

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS E ENGENHARIAS - CCAE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**NAYARA CAMATTA CAMPOS**

**EFEITO DO 1,8-CINEOL, CITRAL, EUGENOL E ÓLEO DE MAMONA (*Ricinus communis*) NA REPRODUÇÃO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae).**

**ALEGRE-ES**

**2018**

NAYARA CAMATTA CAMPOS

**EFEITO DO 1,8-CINEOL, CITRAL, EUGENOL E ÓLEO DE MAMONA (*Ricinus communis*) NA REPRODUÇÃO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Erika Takagi Nunes.

ALEGRE-ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

C198e Campos, Nayara Camatta, 1989-  
Efeito do 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo de mamona (*Ricinus communis*) na reprodução de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) / Nayara Camatta Campos. – 2018. 73 f. : il.

Orientador: Vagner Tebaldi de Queiroz.

Coorientador: Erika Takagi Nunes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Carrapato. 2. Homeopatia veterinária. 3. Medicina veterinária alternativa. I. Queiroz, Vagner Tebaldi de. II. Nunes, Erika Takagi. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

---

Bibliotecária: Lizzie de Almeida Chaves – CRB-6 ES-000871/O

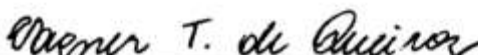
NAYARA CAMATTA CAMPOS

**EFEITO DO 1,8-CINEOL, CITRAL, EUGENOL E ÓLEO DE MAMONA (*Ricinus communis*) NA REPRODUÇÃO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias -CCAIE da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

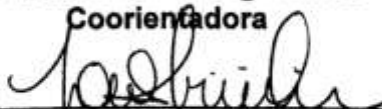
**COMISSÃO EXAMINADORA**



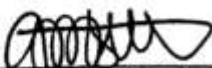
Prof. Dr. Wagner Tebaldi, de Queiroz  
Orientador



Prof.ª Dr.ª Erika Takagi Nunes  
Coordenadora



Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin  
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.ª Dr.ª Gabriela Modenesi Sirtoli  
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico esta dissertação a Deus e minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que sempre me sustentou nos momentos mais felizes e tristes dessa longa caminhada, sempre me dando forças e sabedoria para realizar tudo que hoje eu tenho;

Ao orientador Vagner T. de Queiroz e à coorientadora Erika T. Nunes, à professora Isabella V.F. Martins e ao professor Leonardo O. Trivilin por toda paciência e ajuda na condução da dissertação. E, também a todos os meus professores que ao longo da graduação ensinaram tudo que eu sei hoje;

Ao Professor Adilson Vidal Costa, a Milena B. Fazolo, Natália A. Guedes, Davi Cardoso A. de Melo do grupo GEAPS, nos processos com os óleos essenciais necessários para o andamento do projeto;

A Júlia Delpupo e Viviane Tavares de Paula, por ajudarem desde a coleta, e a execução do projeto, sempre com prontidão e boa vontade;

Aos meus pais Delma Camatta e Humberto A. Campos, aos meus tios Paulo A. de Assis e Lucimar C. de Assis que me deram apoio incentivo para sempre continuar a seguir meus sonhos sempre me sustentando quando mais precisei;

A minha avó Alcina M. Furlan e meu avô Ricardo Camatta, mesmo sem entender o que é o mestrado me apoiavam, rezavam e estavam ao meu lado, mesmo morando distantes;

Às minhas amigas Lívia Novelo, Daniele F. de Siqueira, Livia Perin e Marina Jurdi, pelo companheirismo, pela paciência, conversas e apoio ao longo do mestrado;

Ao Yago Enrico C. Esteves pela ajuda nos momentos difíceis que deixaram as dificuldades mais leves e a Vânia Gorete C. Esteves pelas orações e carinho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e Universidade Federal do Espírito Santo, por oferecer o espaço e o corpo docente adequado para a realização do projeto. E a CAPES e a FAPES por toda assistência financeira;

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui.

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.*

Mahatma Gandhi

## RESUMO

CAMATTA CAMPOS, NAYARA. **Efeito do 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo de mamona (*Ricinus communis*) na reprodução de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*** (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). 2018. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

O desenvolvimento de resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas comerciais vem sendo relatado desde a década de 40. Sendo assim, trabalhos de pesquisas com óleos essenciais e fixos têm sido desenvolvidos visando encontrar alternativas ao controle químico desta espécie de carrapato. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de formulações contendo 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo de mamona (*Ricinus communis*) sobre a reprodução de *R. (B.) microplus*. Grupos contendo 10 parasitas foram tratados com emulsões desses óleos em DMSO associado a Tween 80® ou éter lauril sulfato. A eficácia carrapaticida foi avaliada pelo teste de imersão de fêmeas. Para a análise dos efeitos teciduais, as fêmeas tiveram os ovários dissecados, fixados e submetidos à rotina histológica. O 1,8-cineol, citral e eugenol 1% (m/v) e óleo de mamona em 0,3% (m/v) apresentaram valores de eficácia de 29%; 11,6% e 9,8%, respectivamente. O efeito dos solubilizantes (DMSO associado com Tween 80® ou éter lauril sulfato) foi avaliado para o 1,8-cineol (10% (m/v)) e óleo de mamona em 0,3% (m/v), de forma isolada e associada. Os valores de eficácia observados para o 1,8-cineol isolado (92,8%) e associado ao óleo de mamona (94,1%) foram superiores quando as emulsões foram preparadas utilizando o éter lauril sulfato como solubilizante. Alterações morfológicas nos ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (I-V), bem como nas células do pedicelo, foram observadas tanto nas fêmeas tratadas com óleo de mamona (0,3% (m/v)) como naquelas com 1,8-cineol (10% (m/v)), sendo verificados efeitos mais intensos quando ambos estavam em associação. A formulação de 1,8-cineol (10% (m/v)) associada ao óleo de mamona (0,3% (m/v)) em éter lauril sulfato (2% (m/v)) demonstrou-se promissora no controle reprodutivo de *R. (B.) microplus*. Espera-se que os resultados obtidos possam nortear projetos futuros, em consonância com o bem-estar animal, visando o desenvolvimento de alternativas ao controle de carrapatos com produtos comerciais.

Palavras-chave: carrapato do boi. controle alternativo. ovário.



## ABSTRACT

CAMATTA CAMPOS, NAYARA. **Effect of 1,8-cineole, citral, eugenol and castor oil (*Ricinus communis*) in reproduction of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae).** 2018. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

The development of resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to commercial acaricidal has been reported since the 40's. Therefore, researches with essential and fixed oils have been developed aiming to find alternatives to the chemical control of this species of tick. The objective of this work was to evaluate the effect of formulations containing 1,8-cineole, citral, eugenol and castor oil (*Ricinus communis*) on the reproduction of *R. (B.) microplus*. Groups containing 10 parasites were treated with emulsions of these oils in DMSO associated with Tween 80® or lauryl sulfate ether. Acaricidal efficacy was assessed by the females immersion test. For the analysis of the tissue effects, the females had the ovaries dissected, fixed and submitted to the histological routine. The 1,8-cineole citral and eugenol 1% (m/v) and castor oil 0,3% (m/v) presented efficacy values of 29%; 11.6% and 9.8%, respectively. The effect of the solubilizes (DMSO associated with Tween 80® or lauryl sulfate ether) was evaluated for 1,8-cineol (10% (m/v)) and 0,3% (m/v) castor oil isolated and associated form. The efficacy values for 1,8-cineole isolated (92,8%) and castor oil (94,1%) were higher when the emulsions were prepared using the lauryl sulfate ether as the solubilizes. Morphological changes in oocytes at different stages of development (IV), as well as in pedicel cells, were observed in both castor oil (0,3% (m/v)) and 1,8-cineole 10% (m/v)), with more intense effects verified when both were in association. The solution of 1,8-cineole (10% (m/v)) associated with castor oil (0,3% (m/v)) in lauryl sulfate ether (2% (m/v)) was shown to be promising in the reproductive control of *R. (B.) microplus*. It is hoped that the results obtained could guide future projects, in line with animal welfare, aiming at the development of alternatives to the control of ticks with commercial products.

Keywords: cattle-tick. alternative control. ovary.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1- Capítulo ou gnatossoma do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	14
Figura 2- Esquema dos estágios de desenvolvimento ovocitário em <i>R. (B.) microplus</i> . I: ovócito I; II: ovócito II; III: ovócito III; IV: ovócito IV; V: ovócito V; lu: lúmen do ovário; ovd: oviduto; gv: vesícula germinativa.....	15
Figura 3- Fórmula estrutural da molécula do 1,8-cineol.....	24
Figura 4- Fórmula estrutural da molécula do eugenol.....	25
Figura 5- Fórmula estrutural da molécula citral composta pelos isômeros geranial (A) e neral (B) .....	26
Figura 6- Cromatograma dos produtos comerciais 1,8 cineol (1A), citral (neral - 2.1B e geranial – 2.2B) e eugenol (3C).....	50
Figura 7- Secção histológica dos ovários de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . <b>A-D</b> : Fêmeas submetidas à água autoclavada. <b>E-G</b> . Fêmeas submetidas ao éter lauril sulfato em 2%. Observe a morfologia preservada dos ovócitos I, II, III, IV e V. vg- vesícula germinativa, cr- córion, gv- grânulo de vitelo, nu- nucléolo, fg- fina granulação, mp- membrana plasmática, cp- célula do pedicelo, vc- vacúolos. Barras: A- C,F,G= 50 µm, D,E= 200 µm. Coloração: hematoxilina e eosina (HE).....	55
Figura 8- Secção histológica dos ovários de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . <b>H-K</b> : Fêmeas submetidas ao óleo de mamona em 0,3% com éter lauril sulfato em 2%. <b>L-O</b> : Fêmeas submetidas ao 1,8-cineol em 10% com éter lauril sulfato em 2%. vg- vesícula germinativa, cr- córion, gv- grânulo de vitelo, nu- nucléolo, fg- fina granulação, mp- membrana plasmática, cp- célula do pedicelo, vc- vacúolos. Seta H, I, K- córion espesso e com pregueamento; L, M, N- retração da membrana plasmática. Barras: K-O= 50 µm. Coloração: hematoxilina e eosina (HE).....	58

Figura 9- Secção histológica dos ovários de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas ao 1,8-cineol em 10% associado ao óleo de mamona em 0,3% e éter lauril sulfato em 2%. Note a presença de vacúolos (vc) citoplasmáticos e/ou nos grânulos de vitelo (gv), algumas em vesícula germinativa (vg) em *blebbing* (\*) ou fragmentação principalmente naqueles ovócitos em I e II. Observe irregularidades no limite celular (setas) dos ovócitos III, IV e V. cr- córion, nu- nucléolo, fg- fina granulação, mp- membrana plasmática, cp- célula do pedicelo, vc- vacúolos. Barras: P-U= 50 µm Coloração: hematoxilina e eosina (HE)..... 60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
Tabela 1-	Formulações contendo 1,8- cineol associado ou não ao óleo de mamona ( <i>Ricinus communis</i> ) utilizadas no teste de eficácia contra <i>R. (B.) microplus</i> .....	47
Tabela 2-	Valores do tempo de retenção (Tr), índice de Kovats calculado (IKc) e tabelado (IKt) e porcentagem de área (A%) para os compostos 1,8-cineol, citral e eugenol .....	50
Tabela 3-	Efeito de compostos majoritários de óleos essenciais sobre a reprodução das fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	51
Tabela 4-	Efeito do 1,8-cineol e do óleo de mamona solubilizados em DMSO e Tween 80® ou éter lauril sulfato sobre o peso dos ovos, porcentagem de eclosão e porcentagem de eficácia em fêmeas de <i>R. (B.) microplus</i> .....	52

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 O Carrapato do boi <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	13
2.1.1 Morfologia externa do aparelho reprodutor e ovogênese .....	13
2.1.2 Ciclo de vida .....	16
2.2 Prejuízos econômicos causados pelo <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	17
2.3 Controle com acaricidas químicos e resistência .....	18
2.3.1 Manejo integrado para controle do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	19
2.3.1.1 Controle Imunológico .....	20
2.3.1.2 Controle Biológico .....	20
2.4 Utilização de extratos de plantas e óleos essenciais .....	22
2.4.1 Óleo de mamona ( <i>Ricinus communis</i> ).....	23
2.4.2 1,8-cineol (eucaliptol) .....	24
2.4.3 Eugenol .....	25
2.4.4 Citral .....	26
2.5 Uso de solventes e surfactantes em soluções de teste <i>in vitro</i> .....	27
<b>3 REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>CAPÍTULO 1: Efeito do 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo de mamona (<i>Ricinus communis</i>) na reprodução de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)</b> .....	39
<b>RESUMO</b> .....	40
<b>ABSTRACT</b> .....	41
<b>4 INTRODUÇÃO</b> .....	42
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
<b>6 RESULTADOS</b> .....	49
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2016, o Brasil possuía, em média, 226 milhões de bovinos representando, aproximadamente, 22% do rebanho mundial, o que permitiu a exportação de 1,5 milhões de toneladas de carne bovina e a produção de 35 mil toneladas de leite (ANUALPEC, 2017).

Esses números não são mais expressivos devido aos prejuízos econômicos causados principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, mais conhecido como carrapato do boi, uma vez que sua picada e hematofagia geram danos ao couro, permitem a transmissão de patógenos, redução da produção de leite e carne, podendo até provocar o óbito dos animais. Os custos para remediar os problemas causados, além do controle com acaricidas químicos gera um prejuízo econômico de 2 a 3 milhões de dólares anuais no Brasil (GRISI et al., 2002; GRISI et al., 2014).

Desde o início do século XIX, a forma mais comum para o controle do carrapato é com o uso de acaricidas químicos; entretanto, esses produtos possuem poder residual o que torna proibido o consumo de produtos de origem animal, durante o período em que a substância permanece no organismo do mesmo. Sendo assim, este método de controle compromete a segurança alimentar e atinge diretamente o mercado consumidor que, cada vez mais, busca por alimentos saudáveis e com a produção sustentável (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011; BRASHEARS; CHAVES, 2017; FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007).

Além disso, a resistência aos grupos químicos mais usuais para o controle do carrapato do boi vem sendo relatada desde a década de 40. Isso se deve à utilização constante e ao manejo incorreto desses acaricidas, que levam os carrapatos a evadirem os efeitos de doses tóxicas que seriam letais à maioria dos indivíduos sensíveis, fazendo com que sobrevivam à ação destes produtos e gerem descendentes resistentes (ABBAS et al., 2014; FRISCH, 1999; FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007; GONZALES, 1974; STONE, 1972).

Nesse cenário, com a necessidade de novas bases medicamentosas para o controle do *R. (B.) microplus*, que sejam mais seguras para o homem, animais e meio ambiente, pesquisas que utilizam óleos essenciais de plantas com a finalidade acaricida estão em ascensão. Pois, colaboram também, com a política nacional de

incentivo aos Sistemas de Produção Sustentável, entre eles, a Produção Integrada Agropecuária, visto que os resultados destes estudos auxiliam no desenvolvimento de métodos alternativos de controle de pragas (ADENUBI et al., 2016; CANÇADO et al., 2012; CATTO, 2013).

O uso de produtos extraídos dos vegetais se mostrou vantajoso por ser um recurso renovável que promove uma evolução mais lenta da resistência, uma vez que os óleos de plantas são compostos por uma mistura complexa de várias substâncias (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011; WIESBROOK, 2004). Estudos *in vitro* com óleos essenciais de plantas pertencentes às famílias Lamiaceae, Meliaceae e Myrtaceae e o metabólito secundário 1,8-cineol mostraram ser potencialmente promissores frente ao *R. (B.) microplus* (ADENUBI et al., 2016; CETIN et al., 2010; DE SOUZA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2011; ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Prates et al. (1998) mostraram o poder larvicida do 1,8-cineol puro, tendo esse causado 100% de mortalidade das larvas de *R. (B.) microplus*, após 5 minutos em contato. Ao passo que Chagas et al. (2002) estudaram o óleo de *E. globulus*, constituído por 85,84% de 1,8-cineol e verificaram a eficácia de 100% na concentração de 10%, quando testado sobre fêmeas de *R. (B.) microplus*.

Experimentos em que o óleo fixo de mamona foi incorporado na ração de coelhos parasitados por *Rhipicephalus sanguineus* mostraram que ele é capaz de promover alterações morfológicas nos ovócitos desses carrapatos, dificultando sua reprodução (ARNOSTI et al., 2011; SAMPIERI et al., 2012, SAMPIERI et al., 2013). Chagas et al. (2003) demonstraram que o uso do azeite de oliva adicionado a solventes hidrofílicos provoca maior permeabilidade, assim, o uso de óleos fixos pode auxiliar na ação e na penetração de substâncias em emulsões utilizadas em testes sobre as fêmeas de *R. (B.) microplus*.

Com a pretensão de testar os compostos isolados e o óleo fixo, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de formulações contendo o 1,8-cineol, citral, eugenol ou óleo de mamona (*Ricinus communis*) sobre a reprodução de *R. (B.) microplus*. Dessa forma, espera-se que os resultados obtidos possam nortear a implementação de projetos futuros que possibilitem o desenvolvimento de carrapaticidas naturais e/ou formulações contendo novos agroquímicos com maior espectro de ação e menor efeito poluente ao meio ambiente.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Carrapato do boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos são oriundos da Ásia e durante os séculos XVI e XVIII, com as expedições marítimas e do transporte de animais e produtos, esses ectoparasitas se difundiram pelo mundo se adaptando principalmente nas regiões tropical e subtropical, com climas mais quentes e úmidos, entre os paralelos de latitude de 32º Sul e 32º Norte, por serem favoráveis à sua reprodução (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GOMES, 1998; GONZALES, 1974; GONZALES, 1995; NUÑES; MUÑOZ COBENAS; MOLTEDO, 1982).

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é encontrado em todo território brasileiro, sendo mais concentrado nas regiões sudeste, sul e parte do centro-oeste (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GONZALES, 1974; GONZALES, 1995).

