

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

VANDERSON DE ATAIDE PAULUCIO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL CARRAPATICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp. FRENTE A *Rhipicephalus microplus***

ALEGRE – ES

2021

VANDERSON DE ATAIDE PAULUCIO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL CARRAPATICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp. FRENTE A *Rhipicephalus microplus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias 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.

Orientador: Prof. Dr.: Vagner Tebaldi de Queiroz
Coorientador: Prof. Dr.: Adilson Vidal Costa

ALEGRE – ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

P333c Paulucio, Vanderson de Ataide, 1989-
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL
CARRAPATICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus*
spp. FRENTE A *Rhipicephalus microplus* / Vanderson de
Ataide Paulucio. - 2021.
77 f. : il.

Orientador: Vagner Tebaldi de Queiroz.

Coorientador: Adilson Vidal Costa.

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

1. Parasitologia Veterinária. 2. Quimiometria. 3.
Compostos bioativos das plantas. 4. *Boophilus microplus*. 5.
Eucalipto. I. de Queiroz, Vagner Tebaldi. II. Costa, Adilson
Vidal. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

VANDERSON DE ATAIDE PAULUCIO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL CARRAPATICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp. FRENTE A *Rhipicephalus microplus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias 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.

Aprovado em 08/10/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Documento assinado digitalmente
ROSANA CASOTI
Data: 19/01/2022 11:00:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Pesquisadora Dr^a. Rosana Casoti
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro externo

Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
VAGNER TEBALDI DE QUEIROZ - SIAPE 1577509
Departamento de Química e Física - DQF/CCENS
Em 11/01/2022 às 10:36

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/342980?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JOSE DE OLIVEIRA CARVALHO NETO - SIAPE 2271907
Departamento de Medicina Veterinária - DMV/CCAIE
Em 17/01/2022 às 10:08

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/344690?tipoArquivo=O>

***Dedico esse trabalho
À minha falecida mãe Laerce de Ataide que
sempre esteve ao meu lado. Saudades
eterna.***

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao professor Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz, pela orientação desse trabalho, ajuda e amizade durante esses anos.

À pesquisadora Dr^a. Rosana Casoti que foi fundamental na parceria para realização desse estudo.

Ao professor Dr. Adilson Vidal Costa, pela ajuda e coorientação nesse trabalho.

À Minha Esposa, pela ajuda valiosa nesse trabalho, paciência e dedicação.

Ao Walter, pela colaboração prestada e pela amizade.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelo fornecimento das larvas de *R. microplus*, em especial a Barbara Rauta de Avelar pela ajuda e colaboração na realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Zoologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em especial a professora Adriane Cristina Araújo Braga por todo auxílio e disponibilização de materiais e equipamentos de laboratório.

A secretária da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Alessandra, por todo cuidado, compreensão e ajuda nas etapas e procedimentos do mestrado;

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

PAULUCIO, VANDERSON DE ATAIDE. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL CARRAPATICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp. FRENTE A *Rhipicephalus microplus***. 2021. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

