, MA, CEP 65080-805, Brazil

^g Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Avenida Esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia, GO, 74.690-900, Brazil