São animais que pertencem ao Filo Arthropoda, à Classe Arachnida, à Ordem Acarina, à Família Ixodidae, essa envolvendo as quatro espécies principais: *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma* sp., *Amblyomma triste* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Essa última espécie destaca-se por parasitar principalmente os bovinos e, de forma singular, os búfalos, ovinos, caprinos, equinos, animais domésticos como cães e gatos, animais silvestres, bem como o homem (GONZALES, 1974). Os locais preferidos de fixação dos carrapatos são as regiões inguinal, perineal, na inserção da cauda, no pavilhão auricular, pescoço, esterno, podendo ser encontrados também em dorso e lombo (CORDOVÉS, 1997; GONZALES, 1974).

#### 2.1.1 Morfologia externa do aparelho reprodutor e ovogênese

Estruturalmente, as formas ninfas e adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* possuem quatro pares de patas, enquanto as larvas possuem três. O carrapato macho mede cerca de 1,5 a 2,5 mm de extensão e possui dois pares de placas adanais, além de uma proeminência em forma de cauda. As fêmeas podem chegar a 13 mm de tamanho e, quando ingurgitadas, tendem a aumentar sua dimensão corporal em até 200 vezes o seu peso. O gnatossoma ou capítulo tem



formato hexagonal, curto, achatado, com a base aderida à parte anterior do corpo, o que caracteriza essa espécie (Figura 1) (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GONZALES, 1974).



Figura 1- Capítulo ou gnatossoma do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.  
 FONTE: Imagem do autor.

Anatomicamente, o aparelho reprodutor da fêmea é um órgão tubular, apresentando, externamente, uma abertura vaginal. Na porção interna do carrapato encontra-se a vagina e logo acima dessa situa-se o receptáculo seminal, onde serão armazenados os espermatozoides. Na junção da vagina com o útero encontram-se duas glândulas acessórias. Adiante, o útero se bifurca, partindo um oviduto de cada extremidade e o ovário, tubiforme, assemelhando-se a uma ferradura (CAMARGO-MATHIAS, 2013; REY, 2001; SAITO et al., 2005; SONENSHINE, 2014).

O ovário apresenta parede composta por células epiteliais pequenas, sendo que a aderência do ovócito ao órgão, dada pelo pedicelo (Figura 2), uma proliferação de células globosas e ovoides, semelhante ao epitélio ovariano (CAMARGO-MATHIAS, 2013; SAITO et al., 2005; REY, 2001).

Os ovócitos dos carrapatos *R. (B.) microplus* são classificados em I, II, III, IV e V (Figura 2). O estágio dos ovócitos nos ovários é variado e com crescimento não uniforme, sendo que, à medida que evoluem, o tamanho aumenta comparado à fase anterior e os de estágio mais avançado (tipo IV e V) comumente são encontrados na

porção distal do ovário (CAMARGO-MATHIAS, 2013; SAITO et al., 2005; SONENSHINE, 2014).

No ovócito I, há produção apenas de substâncias estruturais, enquanto no estágio II, começa a ocorrer a vitelogênese, ambos pouco corados e de tamanho reduzido. A partir das próximas fases os ovócitos vão se aperfeiçoando e apresentando coloração mais amarronzada, desde o III até o V, onde esse marca o final da vitelogênese, estando pronto para a fecundação (CAMARGO-MATHIAS, 2013; SAITO et al., 2005; SONENSHINE, 2014).

No estágio V o ovócito é transferido para dentro do lúmen ovariano e caso não haja a fecundação, é reabsorvido. O ovócito em fase de degeneração dispõe de um contorno amorfo, franzido com várias pregas coriônicas e com delimitação desarranjada (CAMARGO-MATHIAS, 2013; SAITO et al., 2005; SONENSHINE, 2014).

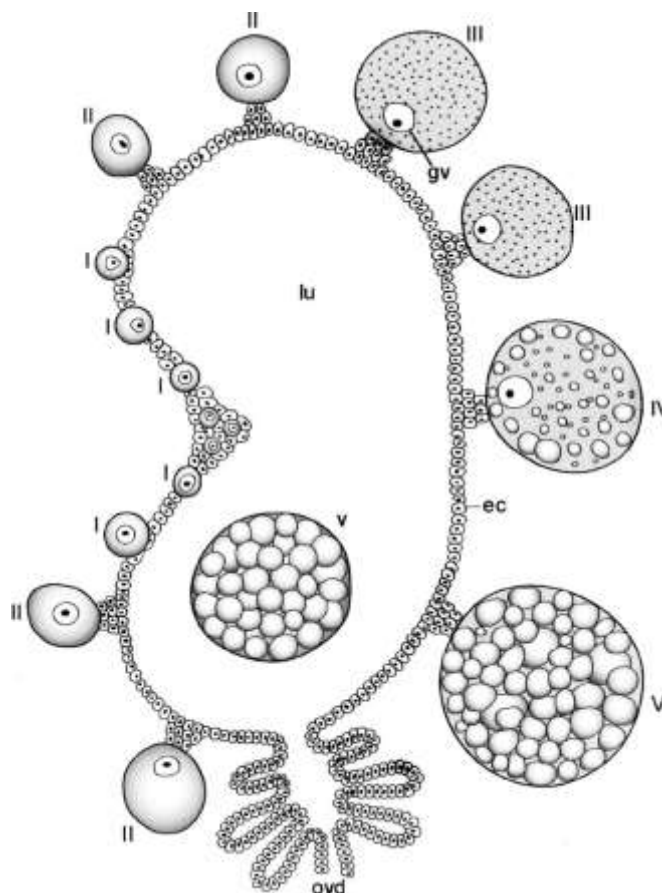


Figura 2- Esquema dos estágios de desenvolvimento ovocitário em *R. (B.) microplus*. I: ovócito I; II: ovócito II; III: ovócito III; IV: ovócito IV; V: ovócito V; lu: lúmen do ovário; ovd: oviduto; gv: vesícula germinativa.

FONTE: Saito et al. (2005).

### 2.1.2 Ciclo de vida

O *Rhipicephalus (B.) microplus* é uma espécie monóxena, sendo assim, seu ciclo de vida se desenvolve em apenas um hospedeiro, passando por uma fase ambiental e uma parasitária. Os carrapatos são pecilotérmicos, ou seja, o clima é fundamental para seu metabolismo, sendo a temperatura de 27°C e umidade 80% as condições ideais para seu ciclo de vida (DE LA VEGA et al., 2012; SONENSHINE, 2014).

A fase ambiental ou fase de vida livre se inicia quando a fêmea teleógina, pronta para a oviposição, se desprende do seu hospedeiro e se direciona ao solo, escavando de 10 a 20 mm ou se abrigando na vegetação. Durante a postura, os ovos são impermeabilizados pelo órgão de Gené, mantendo-os lubrificados e aglutinados, evitando que se desidratem. Cerca de 50% a 60% da massa corporal da fêmea é convertida em aproximadamente 3000 a 4000 ovos. Após a oviposição, a fêmea morre, denominando assim, quenógina. Os ovos, em condições favoráveis (27° C e umidade 80%), eclodem após 15- 21 dias, podendo perdurar por até 100 dias após a postura (BARROS-BATTESTI et al., 2006; DE LA VEGA et al., 2012; GONZALES, 1974; SONENSHINE, 2014).

As larvas infestantes, são geotropicamente negativas, e se posicionam nos altos das pastagens, aguardando o hospedeiro por até 6 meses ou mais, sem necessidade de se nutrir. As larvas parasitárias, sofrem duas ecdises e a diferenciação sexual quando se transformam em machos ou fêmeas; essas se desenvolverão em teleóginas, as quais pelo hábito hematófago se alimentarão dos hospedeiros, até o momento da postura. Assim, 95% dos parasitas se encontram no ambiente em estágio de ovos, larvas e teleóginas, enquanto apenas 5% estão nos hospedeiros (BARROS-BATTESTI et al., 2006; DE LA VEGA et al., 2012; GONZALES, 1974; REY, 2001; SONENSHINE, 2014).

As fêmeas do *Rhipicephalus (B.) microplus* até estarem prontas para a oviposição, podem aumentar seu peso em até 200 vezes e ingerir 0,5 mL a 3 mL de sangue. Por consequência, podem provocar anemia aos hospedeiros, dependendo da infestação, além de transmitirem patógenos via repasse sanguíneo e lesão na pele dos animais (FURLONG, 1993).

## 2.2 Prejuízos econômicos causados pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os prejuízos econômicos que os carrapatos acarretam são inúmeros: os danos no couro, causados por carrapatos e miíases, reduzem a qualidade dessa matéria-prima; assim, dados de Martinez et al. (2004) apontam que apenas 8% do couro brasileiro é comercializado como de primeira qualidade.

As picadas dos carrapatos e a quantidade da infestação podem ser uma porta de entrada para o desenvolvimento de miíases e assim prejudicar ainda mais a qualidade no couro. Bovinos infestados por mais de 50 fêmeas teleóginas de tamanho superior a 4,5 mm e por um tempo maior que 24 meses possuem quatro vezes mais chances de adquirir miíases, comparados aos animais com menor infestação (RECK et al., 2014b).

Estima-se que há uma redução entre 10% a 25% na produção leiteira dos animais parasitados pelo *R. (B.) microplus* (GONZALES, 1974; GRISI et al., 2002). Uma análise feita por Rodrigues e Leite (2013), em Minas Gerais, estimou os prejuízos no setor leiteiro por consequência das cargas parasitárias: uma infestação de aproximadamente 71 a 123 carrapatos *R. (B.) microplus* por animal leva a uma perda em média de 90,24 litros de leite por vaca anualmente.

Esse ectoparasita pode ser transmissor de Rickettsia, como a *Anaplasma marginale*, vírus e protozoários, bem como *Babesia bovis* e *B. bigemina*. Podem gerar quadros anêmicos, problemas no crescimento e desenvolvimento, diminuição de produção leiteira e conversão de peso dos bovinos. Além disto, são responsáveis por prejuízos na reprodução, como abortos, esterilidade, prolongamento de gestação, até óbitos (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GONZALES, 1974). A infecção desses agentes se denomina tristeza parasitária bovina, causando grandes problemas de anemia, podendo acarretar óbito ao parasitado (BARROS-BATTESTI et al., 2006; REY, 2001).

Avaliações anuais com prejuízos causados por carrapato no mundo chegam por volta de US\$ 13,9 a US\$ 18,7 bilhões (De CASTRO, 1997). Na Austrália as perdas econômicas causadas pelo *R. (B.) microplus* variam entre US \$ 62 milhões. Na Índia as perdas são de US\$ 498,7 milhões por ano (SINGH et al., 2014; VALENTE et al., 2014).

Estimativas dos prejuízos econômicos causados por *R. (B.) microplus*, no Brasil, são baseadas nas despesas com acaricidas químicos, lesão no couro, na

diminuição da produção leiteira, de peso corporal e na mortalidade dos animais. Todos esses fatores geram um déficit em torno de 2 a 3 milhões de dólares. Dessa forma, para diminuir os prejuízos econômicos devido às consequências da infestação dos *R. (B.) microplus*, investimentos em controle parasitário se fazem necessários (GRISI et al., 2002; GRISI et al., 2014).

### **2.3 Controle com acaricidas químicos e resistência**

Os acaricidas comerciais podem ser divididos em tópicos ou sistêmicos. Os tópicos são aplicados na forma de pulverização, *pour on* ou imersão do animal. Os produtos tópicos precisam ter contato com o parasito para poderem atuar, promovendo o óbito do mesmo, entretanto, por possuírem efeito residual baixo no animal, precisam ser administrados em intervalos menores. Os grupos químicos são os organofosforados, os piretroides sintéticos, as amidinas e os fenilpirazóis (FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007).

Os acaricidas sistêmicos são administrados de forma *pour on* ou intramuscular ou até mesmo subcutânea e precisam ser absorvidos e metabolizados pelo animal, atingindo o carrapato via corrente sanguínea. Possuem poder residual maior com a atuação mais prolongada. Os grupos correspondentes são as lactonas macrocíclicas e benzofenilureas (FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007).

A forma mais comum de controle é feita por acaricidas químicos, cuja incorreta aplicação ou até mesmo o uso de subdoses podem promover a seleção de carrapatos mais resistentes, o que torna cada vez mais difícil o seu controle. O uso desordenado e o manejo incorreto geram resistência dos carrapatos aos produtos químicos comerciais. Assim, a resistência parasitária se dá pela habilidade de alguns carrapatos de suportar dosagens que, anteriormente usadas, foram letais para alguns indivíduos, porém por motivos adaptativos, conseguem sobreviver e conceber descendentes possivelmente resistentes às drogas. Uma vez instalada, a resistência a uma base acaricida no carrapato é um fator irreversível (ABBAS et al., 2014; GONZALES, 1974; STONE, 1972).

Um dos primeiros carrapaticidas usados foi o arsênico (1896), por intermédio de um fazendeiro australiano que criou uma fórmula e obteve êxito no controle dos carrapatos. Porém, o seu uso foi descontinuado pelos altos índices de toxicidade em animais e humanos, além do desenvolvimento da resistência. No Brasil, também

houve relatos de resistência ao arsênico, sendo sua primeira publicação em 1949, no Rio Grande do Sul. Em 1952 foi descoberta a resistência dos carrapatos sobre os organoclorados (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003; GONZALES, 1974; GONZALES, 1995).

A resistência aos outros produtos químicos como os organofosforados foi relatada em 1955, amidinas no ano de 1975 (ABBAS et al., 2014; BRITO et al., 2011; MACHADO et al., 2014; VEIGA et al., 2012), piretroides em 1977 (ABBAS et al., 2014; GOMES; KOLLER; BARROS, 2011; KOLLER; GOMES; BARROS, 2009; MENDES et al., 2011), fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas em 1981 (ABBAS et al., 2014; LOPES et al., 2014; RECK et al., 2014a) e benzoilfenilureias em 2013 (RECK et al., 2014a).

Apesar de a utilização dos acaricidas químicos ser a forma mais usual para o controle dos carrapatos, pode gerar resíduos em alimentos de origem animal e causar efeitos deletérios à saúde humana, além de poluição ambiental gerando um desequilíbrio ecológico local. Nesse contexto, tem-se explorado a busca de novas formas de controle do carrapato que agridam menos o ambiente e os humanos, podendo ser destacados: o controle biológico e o uso de produtos oriundos de vegetais, como os fitoterápicos. Assim, a etnoveterinária também está obtendo um prestígio particular no controle do carrapato bovino (CATTO, 2013; ELLSE; WALL, 2014; VILLAR DEL FRESNO, 2010).

### **2.3.1 Manejo integrado para controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Uma forma para se fazer o controle dos carrapatos é a utilização do manejo integrado à agropecuária, sendo assim, associar várias medidas como: a aplicação de rotação de pastagem, o controle imunológico, com o desenvolvimento de vacinas; controle biológico, com a seleção de animais mais resistentes; e com o uso de produtos acaricidas, ressaltando a importância de produtos oriundos de vegetais (CANÇADO et al., 2012; CATTO, 2013).

### 2.3.1.1 Controle Imunológico

O controle imunológico desenvolvido por vacinas contra os carrapatos vem sendo pesquisado há cerca de meio século. Esses produtos devem conter substâncias dos carrapatos que promovam a imunidade nos bovinos (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GONZALES, 1995), como os antígenos proteicos Bm86 e Bm91, provenientes do intestino dos parasitas, também por outras proteínas e metaloproteases presentes nos carrapatos (ALI et al., 2015; CUNHA et al., 2012; PARIZI et al., 2012).

Parizi et al. (2012) analisaram o efeito de uma vacina que continha três proteínas recombinantes do carrapato *R. (B.) microplus*. Foram utilizadas três doses espaçadas por 21 dias e, como resultado, os bovinos tiveram resposta humoral com alta produção de anticorpos de modo que diminuiu a infestação no hospedeiro. Ali et al. (2015), também usaram uma vacina com a presença de uma metaloprotease recombinante, a qual gerou imunidade e anticorpos contra os carrapatos.

Um dos impasses dessa vacinação com Bm86 é que a imunidade é baixa em algumas populações do gênero *Rhipicephalus*, como o estudo relatado por Cunha et al. (2012), onde a vacina produzida com antígenos recombinantes de Bm86, obteve baixa eficácia de 31%, dos bovinos vacinados, contra a amostra da estirpe dos *R. (B.) microplus* presentes na localidade de Campo Grande- MS.

### 2.3.1.2 Controle Biológico

Os bovinos zebuínos (*Bos indicus*) puros possuem certa resistência à infestação de carrapatos, comparados às raças europeias (*B. taurus*), puro sangue, que são mais susceptíveis (JONSSON, 2006). Deste modo, um animal mestiço, com carga genética mais zebuína, pode ser uma alternativa de redução da carga parasitária. Pesquisas *in vitro* desenvolvidas, em 1995, mostraram que células de bovinos geneticamente parecidos com *B. indicus* produziam uma resposta linfocitária e macrófaga, com produção de citocinas, interleucina 1, desencadeando uma resposta de imunidade celular Th1, com pico de produção três dias pós-inoculação da saliva (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Um experimento realizado por Biegelmeyer et al. (2015), que analisaram a

resistência e suscetibilidade dos bovinos de acordo com o cruzamento entre as raças Hereford (*B. taurus*) e Braford, mostrou que, essa última, é derivada da mestiçagem entre Brahman (*B. indicus*) e Hereford. Neste estudo, escolheram 20 novilhas, geneticamente sensíveis aos carrapatos, e a outra metade, resistente aos mesmos. Foram desafiadas com 20000 larvas de *R. (B.) microplus*, a cada 14 dias, com quatro repetições. Foi observado que os animais mais vulneráveis aos ectoparasitas possuíam entre 5,5 a 11,1 vezes mais carrapatos comparado aos resistentes. Além disto, se observou uma menor massa de postura de ovos e conseqüentemente menor índice reprodutivo dos carrapatos parasitados nos animais mais resistentes, sendo sugestivo que a carga genética mais resistente dos bovinos possa ser um fator que ajude a diminuir a infestação por carrapatos.

Farias, Gonzales e Saibro (1986) observaram que as leguminosas *Stylosanthes scabra* e *S. viscosa* e a gramínea forrageira *Melinis minutiflora* (Capim-gordura) provocaram repelência às larvas, supondo ser devido aos pelos produtores de secreções viscosas que também podem provocar a mortalidade das larvas após a aderência destas na secreção.

De acordo com Alves-Branco, Echevarria e Siqueira (1983), a garça vaqueira (*Egretta ibis*) se alimenta de carrapato quando sobre o hospedeiro e também quando estão no ambiente, com média de ingestão diária de aproximadamente 132 carrapatos, ajudando, assim, no controle do número destes parasitas.