Rhipicephalus microplus, parasito bovino de relevância mundial, é responsável por perdas econômicas na bovinocultura. Seu controle tem encontrado barreiras como desenvolvimento de populações resistentes aos carrapaticidas convencionais. Neste cenário, estudos de alternativas de controle de *R. microplus* são cada vez mais relevantes, em especial carrapaticidas de origem vegetal. O presente estudo teve como objetivo o estudo da diversidade química e avaliação da atividade carrapaticida do óleo essencial (OE) de oito espécies de *Eucalyptus* spp. sobre larvas de *R. microplus*. O estudo de diversidade química foi realizado por meio de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). No ensaio *in vitro*, os OEs foram avaliados no teste de pacote larval (LPT) com seis repetições em cada tratamento e controle negativo sendo água destilada e Tween 80® a 3% (m v⁻¹). Através da análise de similaridade química foi possível observar dois grupos distintos em que, para as duas técnicas avaliadas (CG-EM e RMN), as espécies *E. smithii* (ESM) e *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (EURC) apresentaram-se no mesmo grupo, demonstrando ser significativamente diferentes de todas as demais espécies avaliadas. Entretanto, não apresentaram semelhanças em relação a atividade carrapaticida. Os componentes α -pineno e 1,8-cineol foram apontados como os compostos que discriminaram essas duas espécies das demais. No ensaio biológico, as espécies *E. grandis* (EGR), *E. tereticornis* (ETI) e *E. urophylla* x *E. grandis* (EURG) apresentaram os maiores valores de mortalidade na menor concentração testada, com 99% de mortalidade das larvas na concentração de 1,25% (m v⁻¹). EGR foi a espécie que apresentou os menores valores de CL₅₀ (0,38% m v⁻¹) e CL₉₀ (0,78% m v⁻¹). Através de análise multivariada foi possível sugerir que os componentes α -pineno e γ -terpineno estariam relacionados com a atividade carrapaticida, fornecendo informação para desenvolvimento de produtos alternativos para o controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: carrapaticida alternativo; controle alternativo; monoterpenos;

ABSTRACT

PAULUCIO, VANDERSON DE ATAIDE. **CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ACARICIDAL ACTIVITY OF *Eucalyptus* spp. ESSENTIAL OILS ON *Rhipicephalus microplus***. 2021. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

Rhipicephalus microplus, a bovine parasite of worldwide relevance, is responsible for economic losses in cattle farming. Its control has encountered barriers such as the development of populations resistant to conventional ticks. In this scenario, studies of alternatives to control *R. microplus* are increasingly relevant, especially plant-based ticks. The present study aimed to study the chemical diversity and evaluation of the tick activity of the essential oil (EO) of eight species of *Eucalyptus* spp. on *R. microplus* larvae. The study of chemical diversity was carried out by means of Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). In the in vitro assay, the EOs were evaluated in the larval pack test (LPT) with six repetitions in each treatment and negative control being distilled water and 3% Tween 80® (m v⁻¹). Through the chemical similarity analysis it was possible to observe two distinct groups in which, for the two evaluated techniques (GC-MS and NMR), the species *E. smithii* (ESM) and *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (EURC) were included on the same group, demonstrating to be significantly different from all other species evaluated. However, they did not show similarities in relation to the tick activity. The α -pinene and 1,8-cineole components were identified as the compounds that discriminated these two species from the others. In the biological assay, the species *E. grandis* (EGR), *E. tereticornis* (ETI) and *E. urophylla* x *E. grandis* (EURG) showed the highest mortality values at the lowest concentration tested, with 99% mortality of larvae at the concentration of 1.25% (m v⁻¹). EGR was the species that presented the lowest values of CL₅₀ (0.38% m v⁻¹) and CL₉₀ (0.78% m v⁻¹). Through multivariate analysis it was possible to suggest that the components α -pinene and γ -terpinene would be related to the tick activity, providing information for the development of alternative products for the control of *R. microplus*.

Keywords: alternative control; alternative acaricide; monoterpenes;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
Figura 2 - Diferenças entre características físicas em diferentes fases do ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i> . Ovos aglutinados; larvas após eclosão dos ovos apresentando 3 pares de patas e ninfas e adultas com quatro pares de patas. Larvas, ninfas e adultas apresentam escudo quitinoso incompleto.....	21
Figura 3 - Sequência das fases de ingurgitamento da fêmea do carrapato após repasto sanguíneo. É classificada em neógina no 15º dia de vida parasitária; partenógina do 18º dia de vida parasitária até o ingurgitamento completo, quando é então denominada teleógina, atingindo seu tamanho máximo.....	21

Capítulo

Figura 1 - Análise de similaridade química de óleos essenciais de espécies de <i>Eucalyptus</i> spp., empregando dados de CG-EM e RMN de ¹ H por análise multivariada.....	59
Figura 2 - Modelo OPLS-DA do perfil metabólico dos OEs de <i>Eucalyptus</i> spp. para predição de compostos bioativos frente larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	62