Os fungos entomopatogênicos também estão sendo amplamente estudados para o controle dos carrapatos. Fernandes et al. (2011), isolaram 70 tipos de fungos e encontraram alta atividade acaricida em cinco deles. Quinelato et al. (2012) testaram 30 isolados de *Metarhizium anisopliae*, sendo que três desses causaram mortalidade em 100% das larvas de *R. microplus*, mostrando um potencial acaricida.

Outros agentes que podem controlar os carrapatos são as formigas *Pachycondyla striata* (CHAGAS; FURLONG; NASCIMENTO, 2002) e os nematoides entomopatogênicos como alguns do gênero *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema* sp. (SILVA et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2004; VERÍSSIMO, 2013). Esses agem penetrando nos orifícios do carrapato, como ânus, capítulo, espiráculos respiratórios e também pela cutícula. Quando dentro do carrapato, as bactérias que se encontravam no íntimo dos nematoides são liberadas, se multiplicam e liberam toxinas que promovem a morte da teleógina (HAZIR et al., 2003; VERÍSSIMO, 2013).

A queima das pastagens, após o início da época das chuvas, é uma das



medidas também possível para o controle dos carrapatos. Outra alternativa é pastejo rotacionado, principalmente em criações extensivas e semiextensivas, em que os animais são translocados de pasto em certo tempo (HONER; GOMES, 1990). Um estudo feito por Gauss e Furlong (2002) indicou que para a rotação de pastagem de *Brachiaria decumbens* é necessário um tempo de aproximadamente 83 dias de descanso para que ocorra a morte das formas larvares, notando haver maior taxa de infestação dos bovinos entre 15 e 30 dias.

## 2.4 Utilização de extratos de plantas e óleos essenciais

Sabe-se que os humanos da antiguidade já empregavam produtos de plantas como fonte terapêutica para o tratamento de patologias. O primeiro relato da utilização de plantas medicinais foi nos papiros egípcios em que continha descrito a aplicação de 500 plantas, sendo a camomila, absinto, babosa, tomilho e alecrim algumas delas (BARATA, 2005). Atualmente, 25% dos medicamentos utilizados prescritos são originários de plantas (CALIXTO et al., 2000; CATTO, 2013).

Plantas podem produzir óleos fixos, que se diferem dos óleos essenciais, por ter seu conteúdo composto basicamente de substâncias lipídicas, sendo principalmente de ácidos graxos e triacilglicerol, obtidos normalmente de sementes. São exemplos o óleo de soja e mamona (MADBOULY; ZHANG; KESSLER, 2016).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de substâncias voláteis, possuindo aroma agradável, aspecto líquido à temperatura ambiente, hidrofóbicos e solúveis a solventes orgânicos. Originados do metabolismo secundário de espécies vegetais, podem ser extraídos por destilação por arraste a vapor e destilação a pressão reduzida (BRASIL, 2007; VILLAR DEL FRESNO, 2010).

Os óleos vegetais compostos nas folhas (eucalipto e menta), raízes e casca estão ligados à defesa da planta contra agentes patogênicos, como as bactérias e fungos. Nas flores (rosas e jasmim), geralmente contêm substâncias atrativas para animais polinizadores. Encontra-se também nos frutos (erva-doce), brotos, galhos, semente (mostarda), caule (canela) rizomas (gengibre) e até na madeira (BAKKALI et al., 2008; VILLAR DEL FRESNO, 2010).

A vantagem do uso de substâncias vegetais é que são um recurso renovável, além da evolução da resistência ocorrer de forma mais lenta devido à composição

complexa que apresentam várias substâncias e em diferentes concentrações (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011; WIESBROOK, 2004).

As substâncias vegetais possuem, também, rápida degradação em condições ambientais, tendo menor efeito residual, e, conseqüentemente, baixa toxicidade para animais e humanos, ou seja, são uma forma de controle mais seguro e que minimiza a contaminação ambiental (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011; WIESBROOK, 2004). Dessa forma, além de testes com as substâncias vegetais, para verificar sua atuação, tempo de efeito e, se necessário, também criar formulações com aditivos que promovam maior permanência do princípio ativo no ambiente (CATTO, 2013).

Experimentos *in vitro* com mais de 200 espécies de plantas com especialidades de serem repelentes ou com potencial acaricida já foram realizados em todo o mundo. (ADENUBI et al., 2016). As principais famílias de plantas que foram testadas *in vitro* no controle de carrapatos: as Lamiaceae, Meliaceae e Myrtaceae (ADENUBI et al., 2016; LORENZI; MATOS, 2008; MONTEIRO et al., 2011).

#### **2.4.1 Óleo de mamona (*Ricinus communis*)**

O óleo de mamona é um óleo fixo obtido das sementes de *Ricinus communis*, uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae. Pode constituir soluções como emoliente, veículo oleaginoso e/ou solvente, sendo atóxico quando utilizado como excipiente. Sua composição contém éster derivado do ácido ricinoleico (87%), do ácido oleico (7%), do ácido linoleico (3%), do ácido palmítico (2%) e do ácido esteárico (1%) (OMOHU; OMALE, 2017; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A ação do óleo de mamona sobre insetos *Spodoptera frugiperda* foi verificada por Ramos-López et al. (2010), onde na concentração de  $2,69 \times 10^3$  ppm, 50% das larvas desse inseto foram mortas. O efeito inseticida do óleo de mamona foi verificado em outros insetos, como *Helicoverpa zea* (broca-grande do tomateiro) (BESTETE et al., 2011) e *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas) (RONDELLI et al., 2011).

Alguns estudos morfológicos também foram realizados para avaliar os efeitos do óleo de mamona nos ovários de carrapatos. Arnosti et al. (2011) e Sampieri et al. (2012, 2013) verificaram que a incorporação do óleo de *Ricinus communis* nas rações de coelhos parasitados pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é capaz de promover alterações na estrutura e fisiologia dos ovócitos, afetando assim, a

reprodução destes parasitas.

#### 2.4.2 1,8-cineol (eucaliptol)

O 1,8-cineol ou eucaliptol é um monoterpreno (Figura 3) encontrado em várias plantas, como no alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e em grande parte dos *Eucalyptus* sp., dentre eles, *E. citriodora* (55%) e *E. globulus* (71%) (BAKKALI et al., 2008; CHAGAS et al., 2002; HSDB, 2017; VUUREN; VILJOEN, 2007). Esse composto está envolvido, nas plantas, na defesa contra insetos herbívoros (KAPPERS et al., 2005).

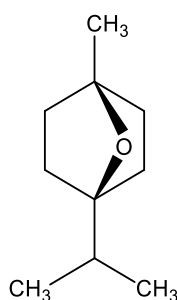


Figura 3 – Fórmula estrutural da molécula do 1,8-cineol.  
FONTE: Imagem do autor.

O 1,8-cineol também é utilizado em alimentos, doces e pastilhas para tosse como agente de aroma e sabor (HSDB, 2017), assim como em produtos de cuidados pessoais e medicamentos que tratam a bronquite, devido à sua ação principalmente nas vias aéreas (FISCHER; DETHLEFSEN, 2013).

Pesquisas com 1,8-cineol confirmam sua ação antimicrobiana, antifúngica (PATTNAICK et al., 1997), analgésica (ASANOVA et al., 2003) antiespasmódica (MAGALHÃES et al., 1998) e anti-inflamatória (JUERGENS; STÖBER; VETTER, 1998).

Santos e Rao, em 2001, observaram ação gastroprotetora do 1,8-cineol quando administrado oral (50-200 mg/kg) em ratos com lesão gástrica promovida pelo fornecimento prévio de etanol. Os autores, ainda, afirmam que a resposta dos animais foi de forma análoga àquela à cimetidina que é um medicamento utilizado para tratamento de úlceras gástricas.

Perrucci et al. (2001) testaram o óleo de *Artemisia verlotorum*, contendo 1,8-cineol (18,8%), de forma tópica, em 5%, em orelhas de coelhos infestados por ácaros

*Psoroptes cuniculi*. Estes autores verificaram uma eficácia de 100% na eliminação do parasito, além da ausência de sinais de irritação ou intoxicação.

O trabalho de Cruz et al. (2013), utilizaram o óleo essencial de *Lippia gracilis* (4,66mg/mL), contendo 3,92% 1,8-cineol, apontou esta ser uma concentração letal a 90% das fêmeas adultas de *R. (B.) microplus in vitro*.

### 2.4.3 Eugenol

O eugenol é um fenilpropanoide, podendo ser encontrado nos óleos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (HE et al., 2007) e alfavaca (*Ocimum sp.*) (HÜE et al., 2015). Possui efeitos antifúngico (HE et al., 2007), antibacteriano (DEVI et al., 2010) e moluscicida (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

O eugenol (Figura 4) é utilizado como flavorizante e antioxidante em cosméticos, perfumaria, na preparação de alimentos e bebidas, além de ser usado na produção da vanilina sintética, comumente conhecida como baunilha (CONVERTI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2009).

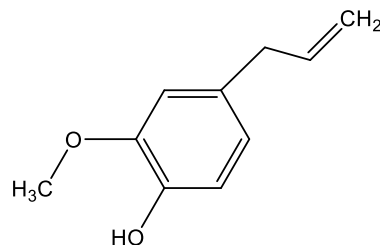


Figura 4 – Fórmula estrutural da molécula do eugenol.

FONTE: Imagem do autor.

Um estudo com as formas larvares de *Aedes aegypti* e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contendo 54% de eugenol indicou que a concentração letal para 50% das larvas do inseto é 104,6 mg/mL. No entanto, quando utilizado o óleo *O. tenuiflorum* contendo 59,4% de eugenol sobre as formas larvares deste inseto, a concentração letal para 50% das larvas é 71,3 mg/mL (FURTADO et al., 2005).

Santos, Oliveira e Albuquerque, em 2012, testaram, *in vitro*, o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* em 5% sobre o grupo contendo 50 fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e observaram uma mortalidade de 84%, em 48 horas.

#### 2.4.4 Citral

O monoterpeno citral é um aldeído composto por um conjunto natural de isômeros como o geranial com formulação (*E*)-3,7-dimetil-2,6-octadienal e o neral (*Z*)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 5) (MATOS et al., 1996). Esse composto está contido na maioria das plantas e frutas cítricas como a *Litsea Cubeba* Pers, cidreira (*Lippia alba*), gengibre (*Zingiber officinale*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (LU et al., 2017; PEIXOTO et al., 2015; WEERAWATANAKORN et al., 2015).

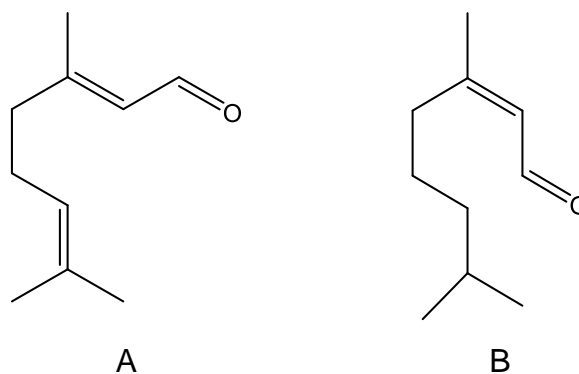


Figura 5 – Fórmula estrutural da molécula citral composta pelos isômeros geranial (A) e neral (B).

FONTE: Imagem do autor.

Estudos conferem ao citral atividades sedativas, miorelaxantes (VALE et al., 2002), além de efeito antiespasmódico sobre o músculo liso (CARVALHO et al., 2018) e antimicrobiano (LU et al., 2017).

Caldas et al. (2016) testaram o efeito do citral sobre fungos oportunistas *Cladosporium oxysporum* e *Cladosporium sphaerospermum* e verificaram que a concentração de 128 µg/mL promove inibição de 50% das espécies fúngicas testadas, evidenciando sua ação fungicida.

Experimentos para avaliação do efeito do citral sobre fêmeas e larvas de *R. (B.) microplus* mostraram que, a concentração letal para 50% das formas larvares é de 7 mg/mL, enquanto para as fêmeas, 29,8 mg/mL, demonstrando seu potencial acaricida (PEIXOTO et al., 2015). Ainda sobre esta mesma espécie de carrapato, foi testado o óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*), contendo citral (23,2% de geranial e 16,7% de neral) em sua composição, sendo observada, a concentração de 13,62%, letal para 90% das larvas do carrapato (de SOUZA CHAGAS et al., 2016).

Jeon e Lee, em 2016, realizaram um experimento usando óleo essencial da fruta de *Litsea cubeba*, que contém em sua composição 64,43% de citral, sobre ácaros de poeira *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* e *Tyrophagus putrescentiae*. Os autores verificaram a concentração letal em 50% da população destas espécies de ácaros em média 1,54, 1,83 e 3,90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente, indicando o citral ser um potencial acaricida.

Análises do efeito do citral também foram realizadas sobre as bactérias *Cronobacter sakazakii*, um patógeno de origem alimentar que gera, em humanos, alta mortalidade em neonatos e lactantes. Esse monoterpene mostrou efeito antimicrobiano na concentração mínima inibitória de 0,27-0,54 mg /mL, indicando um potencial o controle de *C. sakazakii* nos alimentos com a adição do citral (SHI et al., 2016).

## **2.5 Uso de solventes e surfactantes em soluções de teste *in vitro***

A utilização dos agentes solubilizantes nas emulsões água/óleo a fim de serem testadas *in vitro* deve se comportar como excipientes, sendo inertes, usados para melhorar a solubilização e promovendo uma dispersão mais homogênea, assim, propiciar melhor permeabilidade do óleo nos carrapatos (CHAGAS et al., 2003; GONÇALVES et al., 2007; RESENDE et al., 2012).

O preparo das formulações propícias para testes em carrapatos é complexo devido à variada composição química dos óleos e à grande gama de produtos que auxiliam na emulsificação. Esses auxiliam na diminuição das micelas dos óleos em água, promovem uma dispersão mais homogênea e também, uma melhor penetração desses óleos nas camadas da cutícula dos carrapatos, uma vez que a cutícula é composta por substâncias lipídicas, como ceras e colesterol, além das proteínas. Esses solubilizantes, ao mesmo tempo, devem ser inertes, de forma a não atuar na mortalidade dos carrapatos e/ou na eficácia do óleo, devendo ter comportamento de apenas melhorar a penetração e ação dos óleos nos carrapatos (CHAGAS et al., 2002; CHAGAS et al., 2003; GONÇALVES et al., 2007; RESENDE et al., 2012; SONENSHINE, 2014).

Desse modo, alguns agentes solubilizantes são mais utilizados em testes *in vitro* com carrapato, como: o dimetilsulfóxido (DMSO) que é um solvente ou agente

penetrante, que promove o carreamento de substâncias pelas camadas lipídicas e proteicas da pele (ANIGBOGU et al., 1995; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Os surfactantes Tween 20® e 80® possuem categoria funcional de agente emulsificante, solubilizante e surfactante não iônico em emulsões de óleo/água, utilizado em compostos como óleos essenciais ou vitaminas lipossolúveis (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). O éter lauril sulfato tem função de surfactante aniônico, agente emulsificante e possui poder detergente, empregado em formulações farmacêuticas e cosméticas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Outros agentes como acetona, o metanol e o etanol são solubilizantes usados nos testes com substâncias vegetais (GONÇALVES et al., 2007; RAVINDRAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012).

Chagas et al. (2003) testaram em fêmeas de *R. (B.) microplus* os solventes metanol, etanol e acetona, na concentração menor que 75% e observaram que não houve mortalidade. No entanto o DMSO em 25%, provocou mortalidade de 24% dos indivíduos, sendo recomendado seu uso em menor concentração, pois segundo Thiele e Harrison (1968), a concentração adequada para a utilização de um solvente em testes experimentais, deve gerar no máximo 20% de letalidade.

Gonçalves et al. (2007) avaliaram a ação dos solventes acetona, metanol e etanol, em 100%, em teleóginas, e observaram a ocorrência de mortalidade de 100%, 45,3% e 14,2% das fêmeas, nessa ordem. Já em 1%, o DMSO e o Tween 80® causaram a mortalidade de 0% e 5% dos indivíduos, respectivamente.

### 3. REFERÊNCIAS

- 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.
- ALI, A.; PARIZI, L.F.; GUIZZO, M.G.; TIRLONI, L.; SEIXAS, A.; VAZ IDA, S. J.R.; TERMIGNONI, C. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. **Veterinary Parasitology**, v.207, p.107-114, 2015.
- ALVES-BRANCO, F.P.J.; ECHEVARRIA, F.A.M.; SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). **Comunicado técnico EMBRAPA**, v.1, p.1–4, 1983.
- ANIGBOGU, A.N.C.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.; EDWARDS, H.G.M. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v.125, p.265–282, 1995.
- ANUALPEC. Anuário brasileiro da pecuária 2017. Santa Cruz do Sul, **Editora Gazeta Santa Cruz**, 2017. 56p.
- ARNOSTI, A.; BRIENZA, P.D.; FURQUIM, K.C.S.; CHIERICE, G.O; BECHARA, G.H.; CALLIGARIS, I.B.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, New York, v.127, p.575-580, 2011.
- ASANOVA, Z.H.K.; SULEIMENOV, E.M.; ATAZHANOVA, G.A.; DEMBITSKII, A.D.; PAK, R.N.; DAR, A.; ADEKENOV, S.M. Biological activity of 1,8-cineol from levant wormwood. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.37, n.1, p.28-30, 2003.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology**, n.46, v.2, p.446-475, 2008.
- BARATA, L. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.57, n.4, p.4-5, 2005.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H.; PINTER, A. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: ICTTD; Instituto Butantan, 2006. 223p.
- BRASHEARS, M.M.; CHAVES, D.B. The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. **Meat Science**, v.132, p.59-71, 2017.
- BRASIL. 2007. ABIMA, **Resolução nº. 2, de 15 de janeiro de 2007**.



BESTETE, L.R.; PRATISSOLI, D.; QUEIROZ, V.T.; CELESTINO, F.N.; MACHADO, L.C. Toxicidade de óleo de mamona a *Helicoverpa zea* e a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.791-797, 2011.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L.Q.; DA SILVA, S.S.; DOS SANTOS, T.R.; DIONELLO, N.J.; GULIAS-GOMES, C.C.; CARDOSO, F.F. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.208, p.231-237, 2015.

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

BRITO, L.G.; BARBIERI, F.S.; ROCHA, R.B.; OLIVEIRA, M.C.; RIBEIRO, E.S. Evaluation of the Efficacy of Acaricides Used to Control the Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*, in Dairy Herds Raised in the Brazilian Southwestern Amazon. **Veterinary Medicine International**, v.201, n.6, p.2-13, 2011.

CALDAS, C.P.M.; SOUSA, J.P.; PÉREZ, A.L.L.; SANTOS, J.M.C.G.; OLIVEIRA, H.M.B.F.; OLIVEIRA FILHO, A.A.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica *in silico* e *in vitro* do monoterpene Citral. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.14, n.2, p.905-912, 2016.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179-189, 2000.

CAMARGO-MATHIAS, M.I. **Guia Básico de Morfologia Interna de Carrapatos Ixodídeos**. 1ed. São Paulo: Editora UNESP, 2013, v.1, 83-107p.

CANÇADO, P.H.D.; CATTO, J.B.; SOARES, C.O.; MIRANDA, P.A.B.; SOUZA, T.F.; PIRANDA, E.M. Controle parasitário de bovinos de corte em sistemas de integração. In: BUNGENSTAB, D.J. **Sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta: a produção sustentável**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 177-187, 2012.

CARVALHO, P.M.M.; MACÊDO, C.A.F.; RIBEIRO, T.F.; SILVA, A.A.; DA SILVA, R.E.R.; MORAIS, L.P.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R.A.; BARBOSA, R. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. **Biotechnology Reports**, v.17, p.31-34, 2018.

CATTO, J.B. Potencial acaricida de plantas como componente de sistema integrado para o controle de *Rhipicephallus (Boophilus) microplus*. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W. (Ed.). **Carrapatos no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 112-133p.

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

CHAGAS, A.C.S.; FURLONG, J.; NASCIMENTO, C.B. Predation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) tick engorged female by the ant *Pachycondyla striata* (Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae) in pastures. **Bioscience Journal**, v.18, n.2, p.77-81, 2002.

CHAGAS, A.C.S.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; PRATES, H.T.; PASSOS, W.M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.109-114, 2003.

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.5, p.247-253, 2002.

CONVERTI, A.; ALIAKBARIAN, B.; DOMÍNGUEZ, J.M.; BUSTOS VÁZQUEZ, G.; PEREGO, P. Microbial production of biovanillin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.519-530, 2010.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2.ed. Porto Alegre, Agropecuária, 1997. 176p.

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

CUNHA, R.C.; PÉREZ, L.A.A.; LEITE, F.P.L.; PINTO, L.S.; SANTOS, J.A.G.; ANDREOTTI, R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.3, p.254-262, 2012.

DE CASTRO, J.J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v.71, p.77-97, 1997.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; GALAN, M.; FERNANDEZ, C. Anatomy and histology of the female reproductive system of *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE). **Revista de Salud Animal**, v.34, n.1, p.1-10, 2012.

DE SOUZA, A.C.; DE BARROS, L.D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTI, R.; DE SENA, M.C.; RIBEIRO, H. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Parasitology Research**, v.110, p.295–303, 2012.

de SOUZA CHAGAS, A.C.; OLIVEIRA, M.C.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R.C.; BIZZO, H. R.; GAMA, P.E.; CHAVES, F.C. 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.

DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella choleraesuis* Typhi by disrupting the cellular membrane. **Jounal Ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.107-115, 2010.

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.

FARIAS, N.A.R.; GONZALES, J.C.; SAIBRO, J.C. Antibiose e antixenose entre forrageiras e larvas de carrapatos de boi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.12, p.1313-1320, 1986.

FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.182, n.2-4, p.307-318, 2011.

FISCHER, J.; DETHLEFSEN, U. Efficacy of cineole in patients suffering from acute bronchitis: a placebo-controlled double-blind trial. **Cough**, v.219, n.1, p.2-5, 2013.

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.57-71, 1999.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v.8, p.46-61, 1993.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. **Comunicado Técnico 36**, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, p.5, 2003.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?. **A Hora Veterinária**, v.27, n.159, p.26-32, 2007.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.843-847, 2005.

GAUSS, C.L.B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.3, p.467-472, 2002.

GOMES, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias. **Embrapa Campo Grande**, MS, n.31, 1998.

GOMES, A.; KOLLER, W.W.; BARROS, A.T.M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.41, n.8, p.1447-1452, 2011.

GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; ASCOLI, B.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V.L. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.100, p.1267–1270, 2007.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 128p.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995. 79p.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANCADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S.L. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.23, p.150-156, 2014.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, n.125, p.8-10, 2002.

HAZIR, S.; KAYA, P.; STOCK, P.; KESKIN, N. Entomopatogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, v.27, p.181-202, 2003.

HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.163, p.137–143, 2007.

HONER, M.R.; GOMES, A. O manejo integrado de mosca dos chifres, berne e carrapato em gado de corte. **EMBRAPA-CNPGC**, Circular Técnica, Campo Grande, MS, n.22, p.60, 1990.

HÜE, T.; CAUQUIL, L.; FOKOU, J.B.; DONGMO, P.M.; BAKARNGA-VIA, I.; MENUT, C. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum species* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Parasitology Research**, v.114, n.1, p.91-99, 2015.

HSDB Cineole, 2017. Casrn: 470-82-6. (Acesso em 20 Set., 2017) <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~Clxr9s:1.5>>

JEON, Y.J.; LEE, H.S. Chemical composition and acaricidal activities of essential oils of *Litsea cubeba* fruits and *Mentha arvensis* leaves against house dust and stored food mites. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.19, n.7, p.1721-1728, 2016.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.1-10, 2006.

JUERGENS, U.R.; STÖBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. **European Journal of Medecal Research**, v.3, p.508-510, 1998.

KAPPERS, I.F.; AHARONI, A.; VON HERPEN, T.; LUCKERHOFF, L.L.R.; DICKE, M.; BOUWMESTER, H.J. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabodopsis. **Science**, v.309, p.2070–2072, 2005.

KOLLER, W.W.; GOMES, A.; BARROS, A.T.M. Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. **Embrapa Gado de Corte**, p.47, 2009.

KUMAR, P.; SINGH, V.K.; SINGH, D.K. Kinetics of enzyme inhibition by active molluscicidal agents ferulic acid, umbelliferone, eugenol and limonene in the nervous tissue of snail *Lymnaea acuminata*. **Phytotherapy Research**, v.23, p.172-177, 2008.

LOPES, W.D.; CRUZ, B.C.; TEIXEIRA, W.F.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W.G.; BUZZULINI, C.; GOMES, L.V.; FAVERO, F.; SOARES, V.E.; BICHUETTE, M.A.; DE OLIVEIRA, G.P.; DA COSTA, A.J. Efficacy of fipronil (1.0 mg/kg) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* strains resistant to ivermectin (0.63 mg/kg). **Preventive Veterinary Medicine**, v.115, p.88-93, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LU, W.C.; HUANG, D.W.; WANG, C.C.R.; YEH, C.H.; TSAI, J.C.; HUANG, Y.T.; LI, P.H. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, p.1-8, 2017.

MACHADO, F.A.; PIVOTO, F.L.; FERREIRA, M.S.; GREGORIO, F.D.E.V.; VOGEL, F.S.; SANGIONI, L.A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multiresistant tick. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, p.337-342, 2014.

MADBOULY, S.A.; ZHANG, C.; KESSLER, M.R. **Bio-Based Plant Oil Polymers And Composites**. Ed 1. William Andrew, 2016. 218p.

MAGALHÃES, P.J.C.; CRIDDLE, D.N.; TAVARES, R.A.; MELO, E.M. Intestinal myorelaxant and anti-spasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius*, and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, v.12, p.172–177, 1998.

MATOS, F.J.A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil: estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Parte II–Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.77, p.137–141, 1996.

MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., Pirassununga, São Paulo. **Anais...** V SBMA, Pirassununga, São Paulo, 2004.

MENDES, M.C.; LIMA, C.K.P.; NOGUEIRA, A.H.C.; 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 State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p.383- 388, 2011.

MONTEIRO, M.V.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; PALHA, M.D.C.; BRAGA, R.R.; SCHWANKE, K.; TAVARES, S.R.; LAMEIRA, O.A. Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. **Acta Amazonica**, v.41, n.2, p. 233-242, 2011.

NUÑES, J.L.; MUÑOZ COBENAS, M.E.; MOLTEDO, H.L. **Boophilus microplus The Common Cattle Tick**, 1982. 208p.

OLIVEIRA, R.A.; REIS, T.V.; SACRAMENTO, C.K.; DUARTE, L.P.; OLIVEIRA, F.F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.771-775, 2009.

OMOHU, O.J.; OMALE, A.C. Physicochemical Properties and Fatty Acid Composition of Castor Bean *Ricinus communis* L. Seed Oil. **American Journal of Applied and Industrial Chemistry**, v.3, n.1, p. 1-4, 2017.

PARIZI, L.F.; RECK, J. JR.; OLDIGES, D.P.; GUIZZO, M.G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; DE OLIVEIRA, P.L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J.R.; VAZ IDA, S.J.R. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. **Vaccine**, v.30, p.6912-6917, 2012.

PATTNAICK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; BAPAJI, M.; KOLE, C.R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, p.39–46, 1997.

PEIXOTO, M.G.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; BLANK, A.F.; LIMA, A.D.A.S.; MENEZES, T.S.; SANTOS, D.D.E.A.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.; BACCI, L.; ARRIGONI-BLANK, M.D.E.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.

PERRUCCI, S.; FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I.; MACCHIONI, F.; MACCHIONI, G. In vitro and in vivo efficacy of extracts of *Artemisia verlotorum* against *Psoroptes cuniculi*. **Veterinary Record**, v.148, p.814–815, 2001.

PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; CRAVEIRO, A.A.; OLIVEIRA, A.B. Identification of some chemical components of the essential oil from Molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.2, p.193–197, 1998.

QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v.190, p.556-565, 2012.

- RAMOS-LÓPEZ, M.A.; PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G.C.; GUEVARA-FEFER, P.; ZAVALA-SÁNCHEZ, M.A. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.9, p.1359-1365, 2010.
- RAVINDRAN, R.; JULIET, S.; KUMAR, A.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.
- RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'ANGOL, 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, p.128–36, 2014a.
- RECK, J.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, R.O.; SOUZA, U.A.; WEBSTER, A.; LEITE, R.C.; ROMÁRIO, 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**, v.113, n.1, p.59-62, 2014b.
- RESENDE, J.D., DAEMON, E., MONTEIRO, C.M., MATURANO, R., PRATA, M.C., FERREIRA RODRIGUES, A.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, p.139–142, 2012.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.752-759.
- RODRIGUES, D.S.; LEITE, R.C. Impacto econômico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimativa de redução de produção de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.5, p.1570-1572, 2013.
- RONDELLI, V.M.; PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R.A.; MARQUES, E.J.; STURM, G.M.; TIBURCIO, M.O. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça das crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.2, p.212-214, 2011.
- 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 metabolite with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v.30, n.238, p.66-76, 2017.
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical Press, 2009. 917p.

SAITO, K.C.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; NUNES, E.T.; DENARDI, S.E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the tick *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.129, p.299–311, 2005.

SAMPIERI, B.R.; ARNOSTI, A.; NUNES, P.H.; FURQUIM, K.C.S.; CHIERICE, G.O.; MATHIAS, M.I.C. 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.

SAMPIERI, B.R.; FURQUIM, K.C.S.; NUNES, P.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (*Ricinus communis*): An ultrastructural overview. **Parasitology Research**, v.112, p.611–619, 2013.

SANTOS, A.V.; OLIVEIRA, R.A.; ALBUQUERQUE, G.R. Efeito *in vitro* do extrato de nim (*azadirachta indica*) e óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.34, n.2, p.111-115, 2012.

SANTOS, F A.; RAO, V.S.N. 1,8-Cineole, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v.46, n.2, p.331–337, 2001.

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

SHI, C.; SONG, K.; ZHANG, X.; SUN, Y.; SUI, Y.; CHEN, Y.; JIA, Z.; SUN, H.; SUN, Z.; XIA, X. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. **PLoS One**, v.11, n.7, 2016.

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINI, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**, v.62, n.3, p.140-143, 2012.

SINGH, N.K.; JYOTI; HAQUE, M.; SINGH, H.; RATH, S.S.; GHOSH, S. A comparative study on cypermethrin resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Hyalomma anatolicum* from Punjab (India). **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.5, p.90-94, 2014.

SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M. **Biology of ticks**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2014. 540p.

STONE, B.F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. **Australian Veterinary Journal**, v.48, p.345-350, 1972.



THIELE, G.F.; HARRISON, R.A. Selection of solvents for topical application acaricide testing. **Entomologia experimentalis et applicata**, v.11, p.389–396, 1968.

VALE, T.G.; FURTADO, C.E.; SANTOS JR, J.G., VIANA, G.S. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v.9, p.709–714, 2002.

VALENTE, P.P.; AMORIM, J.M.; CASTILHO, R.O.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, M.F. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae). **Parasitology Research**, v.113, p.417-423, 2014.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA Strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.94, p.201-206, 2004.

VEIGA, L.P.; SOUZA, A.P.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NUNES, A. P.; CARDOSO, H. M. Resistance to cypermethrin and amitraz in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on the Santa Catarina Plateau, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, p.133-136, 2012.

VERÍSSIMO, C.J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v.11, n.1, p.14–23, 2013.

VILLAR DEL FRESNO, A. **Farmacognosia general**. 2 ed. Madrid [Espanha]: Sintesis, 2010. 335p.

VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, v.22, p.540–544, 2007.

WEERAWATANAKORN, M.; WU, J.C.; PAN, M.H.; HO, C.T. Reactivity and stability of selected flavor compounds. **Journal Of Food And Drug Analysis**, v.23, p.176-190, 2015.

WIESBROOK, M.L. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides?. **Illinois Pesticide Review**, v.17, n.3, p.1-3, 2004.

## CAPÍTULO 1

### **Efeito do 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo de mamona (*Ricinus communis*) na reprodução de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)**

Nayara Camatta Campos<sup>a</sup>, Vagner Tebaldi de Queiroz<sup>a,c\*</sup>, Erika Takagi Nunes<sup>b</sup>, Adilson Vidal Costa<sup>c</sup>, Júlia Delpupo Coelho<sup>d</sup>, Leonardo Oliveira Trivilin<sup>a</sup>, Davi Cardoso Aguiar de Melo<sup>c</sup>, Isabella Vilhena Freitas Martins<sup>a</sup>

a) Universidade Federal do Espírito Santo/UFES, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Alto Universitário; s/n 29500-000, Alegre; ncamattavet@gmail.com; vagnertq@gmail.com; leotrivilin@gmail.com; ivfmartins@gmail.com

b) Universidade Federal do Espírito Santo /UFES, Departamento de Biologia, Alto Universitário; s/n 29500-000, Alegre, ES, Brasil; erikatnunes@gmail.com

c) Universidade Federal do Espírito Santo /UFES, Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Alto Universitário; s/n 29500-000, Alegre, ES, Brasil; avcosta@hotmail.com; dcam21@hotmail.com

d) Universidade Federal do Espírito Santo /UFES, Graduanda em Medicina Veterinária, Alto Universitário; s/n 29500-000, Alegre, ES, Brasil; juliadelpupoc@gmail.com

27 **\*Corresponding author:** Universidade Federal do Espírito Santo /UFES,  
28 Departamento de Química e Física, Alto Universitário; s/n 29500-000, Alegre, ES,  
29 Brasil; vagnertq@gmail.com.

30

### 31 **RESUMO**

32 O desenvolvimento de resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a  
33 acaricidas comerciais vem sendo relatado desde a década de 40. Sendo assim,  
34 trabalhos de pesquisas com óleos essenciais e fixos têm sido desenvolvidos visando  
35 encontrar alternativas ao controle químico desta espécie de carrapato. O objetivo do  
36 trabalho foi avaliar o efeito de formulações contendo 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo  
37 de mamona (*Ricinus communis*) sobre a reprodução de *R. (B.) microplus*. Grupos  
38 contendo 10 parasitas foram tratados com emulsões desses óleos em DMSO  
39 associado a Tween 80® ou éter lauril sulfato. A eficácia carrapaticida foi avaliada pelo  
40 teste de imersão de fêmeas. Para a análise dos efeitos teciduais, as fêmeas tiveram  
41 os ovários dissecados, fixados e submetidos à rotina histológica. O 1,8-cineol, citral e  
42 eugenol 1% (m/v) e óleo de mamona em 0,3% (m/v) apresentaram valores de eficácia  
43 de 29%; 11,6% e 9,8%, respectivamente. O efeito dos solubilizantes (DMSO  
44 associado com Tween 80® ou éter lauril sulfato) foi avaliado para o 1,8-cineol (10%  
45 (m/v)) e óleo de mamona em 0,3% (m/v), de forma isolada e associada. Os valores de  
46 eficácia observados para o 1,8-cineol isolado (92,8%) e associado ao óleo de mamona  
47 (94,1%) foram superiores quando as emulsões foram preparadas utilizando o éter  
48 lauril sulfato como solubilizante. Alterações morfológicas nos ovócitos em diferentes  
49 estágios de desenvolvimento (I-V), bem como nas células do pedicelo, foram  
50 observadas tanto nas fêmeas tratadas com óleo de mamona (0,3% (m/v)) como  
51 naquelas com 1,8-cineol (10% (m/v)), sendo verificados efeitos mais intensos quando

52 ambos estavam em associação. A formulação de 1,8-cineol (10% (m/v)) associada ao  
53 óleo de mamona (0,3% (m/v)) em éter lauril sulfato (2% (m/v)) demonstrou-se  
54 promissora no controle reprodutivo de *R. (B.) microplus*. Espera-se que os resultados  
55 obtidos possam nortear projetos futuros, em consonância com o bem-estar animal,  
56 visando o desenvolvimento de alternativas ao controle de carrapatos com produtos  
57 comerciais.