LISTA DE SIGLAS

CAS – Serviço de Resumo Químico

CDCl₃ - Diclorometano deuterado

CG-EM - Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

EAL - *Eucalyptus alba*

EGR - *Eucalyptus grandis*

EOs – Óleos Essenciais

EP – Erro Padrão

ESA - *Eucalyptus saligna*

ESM – *Eucalyptus smithii*

ETI - *Eucalyptus tereticornis*

EURC - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*

EURG - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*

EURP - *Eucalyptus urophylla*

FAO - Organização para a Alimentação e Agricultura

FM – Formula molecular

HCA - Análise Hierárquica de Agrupamentos

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CL₅₀ – Concentração letal suficiente para matar 50% das larvas

CL₉₀ - Concentração letal suficiente para matar 90% das larvas

LPT – Teste Pacote Larval

MM – Massa Molar

MS – Espectro de massa

n.i. – Não identificado

OPLS-DA - Mínimos Quadrados Parciais Ortogonalizado – Análise Discriminante

ppm – Partes por milhão

R_{calc}- Índice de retenção calculado

R_{lit} – Índice de retenção

RMN - Ressonância magnética nuclear

RT – Tempo de retenção

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

LISTA DE TABELAS

Capítulo

Tabela 1 - Composição química e rendimento dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp. cultivados na região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil.....	55
Tabela 2 - Valores de mortalidade média de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> submetidas a óleos essenciais extraídos das oito espécies de eucalipto avaliadas, em diferentes concentrações.....	60
Tabela 3 - Valores de CL ₅₀ e CL ₉₀ sobre as larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em diferentes tratamentos.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	17
2.1.1 Ciclo de vida	18
2.1.2 Características gerais da morfologia de <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
2.1.3 Impacto econômico causado por <i>Rhipicephalus microplus</i>	22
2.2 Carrapaticidas convencionais.....	23
2.3 Resistência	25
2.4 Alternativas no controle de carrapatos.....	27
2.5 Óleos essenciais.....	28
2.5.1 Caracterização química.....	29
2.5.2 Óleo essencial de eucalipto.....	30
2.5.3 Modo de ação e atividade biológica	32
3. REFERENCIAS.....	33
CAPÍTULO 1: ESTUDO DA DIVERSIDADE QUÍMICA POR CG-EM E RMN DE ¹H E POTENCIAL CARRAPATICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus</i> spp....	44
RESUMO	45
ABSTRACT	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Material vegetal.....	50
2.2 Análises químicas	50
2.2.1 Extração de óleos essenciais (OEs), determinação do teor de umidade e rendimento	50
2.2.2 Análise CG-EM, identificação e processamento de dados.....	51
2.2.3 Análise de RMN e processamento de dados	52
2.3 Bioensaio	53
2.3.1 Teste de pacote larval (LPT)	53
2.4 Análise quimométrica.....	55
3. RESULTADOS.....	55
3.1 Rendimento e composição química de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp.....	55

3.2 Análise de similaridade química entre espécies de eucalipto	58
3.3 Bioensaio	60
3.4 Determinação de componentes bioativos através de OPLS-DA	61
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	68
6. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

Pragas agrícolas e do gado, doenças e infestações se tornaram um importante fator de estresse para a agropecuária, levando a 9% de todas as perdas da produção agrícola e pecuária no período de 2008 a 2018. Investir na resiliência e na redução dessas perdas é de suma importância para garantir o papel crucial da agropecuária e alcançar um futuro sustentável (FAO, 2021).

Dentre estas pragas, o carrapato da espécie *Rhipicephalus microplus* é considerado um dos parasitos de maior relevância para a bovinocultura mundial. Quando a infestação se dá por um número elevado de espécimes, é capaz de retirar grandes quantidades de nutrientes do hospedeiro através da hematofagia e, esse parasitismo espoliativo, causa redução na produção de carne e leite e, ainda, estresse e danos ao couro do animal. As perdas mais significativas, no entanto, são trazidas pela transmissão de doenças causadas por protozoários, bactérias e vírus. Estima-se que afetem cerca de 80% dos bovinos no mundo todo (FAO, 2020).