58

59 Palavras-chave: carrapato do boi, controle alternativo, fenilpropanoide,  
60 monoterpenos, óleo fixo, ovário.

61

## 62 **ABSTRACT**

63 The development of resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to commercial  
64 acaricidal has been reported since the 40's. Therefore, researches with essential and  
65 fixed oils have been developed aiming to find alternatives to the chemical control of  
66 this species of tick. The objective of this work was to evaluate the effect of formulations  
67 containing 1,8-cineole, citral, eugenol and castor oil (*Ricinus communis*) on the  
68 reproduction of *R. (B.) microplus*. Groups containing 10 parasites were treated with  
69 emulsions of these oils in DMSO associated with Tween 80® or lauryl sulfate ether.  
70 Acaricidal efficacy was assessed by the females immersion test. For the analysis of  
71 the tissue effects, the females had the ovaries dissected, fixed and submitted to the  
72 histological routine. The 1,8-cineole citral and eugenol 1% (m / v) and castor oil 0,3%  
73 (m / v) presented efficacy values of 29%; 11.6% and 9.8%, respectively. The effect of  
74 the solubilizes (DMSO associated with Tween 80® or lauryl sulfate ether) was  
75 evaluated for 1,8-cineol (10% (m / v)) and 0,3% (m / v) castor oil isolated and  
76 associated form. The efficacy values for 1,8-cineole isolated (92,8%) and castor oil

77 (94,1%) were higher when the emulsions were prepared using the lauryl sulfate ether  
78 as the solubilizes. Morphological changes in oocytes at different stages of  
79 development (IV), as well as in pedicel cells, were observed in both castor oil (0,3%  
80 (m / v)) and 1,8-cineole 10% (m / v)), with more intense effects verified when both were  
81 in association. The solution of 1,8-cineole (10% (m / v)) associated with castor oil (0,3%  
82 (m / v)) in lauryl sulfate ether (2% (m / v)) was shown to be promising in the reproductive  
83 control of *R. (B.) microplus*. It is hoped that the results obtained could guide future  
84 projects, in line with animal welfare, aiming at the development of alternatives to the  
85 control of ticks with commercial products.

86

87 Keywords: alternative control, cattle-tick, fixed oil, monoterpenes, ovary,  
88 phenylpropanoide.

89

90

#### 91 **4. INTRODUÇÃO**

92

93 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um animal hematófago que parasita  
94 principalmente os bovinos que habitam as regiões de clima tropical e subtropical do  
95 mundo. Esta espécie de carrapato é responsável pela transmissão de agentes  
96 patogênicos como a *Babesia* sp. e *Anaplasma* sp., por ocasionar danos ao couro,  
97 quadros anêmicos por conta da perda sanguínea em bovinos, além de propiciar a  
98 diminuição na produção de carne e leite (Da Silva et al., 2013; Grisi et al., 2014; Reck  
99 et al., 2014).

100 O controle de *R. (B.) microplus* tem se baseado no uso de acaricidas químicos,  
101 porém, o desenvolvimento de resistência decorrente do uso não racional desses

102 produtos vem sendo relatado desde a década de 40 (Abbas et al., 2014). Além disso,  
103 os acaricidas químicos podem gerar toxicidade ao meio ambiente, a humanos e  
104 resíduos em produtos de origem animal, como a carne e o leite (Dallegrave et al.,  
105 2018).

106 No intuito de minimizar esses problemas, trabalhos de pesquisas com óleos  
107 essenciais e fixos têm sido desenvolvidos visando encontrar alternativas ao controle  
108 químico desta espécie de carrapato (Clemente et al., 2007; Graf et al., 2004; Lázaro  
109 et al., 2013; Santos et al., 2012). O 1,8-cineol ou eucaliptol, um monoterpene presente  
110 nos óleos essenciais de plantas do gênero *Eucalyptus* spp. (Bakkali et al., 2008;  
111 Chagas et al., 2002; Vuuren and Viljoen, 2007), apresenta efeito acaricida *in vitro*  
112 sobre larvas de *R. (B.) microplus* (Chagas et al., 2002; Prates et al., 1998), ação  
113 antimicrobiana, antifúngica (Pattnaik et al., 1997), analgésica (Asanova et al., 2003),  
114 antiespasmódica (Magalhães et al., 1998), anti-inflamatória (Juergens et al., 2003).

115 de Souza Chagas et al. (2016) avaliaram o efeito do óleo essencial de gengibre  
116 (*Zingiber officinale*) contendo citral (23,2% de geranial e 16,7% de neral) sobre *R. (B.)*  
117 *microplus*. Este óleo essencial foi testado a 13,62% e propiciou 90% de mortalidade  
118 nas larvas desta espécie de carrapato. O óleo essencial de cravo (*Syzygium*  
119 *aromaticum*) contendo eugenol como constituinte majoritário demonstrou eficácia de  
120 99,42% e taxa de mortalidade de 84% sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*  
121 (Santos et al., 2012).

122 O óleo de mamona é um óleo fixo obtido a partir da semente de *Ricinus*  
123 *communis* (Omohu and Omale, 2017; Rowe et al., 2009). Em sua ação sobre fêmeas  
124 de *Rhipicephalus sanguineus* foram observadas alterações na morfologia ovariana,  
125 indicando o efeito prejudicial do óleo de mamona à reprodução desta espécie de  
126 carrapato (Arnosti et al., 2011a; Sampieri et al., 2013a, 2013b, 2012). A avaliação

127 histológica do tecido ovariano dos carrapatos possibilita verificar a ação dos óleos e  
128 evidenciar os efeitos destes na vitelogênese do ectoparasita, bem como o seu  
129 potencial citotóxico (Arnosti et al., 2011a; Vendramini et al., 2012).

130 O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de formulações contendo o  
131 1,8-cineol, citral, eugenol ou óleo de mamona (*Ricinus communis*) sobre a reprodução  
132 de *R. (B.) microplus*.

133

## 134 **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

135

### 136 5.1. Produtos químicos e material vegetal

137

138 Os terpenos 1,8-cineol e citral (Sigma-Aldrich), o fenilpropanoide eugenol e o  
139 éter lauril sulfato (Vetec Química Fina LTDA), DMSO (Cromoline Química Fina LTDA)  
140 e Tween 80<sup>®</sup> (Dinâmica Química Contemporânea LTDA) foram adquiridos  
141 comercialmente. As sementes da mamona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae)  
142 foram adquiridas em propriedade rural situada em Dores do Rio Preto (20° 42' 30" S  
143 e 41° 50' 09" W), ES, Brasil. As sementes trituradas foram transferidas para recipiente  
144 contendo água em ebulição. O sistema permaneceu sob agitação manual (2h) e o  
145 óleo obtido (sobrenadante) foi filtrado em gaze e armazenado em recipiente de vidro  
146 de cor âmbar hermeticamente fechado, identificado e mantido em ambiente  
147 climatizado (25 ± 2 °C).

148

### 149 5.2. Caracterização química

150

151 Os compostos comerciais 1,8-cineol, citral e eugenol foram analisados em

152 cromatógrafo a gás (CG) acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC;  
153 Shimadzu; CG-2010 Plus). Uma alíquota de 10 mg de cada composto foi diluída em  
154 1mL de diclorometano e a partir desta solução foi utilizado 1µL para a injeção nas  
155 seguintes condições: Coluna capilar de 30m e 0,25mm de diâmetro interno (Rtx-5MS),  
156 temperatura da coluna de 60 °C a 240 °C (3 °C min.<sup>-1</sup>) com o N<sub>2</sub> como gás de arraste;  
157 temperatura do injetor a 240 °C e do detector a 250 °C. Na análise realizada em CG  
158 acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM; Shimadzu; QP-PLUS-2010), as  
159 condições para a análise foram as mesmas descritas anteriormente, excetuando-se:  
160 as temperaturas do injetor (240 °C) e do detector (300 °C) e He como gás de arraste  
161 (Costa et al., 2015). Os compostos foram identificados por comparações com as  
162 informações disponíveis no banco de dados do equipamento (Biblioteca Willey7), com  
163 a literatura e pelo índice de Kovats (Adams, 2007).

164

### 165 5.3. Testes “*in vitro*”

166

167 As fêmeas adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram procedentes  
168 de bovinos da área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES),  
169 Alegre-ES, e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica-  
170 RJ. Em ambos os locais, os bovinos hospedeiros se encontravam sem tratamento  
171 prévio com acaricida químico, por um período de, no mínimo, 30 dias. Após a coleta,  
172 os carrapatos foram acondicionados em potes plásticos com algodão umedecido e  
173 tampa telada, para manutenção da umidade e ventilação adequadas. O presente  
174 estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso em animais- CEUA da  
175 Universidade do Espírito Santo (protocolo número 30/2017).

176



### 177 5.3.1. Teste de imersão de fêmeas

178

179 Os testes de imersão foram realizados conforme a metodologia de Drummond  
180 et al. (1971, 1973), com modificações. As teleóginas de *R. (B.) microplus* foram  
181 banhadas em água autoclavada, secas e distribuídas em grupos de 10 indivíduos  
182 homogêneos em relação ao peso, sendo cada teleóquina considerada uma repetição.

183 No teste de sensibilidade dos carrapatos, os solubilizantes DMSO e Tween 80®  
184 foram avaliados isolados ou em associação em valores de concentração variando  
185 entre 1% e 5% (m/v), e o éter lauril sulfato entre 2 e 7,5% (m/v). De acordo com Thiele  
186 e Harrison(1968), o limite máximo aceitável para uso de solubilizantes em testes  
187 experimentais é 20% de letalidade. Os solubilizantes avaliados proporcionaram índice  
188 de letalidade inferior a 10% (dados não apresentados).

189

#### 190 Experimento 1 – Efeito de compostos voláteis e óleo fixo

191

192 O efeito dos compostos 1,8-cineol, citral e eugenol em 1% (m/v) e do óleo de  
193 mamona em 0,3% (m/v) solubilizados em DMSO em 2% (v/v) e Tween 80® em 0,2%  
194 (m/v) foi avaliado sobre a reprodução de *R. (B.) microplus*. Em função dos resultados  
195 encontrados, os compostos que apresentaram maior valor de eficácia foram avaliados  
196 de forma isolada ou em associação sobre as fêmeas da mesma espécie.

197

198

199

200

201 Experimento 2 – Efeito dos compostos isolados ou associados e do tipo de  
202 solubilizante

203

204 O composto 1,8-cineol foi avaliado de forma isolada ou associada ao óleo de  
205 mamona, em diferentes solubilizantes (Tabela 1).

206 Em ambos os experimentos, as fêmeas foram imersas (5 min.) e dispostas em  
207 papel toalha para secagem à temperatura ambiente. Após este período, cada fêmea  
208 foi pesada, identificada e posicionada em decúbito dorsal nas placas de Petri, e  
209 mantidas em estufa climatizada (BOD), a 27 °C e umidade relativa de 80%, por 15  
210 dias para a oviposição.

211 A massa de ovos de cada fêmea foi pesada e acondicionada em seringa (3 mL)  
212 adaptada com algodão úmido, em BOD (27 °C e 80% UR), por mais 30 dias, para  
213 avaliação da porcentagem de eclosão.

214

215 Tabela 1. Formulações contendo 1,8- cineol associado ou não ao óleo de mamona  
216 (*Ricinus communis*) utilizadas no teste de eficácia contra *R. (B.) microplus*.

Composição		
<b>G1</b>		Água autoclavada
<b>G2</b>	DMSO 5% (v/v) e <sup>1</sup> T80 1% (m/v)	DMSO e <sup>1</sup> T80
<b>G3</b>		1,8-cineol 10% (m/v)
<b>G4</b>		<sup>2</sup> OM 0,3% (m/v)
<b>G5</b>		1,8-cineol 10% (m/v) e <sup>2</sup> OM 0,3% (m/v)
<b>G6</b>		<sup>3</sup> ELS
<b>G7</b>	<sup>3</sup> ELS 2% (m/v)	1,8-cineol 10% (m/v)
<b>G8</b>		<sup>2</sup> OM 0,3% (m/v)
<b>G9</b>		1,8-cineol 10% (m/v) + <sup>2</sup> OM 0,3% (m/v)

217 <sup>1</sup>Tween 80®; <sup>2</sup>Óleo de mamona; <sup>3</sup>Éter lauril sulfato.

218 Foram calculadas a estimativa da reprodução (ER) e a eficácia do produto,  
219 utilizando as seguintes fórmulas:

$$220 \quad ER = \frac{\text{Peso dos ovos (g)}}{\text{Peso da fêmea (g)}} \times \% \text{ de eclosão} \times 20000$$

221 \*20000 corresponde ao número de larvas em 1 g de ovos

$$222 \quad \% \text{ Eficácia do Produto} = \frac{(\text{ER Controle} - \text{ER Tratado})}{\text{ER Controle}} \times 100$$

223

### 224 5.3.2. Análise histológica

225

226 Cada grupo de seis fêmeas semi-ingurgitadas, com pesos homogêneos, foi  
227 imergido em 10 mL das seguintes formulações: água autoclavada (G1), éter lauril  
228 sulfato em 2% (m/v) (G6), 1,8-cineol em 10% (m/v) (G7), óleo de mamona em 0,3%  
229 (m/v) (G8) e 1,8-cineol em 10% (m/v) associado a OM em 0,3% (m/v) (G9) (Tabela 1).  
230 A imersão foi realizada por cinco minutos em intervalo de 12 horas, por dois dias. A  
231 seguir, as fêmeas foram dispostas em papel toalha para secarem e encaminhadas à  
232 estufa BOD, a 27 °C, e UR 80%.

233 Após 12 horas da última imersão, os carrapatos foram dissecados com o  
234 auxílio de estereomicroscópio, pinça de ponta fina e microtesoura, para a retirada dos  
235 ovários os quais foram fixados em formol 10% tamponado.

236 A seguir, a desidratação foi realizada em banhos crescentes de álcool etílico  
237 70, 80, 90 e 95%, por 30 minutos cada, sendo, posteriormente, o material mantido em  
238 resina de embebição, por um mínimo de 24 horas, a 4°C. A inclusão foi feita em  
239 historesina Leica com catalisador e, após 48 horas em estufa a 37°C, os blocos  
240 contendo o material foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145. Os cortes de  
241 5µm, em lâminas, foram corados com hematoxilina, por 5 minutos, e eosina por 10

242 minutos de acordo com Junqueira e Junqueira (1983).

243 As lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá, analisadas e  
244 fotodocumentadas sob microscópio. A captura da imagem foi realizada com o  
245 programa LEICA LAS EZ 3.0.0: Leica Microsystems, com calibração apropriada para  
246 as objetivas utilizadas.

247

#### 248 5.4. Análise estatística

249

250 O experimento foi desenvolvido com distribuição aleatória e para a análise foi  
251 utilizado o programa BioEstat 5.0. A normalidade das variáveis peso das fêmeas, peso  
252 dos ovos e porcentagem de eclosão foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. A  
253 variável peso das fêmeas apresentou distribuição normal, sendo usado teste ANOVA  
254 seguido pelo teste *pos hoc* de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Para as variáveis pesos dos ovos e  
255 porcentagem de eclosão, que se distribuíram de forma não paramétrica, foram  
256 utilizados as medianas e os desvios interquartilicos, seguidos pelos testes de *Kruskal-*  
257 *Wallis* e *Student-Newman-Keuls* ( $p < 0,05$ ).

258

## 259 6. RESULTADOS

260

### 261 6.1. Caracterização química

262

263 As informações referentes aos compostos químicos presentes nos produtos  
264 comerciais se encontram na tabela 2.

265

266

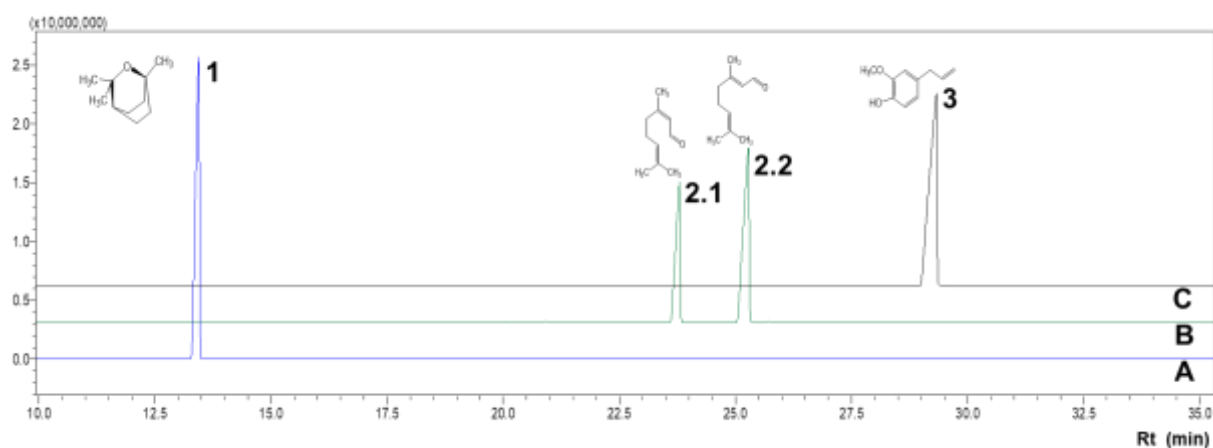
267 Tabela 2. Valores do tempo de retenção (Tr), índice de Kovats calculado (IKc) e  
 268 tabelado (IKt) e porcentagem de área (A%) para os compostos 1,8-cineol, citral e  
 269 eugenol.

Composto identificado	Tr (min.)	IKc	IKt	Área (%)
1,8-cineol	13,44	1030	1033	100,0
Neral	23,79	1241	1240	38,7
Geranial	25,28	1272	1270	61,3
Eugenol	29,33	1360	1356	100,0

270

271 O monoterpeneo 1,8 cineol (Tr = 13,44 min.) e o fenilpropanoide eugenol (Tr =  
 272 29,33 min.) apresentam-se como picos únicos correspondendo a 100% da área total  
 273 do cromatograma. O citral apresenta-se como uma mistura de isômeros, o neral (Tr =  
 274 23,79 min.) e o geranial (Tr = 25,28 min.) com valores de área relativa de 38,7% e  
 275 61,3%, respectivamente. Os picos referentes a estes compostos encontram-se  
 276 representados no cromatograma abaixo (Figura 1).

277



278

279 Figura 6. Cromatograma dos produtos comerciais 1,8 cineol (1A), citral (neral - 2.1B e  
 280 geranial – 2.2B) e eugenol (3C).

281 6.2. Atividade acaricida *in vitro* dos compostos voláteis e do óleo fixo

282

283 Não houve diferença significativa entre o peso das fêmeas e o dos ovos entre  
 284 as formulações avaliadas na tabela 3. A taxa de eclosão dos grupos 1,8-cineol (1%  
 285 (m/v)) e óleo de mamona (0,3% (m/v)) diferiu significativamente daquela observada  
 286 no grupo da água autoclavada e dos solubilizantes DMSO e Tween 80® isolados. As  
 287 maiores taxas de eficácia foram encontradas nos testes com o 1,8-cineol e óleo de  
 288 mamona, com 29 e 30,2%, respectivamente, sendo assim, selecionados para o  
 289 próximo experimento.

290

291 Tabela 3. Efeito dos compostos 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo de mamona sobre o  
 292 peso das fêmeas (g), peso dos ovos (g) e porcentagem de eclosão (%) dos ovos de  
 293 *R. (B.) microplus*.

Composição	Peso das fêmeas(g) <sup>1</sup>	Peso dos ovos (g) <sup>2</sup>	eclosão <sup>2</sup> (%)	eficácia (%)
Água autoclavada	0,252±0,03 <sup>a</sup>	0,128±0,03 <sup>a</sup>	100±5 <sup>a</sup>	0
DMSO + <sup>3</sup> T80	0,235±0,03 <sup>a</sup>	0,128±0,01 <sup>a</sup>	98,7±1 <sup>a c</sup>	0
1,8-cineol 1% (m/v)	0,229±0,02 <sup>a</sup>	0,119±0,02 <sup>a</sup>	91,7±70 <sup>b d</sup>	29
Citral 1% (m/v)	0,237±0,03 <sup>a</sup>	0,121± 0,01 <sup>a</sup>	97±1 <sup>a d</sup>	11,6
Eugenol 1% (m/v)	0,237±0,02 <sup>a</sup>	0,105±0,03 <sup>a</sup>	97,2±3,9 <sup>a c</sup>	9,8
<sup>4</sup> OM 0,3% (m/v)	0,246±0,05 <sup>a</sup>	0,116±0,05 <sup>a</sup>	77,5±31,2 <sup>b d</sup>	30,2

294 <sup>1</sup>médias e desvio padrão; <sup>2</sup>medianas e desvio interquartilicos; <sup>3</sup>Tween 80®; <sup>4</sup>óleo de  
 295 mamona; Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente  
 296 (p>0,05).

297

298

299

300

301 6.3. Atividade acaricida *in vitro* do 1,8-cineol associado ou não ao óleo de mamona

302

303 Não houve diferença significativa na ovipostura das fêmeas expostas às  
 304 formulações (Tabela 1) contendo 1,8-cineol em 10% (m/v) (G3), óleo de mamona em  
 305 0,3% (m/v) (G4) e 1,8-cineol em 10% (m/v) associado a OM em 0,3% (m/v) (G5)  
 306 solubilizados em DMSO e <sup>1</sup>T80 quando comparados com água autoclavada (G1).  
 307 Quando o solubilizante utilizado foi o éter lauril sulfato (ELS) observou-se diferença  
 308 significativa no peso dos ovos das fêmeas expostas às formulações (Tabela 1) de 1,8-  
 309 cineol em 10% (m/v) (G7) e 1,8-cineol em 10% (m/v) associado a OM 0,3% (m/v) (G9)  
 310 quando comparado às formulações água autoclavada (G1) e éter lauril sulfato em 2%  
 311 (m/v) (G6) (Tabela 4).

312

313 Tabela 4. Efeito do 1,8-cineol e do óleo de mamona solubilizados em DMSO e Tween  
 314 80<sup>®</sup> ou éter lauril sulfato sobre o peso dos ovos, porcentagem de eclosão e  
 315 porcentagem de eficácia em fêmeas de *R. (B.) microplus*.

	Composição	Peso dos ovos (g)	Eclosão (%)	Eficácia (%)
	Água autoclavada	0,129±0,05 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	0
DMSO 5% (v/v) T80 1% (m/v)	DMSO + <sup>1</sup> T80	0,132±0,05 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a c</sup>	0
	<sup>3</sup> OM 0,3% (m/v)	0,097±0,05 <sup>a</sup>	80±20 <sup>b d e</sup>	31,7
	1,8-cineol 10%(m/v)	0,096±0,06 <sup>a</sup>	35±37,5 <sup>b d e g</sup>	73,4
	1,8-cineol 10% + <sup>3</sup> OM 0,3% (m/v)	0,122±0,06 <sup>a</sup>	45±17,5 <sup>b d e g</sup>	55,7
<sup>2</sup> ELS 2% (m/v)	<sup>2</sup> ELS (m/v)	0,118±0,02 <sup>a c</sup>	100±0 <sup>a c</sup>	0
	<sup>3</sup> OM 0,3% (m/v)	0,119±0,05 <sup>a c e</sup>	65±37,5 <sup>b d e</sup>	36,6
	1,8-cineol 10% (m/v)	0±0,03 <sup>b d f g</sup>	0±0 <sup>b d e g</sup>	92,8
	1,8-cineol 10% + <sup>3</sup> OM 0,3% (m/v)	0±0 <sup>b d f g</sup>	0±0 <sup>b d e g</sup>	94,1

316 <sup>1</sup> Tween 80<sup>®</sup>; <sup>2</sup> Éter lauril sulfato; <sup>3</sup>Óleos de mamona; peso dos ovos e % de eclosão composta  
 317 por medianas e desvio interquartilico; Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não  
 318 diferem estatisticamente (p>0,05).

319

320

321 Para ambos os solubilizantes utilizados, o valor da taxa de eclosão observado  
322 quando as fêmeas foram expostas às formulações contendo 1,8-cineol em 10% (m/v),  
323 ao óleo de mamona em 0,3% (m/v) e ambos os associados foi estatisticamente  
324 diferente dos valores observados para os grupos controle água autoclavada, DMSO  
325 5% (m/v) e Tween 80® 1% e éter lauril sulfato em 2% (m/v) (Tabela 4).

326 Os maiores valores de eficácia foram observados para as formulações (Tabela  
327 1) de 1,8-cineol em 10% (m/v) (G7) e 1,8-cineol 10% (m/v) associado a OM 0,3% (m/v)  
328 (G9). Os valores observados para as formulações G7 e G9 foram, respectivamente,  
329 92,8% e 94,1% (Tabela 4). O efeito dessas formulações em relação à postura de ovos  
330 e à taxa de eclosão não apresentou diferença estatística entre si (Tabela 4).

331 Considerando que a maior variação no peso dos ovos, na taxa de eclosão e na  
332 porcentagem de eficácia foi observada para os casos em que as formulações foram  
333 preparadas utilizando o éter lauril sulfato, a análise histológica dos ovários foi  
334 realizada com exposição das fêmeas às formulações água autoclavada (G1), éter  
335 lauril sulfato em 2% (m/v) (G6), 1,8-cineol em 10% (m/v) (G7), óleo de mamona em  
336 0,3% (m/v) (G8) e 1,8-cineol 10% (m/v) associado a OM 0,3% (m/v) (G9) (Tabela 1).

337

#### 338 6.4. Análise histológica

339

##### 340 6.4.1. Água autoclavada (G1)

341

342 A morfologia dos ovários encontrada nas fêmeas de *R. (B.) microplus*  
343 submetidas à água autoclavada foi como aquela apresentada por Saito et al. (2005),  
344 sendo as células germinativas, em seus vários estágios de desenvolvimento,  
345 observadas presas à parede do órgão pelas células do pedicelo (Figura 7). Os



346 ovócitos I, pequenos e ovoides, apresentaram vesícula germinativa central e nucléolo  
347 preservado, citoplasma agranular e envolto por uma fina membrana plasmática  
348 (Figura 7 A). Os ovócitos II, mais elipsoides, foram vistos com a vesícula germinativa  
349 menos centralmente localizada e, no citoplasma, o início da deposição de  
350 microgrânulos de vitelo, principalmente na região perinuclear (Figura 7 B). Já os  
351 ovócitos III, maiores que os II, apresentaram-se arredondados, com pequenos  
352 grânulos dispostos na região central citoplasmática e com vesícula germinativa  
353 periférica (Figura 7 B). Nesse estágio, verifica-se a deposição de córion ao redor da  
354 membrana plasmática. O ovócito IV é uma célula grande e arredondada, seu  
355 citoplasma é preenchido por muitos grânulos de vitelo, sendo os maiores mais  
356 periféricamente localizados, e de forma que a vesícula germinativa nem sempre é  
357 notada; apresenta o córion mais espesso (Figura 7 C). Os ovócitos V são as células  
358 germinativas mais desenvolvidas, possuindo citoplasma repleto de grandes grânulos  
359 de forma que a vesícula germinativa não pode ser mais observada (Figura 7 D).

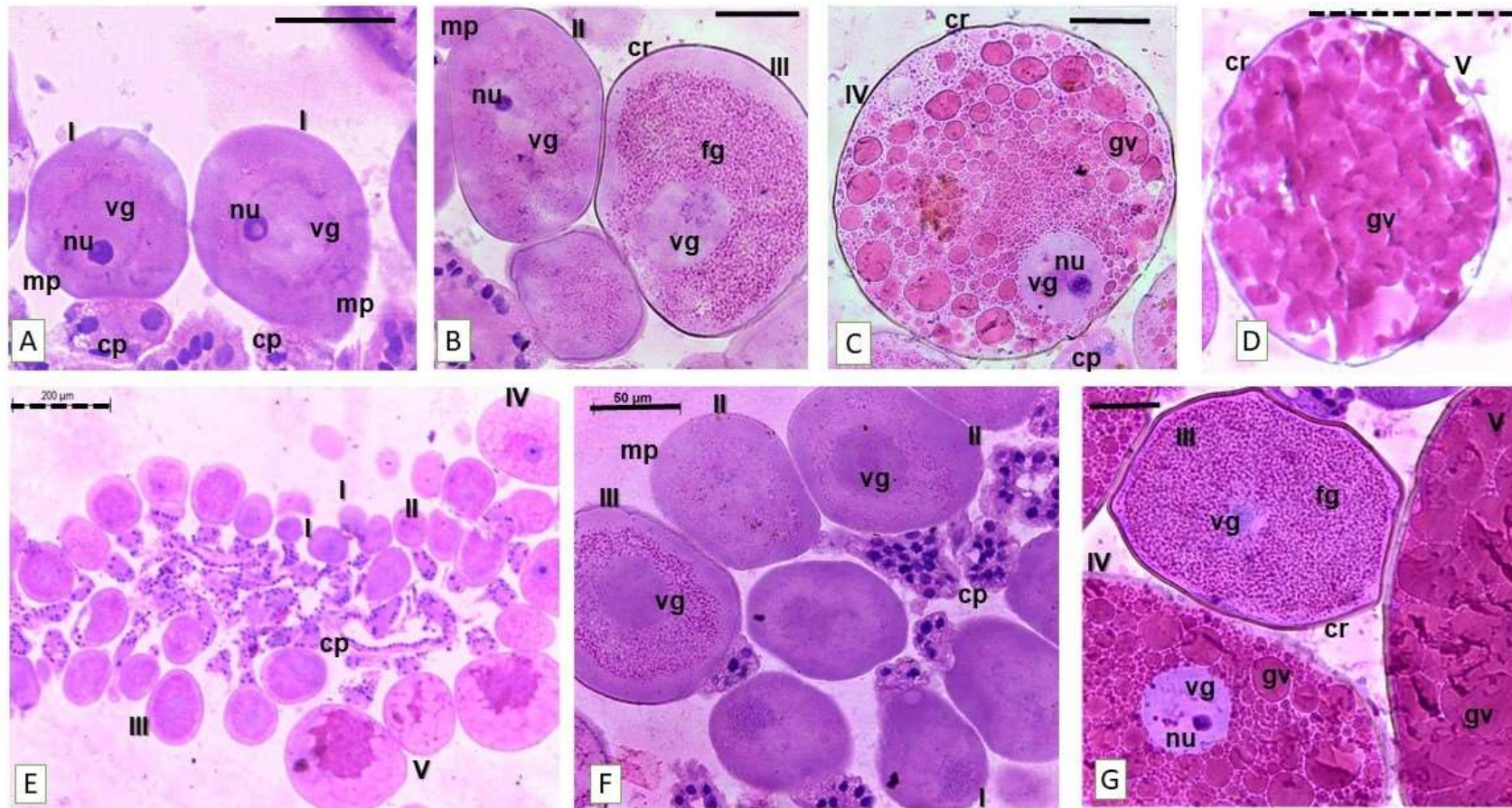
360

#### 361 6.4.2. Éter lauril sulfato em 2% (m/v) (G6)

362

363 As fêmeas expostas ao éter lauril sulfato em 2% (m/v) mostraram  
364 características ovarianas semelhantes às submetidas à água autoclavada  
365 (Figura 7 E-G).

366



367  
 368  
 369 Figura 7- Secção histológica dos ovários de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **A-D:** Fêmeas submetidas à água autoclavada. **E-**  
 370 **G.** Fêmeas submetidas ao éter lauril sulfato em 2%. Observe a morfologia preservada dos ovócitos I, II, III, IV e V. vg- vesícula  
 371 germinativa, cr- córion, gv- grânulo de vitelo, nu- nucléolo, fg- fina granulação, mp- membrana plasmática, cp- célula do pedicelo, vc-  
 372 vacúolos. Barras: A- C,F,G= 50 μm, D,E= 200 μm. Coloração: hematoxilina e eosina (HE).

373 6.4.3. Óleo de mamona em 0,3% (m/v) (G8)

374

375 De maneira geral, nos ovários das fêmeas tratadas com óleo de mamona em  
376 0,3% (m/v), não foram observadas grandes alterações no ovócito I quando comparado  
377 ao grupo controle (Figura 8 H), exceto raras células já com vacuolização no citoplasma  
378 e dilatação do núcleo (Figura 8 J). Alguns ovócitos II, além de alguns vacúolos,  
379 apresentaram vesícula germinativa disforme e fragmentação ou ausência do nucléolo  
380 (Figuras 8 H, J, K).

381 Alguns ovócitos III também apresentaram irregularidades nos limites celulares,  
382 regiões citoplasmáticas vacuolizadas, nucléolo em fragmentação (Figuras 8 I, J), e  
383 ainda, córion levemente ondulado (Figura 8 I).

384 Nos ovócitos em estágio mais avançado da vitelogênese, IV e V, observa-se os  
385 fragmentos nucleolares; além de vacúolos intra e entre grânulos de vitelo; o córion  
386 destas células, mais espesso, já apresenta maior pregueamento (Figura 8 I, K).

387 As células do pedicelo apresentam núcleos dilatados ou em processo de lise  
388 (Figuras 8 I)

389

390 6.4.4. 1,8-cineol em 10% (m/v) (G7)

391

392 Nesta formulação foi notado que grande parte dos ovócitos I e II apresentou  
393 desprendimento da membrana e retração citoplasmática, apesar das vesículas  
394 germinativas estarem, aparentemente, preservadas assim como seus nucléolos  
395 (Figura 8 L, M).

396 Os ovócitos III, de maneira geral, apresentaram citoplasma sem sinais de  
397 vacuolização, com a fina e abundante granulação na região central (Figuras 8 M; N).

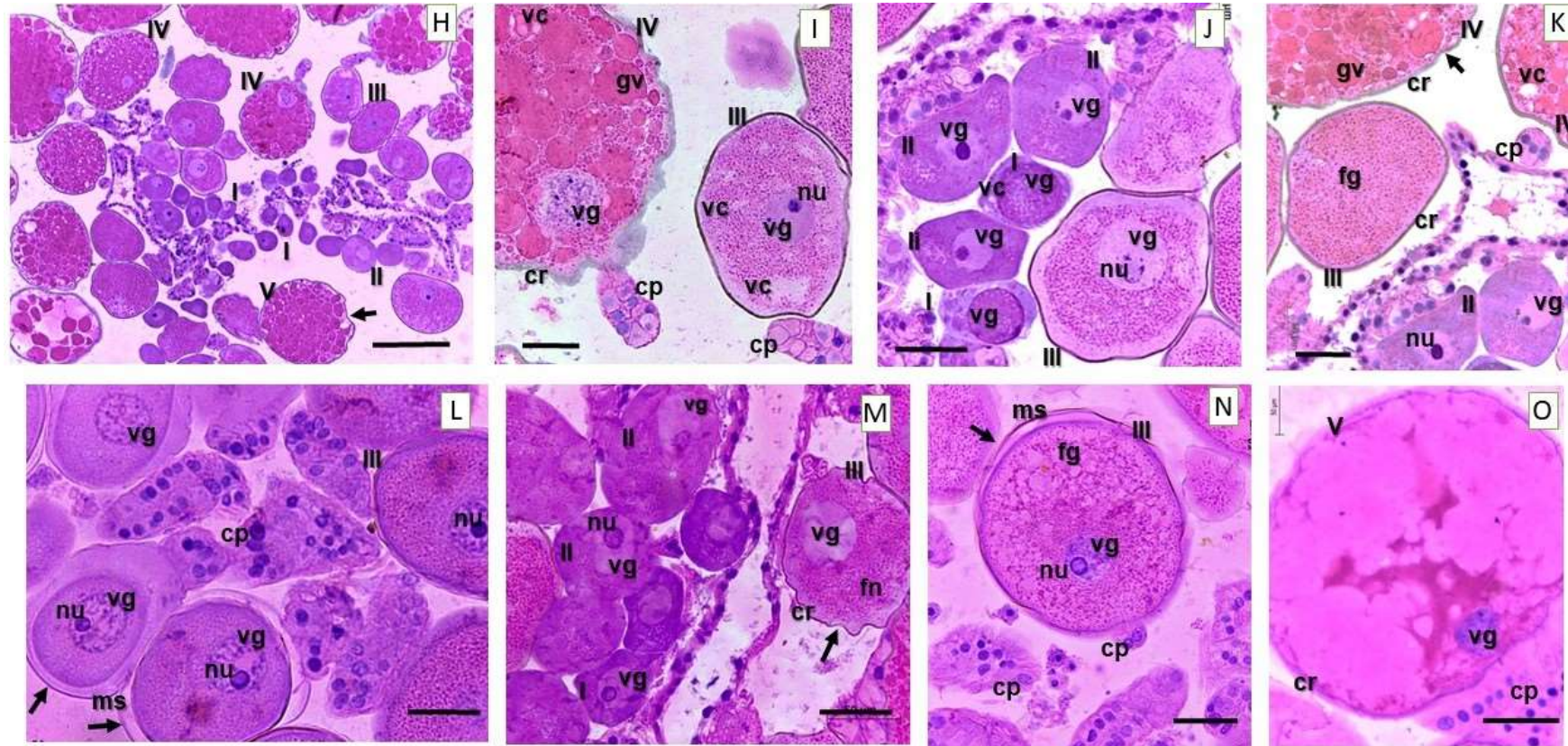
398 Algumas vezes, foram vistas vesículas germinativas com forma irregular e sem  
399 nucléolo (Figura 8 M), ou ainda, com nucléolo em formato de anel (Figura 8 N).