Somado a isso, o controle das populações de *R. microplus* vem encontrando barreiras, principalmente o crescente número de populações resistentes aos principais carrapaticidas disponíveis comercialmente. Por isso o grande interesse e urgência em estudar e desenvolver novos métodos de controle desse parasito (GRISI et al., 2014; GUPTA et al., 2016; KLAFKE et al., 2017; KUMAR; SHARMA; GHOSH, 2020; SILVA et al., 2021).

Os principais carrapaticidas atuais afetam o meio ambiente e outros organismos não-alvos. Em contrapartida, pesquisas que buscam alternativas de controle mais eficientes, naturais e menos prejudiciais ao meio ambiente têm ganhado destaque, em especial pesquisas que utilizam óleos essenciais (CHAGAS et al., 2014).

Óleos essenciais são metabólitos secundários advindos de plantas e que possuem composição variada. Muitos de seus constituintes químicos possuem ação carrapaticida relatada, como γ -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, 1,8 cineol, carvacrol, timol, eugenol, sendo uma boa alternativa para auxiliar o controle de carrapatos (CARDOSO et al., 2020; EBADOLLAHI; ZIAEE; PALLA, 2020; LIMA et al., 2018; NOVATO et al., 2018; PEIXOTO et al., 2015; QUEIROZ et al., 2020).

Os monoterpenos, metabólitos secundários considerados pouco tóxicos a mamíferos e que podem causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas de artrópodes, têm sido estudados como alternativas potenciais aos carrapaticidas comerciais disponíveis, já que muitos são reconhecidos como seguros pela United States Food and Drug Administration (CHAGAS et al., 2002; TEMPLETON et al., 1998).

Embora estudos anteriores que demonstram a atividade carrapaticida de diversos compostos naturais já existam, o desenvolvimento e acesso a formulações comerciais para aplicação à campo ainda encontram barreiras, como a quantidade e a disponibilidade de material vegetal para a extração de bioativos (PAVELA, 2015; QUADROS et al., 2020). Porém, no Brasil, a cultura de espécies do gênero *Eucalyptus* L'Hérit (Myrtaceae) é em grande escala para produção de madeira em que, na maioria das vezes, as folhas são descartadas, de onde se pode extrair óleo essencial (DE OLIVEIRA; PEDRASSANI, 2017).

Estudos anteriores com OEs de espécies do gênero *Eucalyptus* spp. foram realizados, evidenciando o potencial destes para o manejo de pragas devido a ações antiparasitárias como inseticida (DE SOUZA et al., 2019), carrapaticida (CAMILO et al., 2017) e também como anti-helmíntico (MACEDO et al., 2010) e anti-protozoário (MOJICA; DEOCARIS; ENDRIGA, 2004). Entretanto, existe a necessidade de padronização química para o desenvolvimento de formulações carrapaticidas de origem natural, uma vez que a composição química dos óleos essenciais pode variar em função de fatores edafoclimáticos (QUADROS et al., 2020; ŠARAC et al., 2014).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar a composição química de oito espécies de *Eucalyptus* spp. e compará-las quanto à similaridade química a fim de verificar quais delas produzem compostos semelhantes entre si. Além disso, este trabalho também avaliou a atividade carrapaticida dos óleos essenciais destas espécies frente a larvas de *R. microplus* a fim de determinar componentes bioativos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O gênero *Rhipicephalus* abrange cerca de 84 espécies de carrapatos (GUGLIELMONE et al., 2010), onde *Rhipicephalus microplus* é considerado o principal e mais importante ectoparasito que acomete bovinos nos países de clima tropical (CAMARGO-MATHIAS, 2013).