400 Ovócitos em estágio mais avançado de desenvolvimento foram possíveis  
401 observar os grandes grânulos de vitelo algumas vezes irregulares e/ou rompidos, ou  
402 ainda, em processo de aglutinação. Assim, os ovócitos V, na maioria das vezes, foram  
403 vistos com uma massa citoplasmática amorfa e eosinofílica (Figura 8 O).

404 Apesar de o córion ter sido observado frequentemente com irregularidades, não  
405 foi notada alteração de espessura quando equiparado ao controle negativo (Figuras 8  
406 L, O).

407 Nas células do pedicelo foram vistos desde núcleos mais condensados ou em  
408 picnose, até dilatados ou ausentes (Figuras 8 L, N, O).

409



410

411

412 Figura 8-Secção histológica dos ovários de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. H-K: Fêmeas submetidas ao óleo de mamona

413 em 0,3% com éter lauril sulfato em 2%. L-O: Fêmeas submetidas ao 1,8-cineol em 10% com éter lauril sulfato em 2%. vg- vesícula

414 germinativa, cr- córion, gv- grânulo de vitelo, nu- nucléolo, fg- fina granulação, mp- membrana plasmática, cp- célula do pedicelo,

415 vc- vacúolos. Seta H, I, K- córion espesso e com pregueamento; L, M, N- retração da membrana plasmática. Barras: K-O= 50 µm.

416 Coloração: hematoxilina e eosina (HE).

417 6.4.5. 1,8-cineol em 10% (m/v) associado ao óleo de mamona em 0,3% (m/v) (G9)

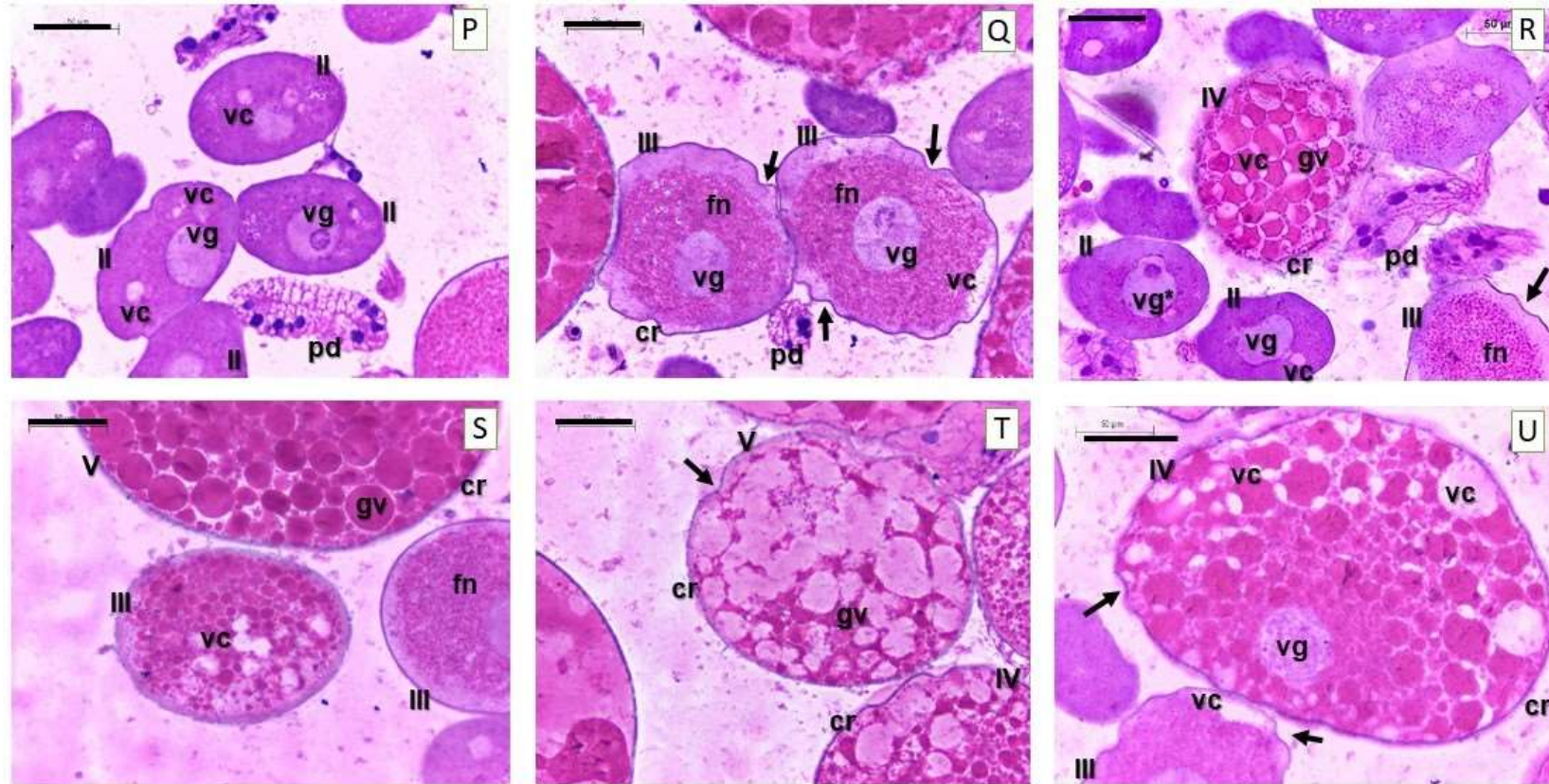
418

419       Nos ovários das fêmeas tratadas com 1,8-cineol associado ao óleo de mamona  
420 e éter lauril sulfato foram observadas muitas alterações morfológicas, comparados ao  
421 do grupo controle. Nos ovócitos I e II, inúmeros vacúolos citoplasmáticos foram  
422 encontrados por toda a extensão citoplasmática, sendo mais frequentes próximo à  
423 vesícula germinativa/região central (Figuras 9 P; R). Algumas vesículas germinativas,  
424 ainda que com contornos preservados, os nucléolos não foram observados ou  
425 estavam sofrendo fragmentação (Figuras 9 P, R). Outras vesículas germinativas já  
426 foram vistas irregulares ou em *blebbing* (\*) (Figura 9 R).

427       Os ovócitos III apresentaram o córion bastante pregueado e, às vezes,  
428 rompidos, além de intensa vacuolização no citoplasma por entre a fina granulação  
429 (Figuras 9 Q; R; S; U).

430       Os ovócitos IV e V apresentaram irregularidades ou rompimento da membrana  
431 plasmática um pouco irregular e, às vezes rompidas (Figuras 9 R, U). No citoplasma  
432 de alguns ovócitos foram vistos vacúolos, bem como seus grânulos de vitelo  
433 mostraram-se bem diferentes daqueles observados no grupo controle, estando mais  
434 disformes e/ou em aparente processo de degradação, principalmente naqueles  
435 localizados na região periférica da célula (Figuras 9 R, T, U).

436       Foram vistos, ainda, efeitos desta formulação nas células do pedicelo, como:  
437 presença de inúmeros vacúolos citoplasmáticos, núcleos picnóticos ou ausentes, além  
438 de alterações nas membranas celulares (Figuras 9 P-R).



439

440

441 Figura 9- Secção histológica dos ovários de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas ao 1,8-cineol em 10%  
 442 associado ao óleo de mamona em 0,3% e éter lauril sulfato em 2%. Note a presença de vacúolos (vc) citoplasmáticos e/ou nos  
 443 grânulos de vitelo (gv), alguns em vesícula germinativa (vg) em *blebbing* (\*) ou fragmentação principalmente naqueles ovócitos em I  
 444 e II. Observe irregularidades no limite celular (setas) dos ovócitos III, IV e V. cr- córion, nu- nucléolo, fg- fina granulação, mp-  
 445 membrana plasmática, cp- célula do pedicelo, vc- vacúolos. Barras: P-U= 50 µm Coloração: hematoxilina e eosina (HE).

## 446 7. DISCUSSÃO

447

448 Os compostos 1,8-cineol, citral, eugenol e óleo de mamona foram utilizados no  
449 presente trabalho por apresentarem potencial acaricida comprovado. Entretanto,  
450 apenas parte dos trabalhos encontrados na literatura se refere à atividade destes  
451 compostos sobre fêmeas adultas de *R. (B.) microplus* (Cruz et al., 2013; Peixoto et al.,  
452 2015; Rondelli et al., 2011; Saad et al., 2006).

453 Em sua forma isolada, o efeito do 1,8-cineol é descrito apenas sobre larvas de  
454 *R. (B.) microplus* (Prates et al., 1998), outros ácaros (Perrucci et al., 2001) e fungos  
455 (Pattnaik et al., 1997). Prates et al. (1998) descreveram mortalidade de 100% das  
456 larvas decorridos 5 minutos após a exposição ao 1,8-cineol. Chagas et al. (2002)  
457 demonstraram que o óleo essencial de *Eucalyptus globosus* contendo 1,8-cineol  
458 (85,84%) apresentou 100% de eficácia quando aplicado em a 12,5% e 7,3% sobre  
459 fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus*, respectivamente. No presente  
460 estudo, quando testado isolado, o 1,8-cineol em 10% (m/v) com éter lauril sulfato em  
461 2% (m/v) obteve a eficácia de 94,1%, sugerindo um potencial acaricida.

462 Os agentes solubilizantes utilizados nas emulsões água/óleo em testes *in vitro*  
463 devem se comportar como excipientes, não sendo o responsável pelo efeito acaricida  
464 direto, mas sim auxiliar na interação dos óleos com a cutícula do carrapato,  
465 propiciando melhor permeabilidade (Chagas et al., 2003; Gonçalves et al., 2007;  
466 Resende et al., 2012). No presente estudo, as formulações contendo éter lauril sulfato  
467 em 2% (m/v) (G6) e DMSO 5% (v/v) com Tween 80® 1% (m/v) (G2) não alteraram a  
468 reprodução das fêmeas de *R. (B.) microplus* (Tabela 4). Entretanto, as formulações  
469 (G7, G8, G9) associadas ao éter lauril sulfato apresentaram maior eficácia  
470 carrapaticida comparativamente àquelas em que se utilizou DMSO e Tween 80® (G3,  
471 G4, G5). Tal fato pode estar relacionado com a ação detergente do éter lauril sulfato



472 que pode alterar a cutícula do carrapato e favorecer a penetração dos compostos e,  
473 assim, aumentar o seu potencial acaricida. Efeitos como este, em que o éter lauril  
474 sulfato como adjuvante otimiza a eficácia do produto foi observado em testes  
475 realizados por Ferrari et al. (2014) para o controle de *Euschistus heros* (percevejo-  
476 marrom) e *Dichelops melacanthus* (percevejo-barriga-verde), parasitas da soja, sendo  
477 seu uso responsável por uma eficácia 21% maior.

478 O uso de óleos fixos nas formulações também pode auxiliar na penetração e  
479 potencial de ação de ingredientes ativos sobre fêmeas ingurgitadas ou larvas de *R.*  
480 *(B.) microplus* (Chagas et al., 2003; Martinez-Velazquez et al., 2011). A utilização de  
481 óleo fixo em testes sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* feitos por Chagas  
482 et al. (2003); em que utilizaram solventes como o DMSO na concentração de 25%  
483 mostrou que a incorporação do azeite de oliva alcançava uma mortalidade de 58%  
484 comparada quando não se utilizava 24%. Martinez-Velazquez et al. (2011)  
485 observaram uma eficiência maior que 85% sobre larvas dessa mesma espécie quando  
486 o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* contendo 1,8-cineol (14,2%) foi dissolvido  
487 em tricloroetileno e azeite (2:1).

488 O óleo de mamona apresenta em sua composição química os ésteres metílicos  
489 dos ácidos graxos palmítico (1,10%), linoleico (4,50%), oleico (4,02%), esteárico  
490 (0,50%) e ricinoleico (88,04%) (Celestino et al., 2016). Possui potencial inseticida  
491 (Rondelli et al., 2011), bem como, componentes desse óleo, apresentam ação em  
492 glândulas salivares e ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, mostrando seu  
493 potencial em intervir na alimentação e reprodução desse ectoparasita (Arnosti et al.,  
494 2011a, 2011b). Sobre fêmeas de *R. (B.) microplus*, não foram encontrados na  
495 literatura trabalhos que utilizaram o óleo de mamona sobre essas formas.

496 No presente trabalho demonstrou que a eficácia de 94,1% do 1,8-cineol em

497 10% solubilizado em éter lauril sulfato em 2% e adicionado o óleo de mamona em  
498 0,3%, foi maior comparado à eficiência sem esse óleo fixo (92,8%), mesmo que os  
499 valores de peso dos ovos e a taxa de eclosão não se diferiram estatisticamente, e  
500 ainda, quando solubilizado em DMSO 5% e Tween 80<sup>®</sup> 1% o 1,8-cineol em 10%  
501 isolado obteve uma eficácia maior (73,4%) do que quando associado ao óleo de  
502 mamona em 0,3% (55,7%), o que provavelmente possa ter uma interação antagônica  
503 desses compostos.

504 A avaliação histológica possibilitou verificar a atividade dos compostos naturais  
505 no tecido ovariano, verificando seus efeitos diretos nas células germinativas, podendo  
506 inviabilizar a reprodução dos carrapatos, o que auxiliaria no controle desses parasitas.

507 As alterações na membrana plasmática dos ovócitos como verificadas neste  
508 trabalho, também foram observadas por Vendramini et al. (2012) nos ovários de  
509 *Rhipicephalus sanguineus* em testes com óleo de andiroba e por de Oliveira et al.  
510 (2016) que verificaram os efeitos do extrato de *Acmella oleraceae* sobre *R. (B.)*  
511 *microplus*.

512 Nos ovócitos em pré (I) ou em início do processo vitelogênico (II) das fêmeas  
513 tratadas com 1,8-cineol em 10% isolado e associado ao óleo fixo, em éter em 2%,  
514 foram verificadas retrações e vacuolização no citoplasma, desprendimento da  
515 membrana plasmática, além de muitas características de degeneração das vesículas  
516 germinativas; já estas mesmas células em óleo de mamona em 0,3% em mesmo  
517 solubilizante, as alterações foram bem menos intensas e frequentes. Estas  
518 observações morfológicas nas formulações com 1,8-cineol podem ter afetado o  
519 desenvolvimento ovocitário, provocando a ausência de ovipostura e,  
520 consequentemente, não eclodibilidade dos ovos nestes dois grupos experimentais.

521 De acordo com Saito et al. (2005), os ovócitos nos estágios III, IV e V possuem,

522 no citoplasma, granulação de proteínas, lipídios e polissacarídeos; e, à medida que a  
523 vitelogênese prossegue, esses grânulos se tornam maiores. Neste estudo, entretanto,  
524 o uso do 1,8-cineol em 10%, isolado ou associado ao óleo de mamona e em éter lauril  
525 sulfato em 2%, provocou, nos ovócitos em estágios mais avançados da vitelogênese  
526 (IV e V), irregularidades ou rompimento dos grandes grânulos de vitelo, ou ainda,  
527 aglutinação desses. Estas alterações nos grânulos de vitelo dos ovócitos  
528 desenvolvidos, podem ter acarretado na redução da viabilidade destes ovócitos,  
529 diminuindo assim, as taxas de oviposição e eclosão verificadas no presente trabalho.

530 Neste estudo, os vacúolos foram mais frequentes nos ovócitos III, IV e V das  
531 fêmeas tratadas com óleo de mamona em 0,3% com éter lauril sulfato em 2%, e, vistos  
532 em todos os estágios de desenvolvimento ovocitário naquelas submetidas à  
533 formulação da associação desses ao 1,8-cineol em 10%. Semelhantemente, Oliveira  
534 et al. (2008), verificaram vacúolos nas células germinativas (em estágio I e II) de  
535 fêmeas de *R. sanguineus* diante do uso do acaricida fipronil. Esta vacuolização  
536 citoplasmática foi também observada por Arnosti et al. (2011a) nos ovócitos do  
537 carrapato *Rhipicephalus sanguineus* após a incorporação de 5g/kg do óleo de *Ricinus*  
538 *communis* à dieta de coelhos parasitados por essa espécie de carrapato. De acordo  
539 com esses autores, a presença de vacúolos é resultante da toxicidade do óleo, sendo  
540 forma de proteção celular, para isolamento da substância tóxica e manutenção do seu  
541 metabolismo.

542 Vendramini et al. (2012) comentam que os vacúolos diminuem a quantidade de  
543 vitelo na célula e têm como consequência a redução da postura pela degeneração  
544 causada. Isso explica a reduzida taxa de ovipostura observada nas fêmeas testadas  
545 na solução contendo 1,8-cineol em 10% associado ao óleo de mamona em 0,3%, e  
546 éter lauril sulfato em 2%, com ocorrência de vacuolização em todos os estágios de

547 desenvolvimento dos ovócitos, o que indica ser um produto eficaz no controle da  
548 reprodução de *R. (B.) microplus*.

549 Denardi et al. (2010) observaram fragmentação da vesícula germinativa dos  
550 ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* tratados com *Azadirachta indica*. No  
551 presente estudo, além deste tipo de alteração, nas fêmeas tratadas com a associação  
552 do 1,8-cineol em 10% e óleo de mamona em 0,3%, observou-se a ocorrência de  
553 picnose, *blebbing*, além de fragmentação ou ausência nucleolar, resultantes da alta  
554 eficácia do produto (94,1%) para o controle reprodutivo, uma vez que afetou a  
555 fertilidade. O nucléolo em formato de anel também aqui observado, pode afetar o  
556 desenvolvimento embrionário. De acordo com Cruz-Landim e Höfling (1979), a  
557 degeneração intensificada na região central do nucléolo, pode gerar a morte celular  
558 por significativa desorganização celular.