R. microplus é uma espécie de carrapato monoxeno, pertencente a família Ixodidae. Hematófago, parasita principalmente bovinos, sendo conhecido popularmente como carrapato-do-boi (CAMARGO-MATHIAS, 2013). Além de causar danos pela retirada de sangue do animal parasitado, também causa danos ao couro e atua na transmissão de doenças, gerando redução de produtividade e grande prejuízo para a bovinocultura (DE ARAÚJO et al., 2019).

Esta espécie, originária da Ásia, foi introduzida nas regiões tropicais através da importação de animais, se adaptando ao clima quente e úmido, favoráveis a manutenção da espécie. Sua distribuição vai desde o continente americano, África, além de Ásia e Austrália (PEREIRA; LABRUNA, 2008; POWELL; REID, 1982).

No Brasil, é encontrado em todas as regiões do país, sendo considerado um dos parasitos de bovinos de maior relevância sanitária, gerando perdas econômicas estimadas em 3,23 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2014).

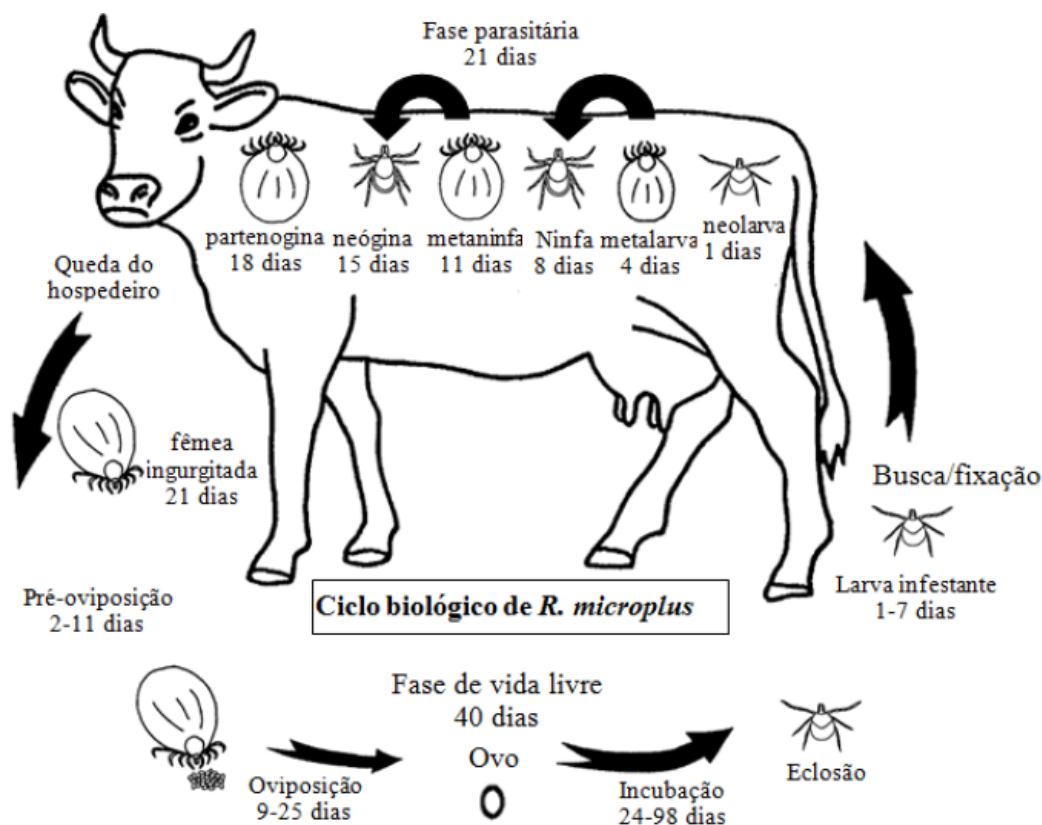
A espécie *R. microplus* é classificada no filo Arthropoda, classe Arachnida, sendo considerada uma das classes de artrópodes de maior importância veterinária. Nessa classe, os indivíduos adultos apresentam quatro pares de pernas e o corpo dividido em gnatossoma (peças bucais) e idiossoma, com cefalotórax e abdome fundidos. Os artrópodes dessa classe não apresentam antenas e asas e, todas as espécies descritas até o presente, são parasitas e hematófagas. Esta espécie de carrapato é classificada ainda na subclasse Acari, que é extremamente diversa e abundante, e ordem Ixodida, representada por parasitos conhecidos vulgarmente pelo nome de carrapatos (KRANTZ; WALTER, 2009). Nessa ordem, as duas famílias de interesse médico e encontradas no Brasil são as famílias Argasidae e Ixodidae, sendo

esta última onde estão classificados os carrapatos “duros”, família a que a espécie *R. microplus* pertence (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2012).

2.1.1 Ciclo de vida

Os carrapatos da espécie *R. microplus* são parasitas hematófagos de animais vertebrados, preferencialmente bovinos, e as fases de vida desses carrapatos consistem em: ovo, larva, ninfa e adultos (ESTRADA-PEÑA, 2015). As características peculiares de cada espécie é o que determina a adaptação aos diferentes fatores externos nas diversas etapas do ciclo biológico (CHACÓN et al., 2003). Essa influência externa pode fazer com que as diferentes fases do ciclo se prolonguem por diferentes períodos na natureza, sendo influenciadas por fatores, como a temperatura (SANAVRIA; PRATA, 1996). O ciclo de vida desse parasito pode ser definido em duas fases distintas: a fase parasitária e a fase de vida livre (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*



Fonte: Sonenshine; Roe, 2014.

Na fase parasitária, a larva infestante realiza a fixação no bovino, passando pelos estágios de ninfa até teleógina, que é o estágio final de ingurgitamento. Após subir no hospedeiro, a larva se fixa em locais menos propensos a ação mecânica e auto limpeza do hospedeiro como, por exemplo, a base da cauda e parte posterior da coxa do bovino. Após a fixação pela introdução do seu aparelho fixador (hipóstomo), começam a se alimentar e se desenvolver (neolarva). Entre quatro a sete dias, a larva entra em estado de imobilidade, em preparo para a primeira muda da cutícula, quando recebe o nome de metalarva. Após cerca de oito dias, da metalarva origina-se a ninfa, adquirindo nova estrutura, com quatro pares de pernas que, após se alimentarem e mudarem de cutícula, dão origem ao adulto imaturo, diferenciando-se em macho (neandro) ou fêmea (neógina), por volta do 14^o dia da fase parasitária. Após aproximadamente quatro dias de repasto sanguíneo é alcançada a maturação sexual em que as fêmeas passam a ser classificadas como partenógenas. A partenógina é fecundada pelo macho, ocorrendo grande mudança nas fêmeas, que aumentam o consumo de sangue, alcançando rapidamente o ingurgitamento até atingirem seu tamanho máximo, quando recebem a denominação de teleóginas (SONENSHINE; ROE, 2014; GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTTI, 2001; FREITAS et al., 1978; SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011).

Esta fase é pouco influenciada pelas condições climáticas e ambientais, uma vez que a temperatura corporal dos animais permanece relativamente constante, com duração aproximada de 18 a 21 dias no total. As fêmeas, após o completo ingurgitamento, caem ao solo para realizar a postura (SONENSHINE; ROE, 2014; GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTTI, 2001; PEREIRA; LABRUNA, 2008).