559 Deformações no córion como aqui descritas foram também apontadas por  
560 Oliveira et al. (2008) em ovócitos de *R. sanguineus* tratados com fipronil. Estes autores  
561 associaram o rompimento dos grânulos de vitelo dos ovócitos a esta perda de  
562 conformação coriônica, tendo essa última, causado menor proteção, e assim, maior  
563 permeabilidade de substâncias para os ovócitos. Tal inferência se aplica no presente  
564 estudo, uma vez que os ovócitos, principalmente os de estágios mais desenvolvidos  
565 (III-IV) das fêmeas sob ação do 1,8-cineol em 10% associado ao óleo de mamona em  
566 0,3% com éter lauril sulfato em 2%, apresentaram tanto córion irregular ou rompido,  
567 como granulação disforme. Além disto, considerando que esta é uma membrana que  
568 promove proteção contra choques mecânicos e desidratação, permite trocas gasosas  
569 e confere resistência (Oliveira et al., 2008), estas alterações na morfologia desta  
570 estrutura afetam diretamente o desenvolvimento e a viabilidade dos ovos, confirmada  
571 pela não oviposição e não eclodibilidade apresentadas por este grupo.

572 Apesar de algumas alterações terem sido verificadas nas células do pedicelo  
573 das fêmeas tratadas tanto com óleo de mamona, nas formulações com 1,8-cineol,  
574 isolado e associado, a vacuolização citoplasmática e condensação ou ausência  
575 nuclear foram mais frequentes, como notadas por Sousa et al. (2013) em seu estudo  
576 com *Melia azedarach* sobre fêmeas de *R. (B.) microplus*. Carbamatos sintéticos  
577 modificados também provocaram picnose na estrutura ovariana de fêmeas da mesma  
578 espécie, como apontado por Prado-Ochoa et al. (2014). Sabendo que o pedicelo é  
579 uma estrutura que propicia a síntese de substâncias para a nutrição dos ovócitos,  
580 essas alterações afetam o desenvolvimento das células germinativas, podendo torna-  
581 las inviáveis para a reprodução da espécie (Sousa et al., 2013).

582 A formulação com 1,8-cineol em 10% mostra-se mais efetiva que o óleo de  
583 mamona em 0,3% no controle de carrapatos *R. (B.) microplus*, independente dos  
584 solubilizantes testados nesse estudo. As formulações de 1,8-cineol em 10% com em  
585 éter lauril sulfato em 2% e quando associado ao óleo de mamona em 0,3% resultaram  
586 em soluções potencialmente acaricidas, com eficácia de 92,8% e 94,1%,  
587 respectivamente, estando próxima ao mínimo recomendado de 95% por Holdsworth  
588 et al.(2006). Dessa forma, testes com concentrações superiores podem vir a aumentar  
589 a eficácia e conduzir a possibilidade de desenvolvimento de acaricidas naturais para  
590 o controle do carrapato *R. (B.) microplus*.

591

## 592 **8. CONCLUSÃO**

593

594 O presente trabalho, portanto, aponta, dentre as formulações testadas, a do  
595 1,8-cineol em 10%, éter lauril sulfato em 2% e desse associado ao óleo de mamona  
596 em 0,3%, como os mais eficazes no controle de fêmeas de *R. (B.) microplus*, com

597 92,8% e 94,1% de eficácia, respectivamente, tendo esse último, provocado mais  
598 danos ao tecido ovariano nesta espécie de carrapato.

599 Novos testes devem ser realizados a fim de avaliar os efeitos *in vivo* deste  
600 produto potencialmente acaricida como forma alternativa para o controle do *R. (B.)*  
601 *microplus*.

602

### 603 **Agradecimentos**

604

605 Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
606 Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
607 Superior (CAPES) pelo financiamento e apoio, a Universidade Federal do Espírito  
608 Santo pelo espaço físico disponível e ao corpo docente do Grupo de Estudos  
609 Aplicados em Produtos Naturais e Síntese Orgânica.

610

### 611 **9. REFERÊNCIAS**

612

613 Abbas, R.Z., Zaman, M.A., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide  
614 resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play.  
615 Vet. Parasitol. 203, 6–20. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.006

616 Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas  
617 chromatography/mass spectrometry, Allured Pu. ed.  
618 doi:10.1016/j.jasms.2007.01.001

619 Arnosti, A., Brienza, P.D., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Bechara, G.H., Calligaris,  
620 I.B., Camargo-Mathias, M.I., 2011a. Effects of ricinoleic acid esters from castor  
621 oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus*  
622 (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. Exp. Parasitol. 127, 575–580.  
623 doi:10.1016/j.exppara.2010.10.006

624 Arnosti, A., Brienza, P.D., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Neto, S.C., Bechara,  
625 G.H., Sampieri, B.R., Camargo-Mathias, M.I., 2011b. Effects of *Ricinus*

- 626 *communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,  
627 1806) (Acari: Ixodidae). Exp. Parasitol. 127, 569–574.  
628 doi:10.1016/j.exppara.2010.10.009
- 629 Asanova, Z.K., Suleimenov, E.M., Atazhanova, G.A., Dembitskii, A.D., Pak, R.N.,  
630 Dar, A., Adekenov, S.M., 2003. Biological activity of 1,8-cineole from levant  
631 wormwood. Pharm. Chem. J. 37, 28–30. doi:10.1023/A:1023699012354
- 632 Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of  
633 essential oils - A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475.  
634 doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- 635 Celestino, F.N., Pratisoli, D., Machado, L.C., Santos Junior, H.J.G. dos, Queiroz,  
636 V.T. de, Mardgan, L., 2016. Control of coffee berry borer, *Hypothenemus*  
637 *hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) with botanical  
638 insecticides and mineral oils. Acta Sci. Agron. 38, 1.  
639 doi:10.4025/actasciagron.v38i1.27430
- 640 Chagas, A.C.S., Leite, R.C., Furlong, J., Prates, H.T., Passos, W.M., 2003.  
641 Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. Ciência Rural 33,  
642 109–114.
- 643 Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T., Leite, R.C., Furlong, J., Fortes, I.C.P.,  
644 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de  
645 *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci. 39,  
646 247–253. doi:10.1590/S1413-95962002000500006
- 647 Clemente, M.A., Gomes, F.T., Carolina, A., Scafuto, B., 2007. Avaliação do Potencial  
648 de Plantas Mediciniais no Controle de *Boophilus microplus* ( Acari : Ixodidae ).  
649 Medicina (B. Aires). 5, 516–518.
- 650 Costa, A.V., Pinheiro, P.F., de Queiroz, V.T., Rondelli, V.M., Marins, A.K., Valbon,  
651 W.R., Pratisoli, D., 2015. Chemical composition of essential oil from *Eucalyptus*  
652 *citriodora* leaves and insecticidal activity against *Myzus persicae* and  
653 *Frankliniella schultzei*. J. Essent. Oil-Bearing Plants 18, 374–381.  
654 doi:10.1080/0972060X.2014.1001200
- 655 Cruz-Landim, C., Höfling, M.A., 1979. Comportamento dos nucléolos e mitocôndrios  
656 durante a ovogênese de peixes teleósteos de água doce. Acta Amaz. 9, 723–  
657 728.
- 658 Cruz, E.M. de O., Costa-Junior, L.M., Pinto, J.A.O., Santos, D. de A., Araujo, S.A. de,  
659 Arrigoni-Blank, M. de F., Bacci, L., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C. de H., Blank,

- 660 A.F., 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major  
661 constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.*  
662 195, 198–202. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.046
- 663 Da Silva, J.B., Rangel, C.P., De Azevedo Baêta, B., Da Fonseca, A.H., 2013.  
664 Influence of the physiological state on infestation by *Rhipicephalus microplus* in  
665 dairy cows. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 52–56. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.07.003
- 666 Dallegrove, A., Pizzolato, T.M., Barreto, F., Bica, V.C., Eljarrat, E., Barceló, D., 2018.  
667 Residue of insecticides in foodstuff and dietary exposure assessment of  
668 Brazilian citizens. *Food Chem. Toxicol.* 115, 329–335.  
669 doi:10.1016/j.fct.2018.03.028
- 670 de Oliveira, P.R., de Carvalho Castro, K.N., Anholetto, L.A., Camargo Mathias, M.I.,  
671 2016. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in  
672 *Rhipicephalus microplus* females ticks. *Microsc. Res. Tech.* 79, 744–753.  
673 doi:10.1002/jemt.22693
- 674 de Souza Chagas, A.C., de Sena Oliveira, M.C., Giglioti, R., Santana, R.C.M., Bizzo,  
675 H.R., Gama, P.E., Chaves, F.C.M., 2016. Efficacy of 11 Brazilian essential oils  
676 on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks Tick.*  
677 *Borne. Dis.* 7, 427–432. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.01.001
- 678 Denardi, S.E., Bechara, G.H., Oliveira, P.R. de, Camargo-Mathias, M.I., 2010.  
679 *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of  
680 *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Exp.*  
681 *Parasitol.* 126, 462–470. doi:10.1016/j.exppara.2010.05.017
- 682 Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973.  
683 *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides. *J. Econ.*  
684 *Entomol.* 66, 130–133. doi:10.1093/jee/66.1.130
- 685 Drummond, R.O., Gladney, W.J., Whetstone, T.M., Ernest, S.E., 1971. Laboratory  
686 testing of inseticides for control of the winter tick. *J. Econ. Entomol.* 64, 686–688.
- 687 Ferrari, F., Roggia, S., Felix, F. L., 2014. Efeito do volume de calda, adjuvante e  
688 horário de aplicação sobre a eficiência de controle de percevejos em soja.  
689 JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 9., 2014, Londrina. Resumos  
690 expandidos... Londrina: Embrapa Soja, 2014., p. 111–118.
- 691 Gonçalves, K., Toigo, E., Ascoli, B., Von Poser, G., Ribeiro, V.L.S., 2007. Effects of  
692 solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus*  
693 *microplus*. *Parasitol. Res.* 100, 1267–1270. doi:10.1007/s00436-006-0418-2



- 694 Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin,  
695 E.L., Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*  
696 129, S427–S442. doi:10.1017/S0031182004006079
- 697 Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R. de S., Barros, A.T.M. de, Andreotti, R., Cançado,  
698 P.H.D., León, A.A.P. de, Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the  
699 potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.*  
700 *Veterinária* 23, 150–156. doi:10.1590/S1984-29612014042
- 701 Holdsworth, P.A., Kemp, D., Green, P., Peter, R.J., De Bruin, C., Jonsson, N.N.,  
702 Letonja, T., Rehbein, S., Vercruyse, J., 2006. World Association for the  
703 Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating  
704 the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Vet. Parasitol.*  
705 136, 29–43. doi:10.1016/j.vetpar.2005.11.011
- 706 Juergens, U.R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Repges, R., Vetter, H.,  
707 2003. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: A  
708 double-blind placebo-controlled trial. *Respir. Med.* 97, 250–256.  
709 doi:10.1053/rmed.2003.1432
- 710 Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas básicas de citologia e*  
711 *histologia*, 1st ed. São Paulo.
- 712 Lázaro, S.F., Fonseca, L.D., Martins, E.R., de Oliveira, N.J.F., Duarte, E.R., 2013.  
713 Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of  
714 *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. *Vet. Parasitol.* 194, 79–82.  
715 doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.025
- 716 Magalhães, P.J.C., Criddle, D.N., Tavares, R.A., Melo, E.M., Mota, T.L., Leal-  
717 Cardoso, J.H., 1998. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the  
718 essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol  
719 and terpineol. *Phyther. Res.* 12, 172–177. doi:10.1002/(SICI)1099-  
720 1573(199805)12:3<172::AID-PTR212>3.0.CO;2-E
- 721 Martinez-Velazquez, M., Rosario-Cruz, R., Castillo-Herrera, G., Flores-Fernandez,  
722 J.M., Alvarez, A.H., Lugo-Cervantes, E., 2011. Acaricidal Effect of Essential Oils  
723 From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis*  
724 (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against  
725 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: . *J. Med. Entomol.* 48, 822–827.  
726 doi:10.1603/ME10140
- 727 Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Evaluation of cytotoxic

- 728 effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus*  
729 (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. Food Chem. Toxicol. 46, 2459–  
730 2465. doi:10.1016/j.fct.2008.03.034
- 731 Omohu, O.J., Omale, A.C., 2017. Physicochemical Properties and Fatty Acid  
732 Composition of Castor Bean *Ricinus communis* L. Seed Oil. Am. J. Appl. Ind.  
733 Chem. 1, 1–4. doi:10.11648/j.ajaic.20170301.11
- 734 Pattnaik, S., Suramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., 1997. Antibacterial and  
735 antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbiol. 89, 39–46.
- 736 Peixoto, M.G., Costa-Júnior, L.M., Blank, A.F., Lima, A. da S., Menezes, T.S.A.,  
737 Santos, D. de A., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C. de H., Bacci, L., Arrigoni-Blank,  
738 M. de F., 2015. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes  
739 and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus*  
740 *microplus*. Vet. Parasitol. 210, 118–122. doi:10.1016/j.vetpar.2015.03.010
- 741 Perrucci, S., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Macchioni, F., Macchioni, G., 2001. In  
742 vitro and in vivo efficacy of extracts of *Artemisia verlotorum* against *Psoroptes*  
743 *cuniculi*. Vet. Rec. 148, 814–815.
- 744 Prado-Ochoa, M.G., Ramírez-Noguera, P., Díaz-Torres, R., Garrido-Fariña, G.I.,  
745 Velázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Muñoz-Guzmán, M.A.,  
746 Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2014. The action of two ethyl carbamates on  
747 acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. Vet.  
748 Parasitol. 199, 215–224. doi:10.1016/j.vetpar.2013.10.028
- 749 Prates, H.T., Leite, R.C., Craveiro, A.A., Oliveira, A.B., 1998. Identification of some  
750 chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis*  
751 *minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). J.  
752 Braz. Chem. Soc. 9, 193–197. doi:10.1590/S0103-50531998000200013
- 753 Reck, J., Marks, F.S., Rodrigues, R.O., Souza, U.A., Webster, A., Leite, R.C.,  
754 Gonzales, J.C., Klafke, G.M., Martins, J.R., 2014. Does *Rhipicephalus microplus*  
755 tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax*  
756 in cattle? Prev. Vet. Med. 113, 59–62. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.10.006
- 757 Resende, J.D. de S.A., Daemon, E., Monteiro, C.M. de O., Maturano, R., Azevedo  
758 Prata, M.C. de, Rodrigues, A.F.S.F., 2012. Toxicity of solvents and surfactants to  
759 *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor*  
760 *nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. Exp. Parasitol. 131, 139–142.  
761 doi:10.1016/j.exppara.2012.03.002

- 762 Rondelli, V.M., Pratisoli, D., Polanczyk, R.A., Marques, E.J., Sturm, G.M., Tiburcio,  
763 M.O., 2011. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no  
764 controle da traça-das-crucíferas. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 46, 212–214.  
765 doi:10.1590/S0100-204X2011000200014
- 766 Rowe, R., Sheskey, P., Quinn, M., 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients.  
767 *Handb. Pharm. excipients*, Sixth Ed. 549–553. doi:10.1016/S0168-  
768 3659(01)00243-7
- 769 Saad, E.-Z., Hussien, R., Saher, F., Ahmed, Z., 2006. Acaricidal activities of some  
770 essential oils and their monoterpenoidal constituents against house dust mite,  
771 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Zhejiang Univ. Sci.*  
772 *B* 7, 957–962. doi:10.1631/jzus.2006.B0957
- 773 Saito, K.C., Bechara, G.H., Nunes, É.T., De Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Mathias,  
774 M.I.C., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary  
775 of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet.*  
776 *Parasitol.* 129, 299–311. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.020
- 777 Sampieri, B.R., Arnosti, A., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Bechara, G.H., de  
778 Carvalho, P.L.P.F., Nunes, P.H., Camargo-Mathias, M.I., 2013a. Effect of  
779 ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk  
780 components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:  
781 Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 191, 315–322. doi:10.1016/j.vetpar.2012.09.013
- 782 Sampieri, B.R., Arnosti, A., Nunes, P.H., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Mathias,  
783 M.I.C., 2012. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged  
784 *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from  
785 castor oil (*Ricinus communis*). *Microsc. Res. Tech.* 75, 683–690.  
786 doi:10.1002/jemt.21112
- 787 Sampieri, B.R., Furquim, K.C.S., Nunes, P.H., Camargo-Mathias, M.I., 2013b.  
788 *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (  
789 *Ricinus communis*): An ultrastructural overview. *Parasitol. Res.* 112, 611–619.  
790 doi:10.1007/s00436-012-3173-6
- 791 Santos, A.V., De Oliveira, R.A., Albuquerque, G.R., 2012. Efeito in vitro do extrato de  
792 nim (*Azadirachta indica*) e óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*)  
793 sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Med. Vet.* 34, 111–115.
- 794 Sousa, L.A.D. de, Rocha, T.L., Saboia-Morais, S., Borges, L., 2013. Ovary histology  
795 and quantification of hemolymph proteins of *Rhipicephalus (Boophilus)*

- 796 *microplus* treated with *Melia azedarach*. Rev Bras Parasitol Vet Jaboticbal 22,  
797 339–345.
- 798 Thiele, G.F., Harrison, R.A., 1968. Selection of solvents for topical application  
799 acaricide testing 389–396.
- 800 Vendramini, M.C.R., Mathias, M.I.C., De Faria, A.U., Furquim, K.C.S., De Souza,  
801 L.P., Bechara, G.H., Roma, G.C., 2012. Action of andiroba oil (*Carapa*  
802 *guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)  
803 semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system.  
804 Microsc. Res. Tech. 75, 1745–1754. doi:10.1002/jemt.22126
- 805 Vuuren, S.F. van, Viljoen, A.M., 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers  
806 and 1,8-cineole alone and in combination. Flavour Fragr. J. 22, 540–544.  
807 doi:10.1002/ffj.1843  
808