A fase de vida livre, que pode durar no total de até 3 meses, com grande variabilidade de tempo dependendo das condições ambientais, se inicia a partir da queda das fêmeas ingurgitadas, seguido dos períodos de pré postura, postura, eclosão larval e tempo de sobrevivência das larvas na pastagem. A oviposição no solo pode durar vários dias, com cada fêmea ovipondo entre 3000 e 4000 ovos. As larvas eclodem desses ovos entre 24 a 98 dias e as teleóginas morrem após completar o período de postura (SONENSHINE; ROE, 2014; MONTEIRO et al., 2012; TAYLOR; COOP; WALL, 2014). Após período de maturação de cerca de uma semana, as larvas buscam o hospedeiro para fixarem-se e se alimentar, dirigindo-se às extremidades do capim para facilitar o contato com bovinos, dando continuidade ao ciclo (GUIMARÃES;

TUCCI; BARROS-BATTESTTI, 2001; PEREIRA; LABRUNA, 2008; SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011).

A duração da fase não parasitária é diretamente influenciada pela temperatura pois, em temperaturas mais elevadas, pode ocorrer significativo encurtamento do ciclo (BROVINI; FURLONG; CHAGAS, 2003). Assim, embora presentes no decorrer de todo o ano, as populações de carrapatos atingem seu pico no verão (ANDREOTTI et al., 2002).

A fase parasitária compreende 5% da população de carrapatos e a fase não parasitária 95% (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTTI, 2001; PEREIRA; LABRUNA, 2008; SANTAREM; SATOR, 2003; SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011).

Em relação aos machos adultos, estes permanecem no animal por cerca de 40 dias até dois meses, se alimentando e fecundando as fêmeas (ANDREOTTI et al., 2002).

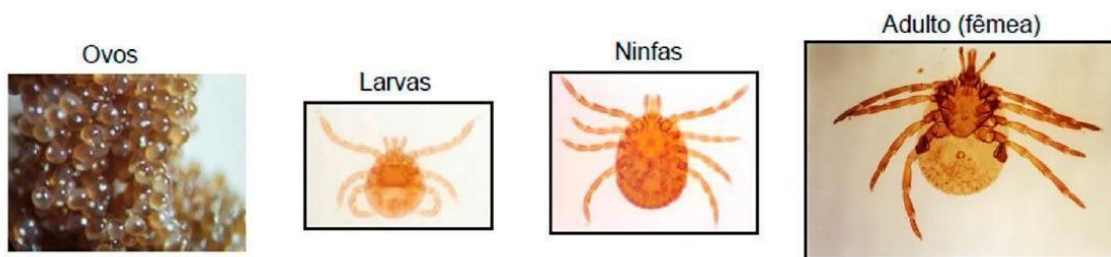
2.1.2 Características gerais da morfologia de *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *R. microplus*, assim como as outras espécies de carrapatos da família Ixodidae, tem corpo achatado dorso ventralmente. As larvas dessa espécie possuem três pares de patas e escudo incompleto, atingindo um milímetro e meio de comprimento, e não são visíveis no animal por estarem fixadas na pele e camufladas através dos pêlos. Já as ninfas: possuem quatro pares de patas e uma fileira a mais de denticção no hipóstomo. Estas estruturas favorecem sua adesão à pele do hospedeiro tornando difícil seu desprendimento ou a sua retirada (FREITAS et al., 1978; SILVEIRA; ARAÚJO, 2019).

As fêmeas adultas possuem quatro pares de patas, escudo incompleto (Figura 2) e aparelho genital, diferenciando dos machos que possuem escudo completo (FREITAS et al., 1978; SILVEIRA; ARAÚJO, 2019).

Figura 2 - Diferenças entre características físicas em diferentes fases do ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. Ovos aglutinados; larvas após eclosão dos ovos

apresentando 3 pares de patas e ninfas e adultas com quatro pares de patas. Larvas, ninfas e adultas apresentam escudo quitinoso incompleto.



Fonte: Silveira; Araújo, 2019.

Tal característica permite que o abdome da fêmea se expanda durante o repasto sanguíneo (Figura 3). Assim, o dimorfismo sexual é acentuado em que, as fêmeas de *R. microplus* podem apresentar tamanho até 10 vezes maior do que os machos, chegando a medir 13 mm. Quando ingurgitadas tendem a aumentar sua dimensão corporal em até 250 vezes, fazendo postura de um grande número de ovos, que pode chegar à aproximadamente 4.500 ovos por fêmea (BARROS-BATTESTI et al., 2006; TAYLOR; COOP; WALL, 2017).

Figura 3 - Sequência das fases de ingurgitamento da fêmea do carrapato após repasto sanguíneo. É classificada em neógina no 15^o dia de vida parasitária; partenógina do 18^o dia de vida parasitária até o ingurgitamento completo, quando é então denominada teleógina, atingindo seu tamanho máximo.



Fonte: Molinaro; Caputo; Amendoeira, 2012.

Os machos exibem apenas um ligeiro aumento no tamanho do corpo durante a alimentação. Já a cutícula das fêmeas triplica de espessura durante essa fase, mas na fase rápida do engurgitamento a cutícula destas diminui de espessura (SONENSHINE; ROE, 2014).

As camadas cuticulares são formadas de quitina e se dividem em epicutícula e prócutícula, em que a epicutícula é uma estrutura fina (1 μm ou menos) revestida por

uma camada de cera. A epiderme, junto com essas camadas da cutícula, forma o tegumento. Além disso, os carrapatos da espécie *R. microplus* não são ornamentados, apresentam palpos curtos, olhos simples e placas espiraculares no formato de vírgula (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS- BATTESTTI, 2001; TAYLOR; COOP; WALL 2017; SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011).

2.1.3 Impacto econômico causado por *Rhipicephalus microplus*

O agronegócio contribui com um terço do Produto Interno Bruto do Brasil, sendo a produção bovina um de seus principais segmentos, com aproximadamente 218 milhões de cabeças, um dos maiores rebanhos comerciais de gado do mundo (GOMES et al., 2017).

Embora o Brasil tenha enorme potencial para expandir ainda mais sua produção animal, em que estimativas apontam crescimento de 4% do rebanho bovino brasileiro em 2021, apontam também queda de 6% da produção de carne bovina no país (USDA, 2021). Dentre os motivos para queda da produção, os parasitas representam sérios problemas para os produtores de carne bovina e de leite (GRISI et al., 2014; JONSSON, 2006), gerando perdas econômicas de cerca de USD 13,9 bilhões por ano, incluindo danos causados por endo e ectoparasitas bovinos (CHAGAS et al., 2016; GRISI et al., 2014; MONTEIRO et al., 2012).

Na bovinocultura, o parasitismo por carrapatos, principalmente a espécie *R. microplus*, representa grande problema econômico para pecuaristas e produtores leiteiros, devido às perdas diretas e indiretas causados por este parasito. *R. microplus* é ainda responsável pela transmissão de doenças e redução de produtividade do hospedeiro, tanto pelo estresse causado, quanto pela própria retirada de sangue e nutrientes. A picada do carrapato pode causar lesão direta nos animais em decorrência da irritação, inflamação e hipersensibilidade. Além disso, cada carrapato bovino suga, em média, 2 mL/dia de sangue de seu hospedeiro, podendo levar a anemia e diminuição da produção (NOGUEIRA et al., 2020; PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020). A infestação por este parasito pode reduzir cerca de 3% da produção de leite por vaca em lactação, podendo representar perda de cerca de 90 litros de leite por animal em uma lactação de 300 dias de uma vaca (RODRIGUES; LEITE, 2013).

Um dos fatores agravantes para esse impacto econômico causado pelo carrapato deve-se a introdução de raças bovinas europeias, que são sensíveis e mais propensas a infestações parasitárias, o que implica em níveis mais altos de infestação ambiental, perpetuando altas prevalências (BIEGELMEYER et al., 2015, VILLAR et al., 2020). E apesar de ser originário da Ásia, *R. microplus* foi introduzido na maioria dos países tropicais por meio da importação de gado (SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011). Atualmente, tem ampla distribuição geográfica, cobrindo todas as regiões de clima tropical e subtropical do mundo (ADENUBI et al., 2018, HIGA et al., 2020, VILLAR et al., 2020).

Além das perdas diretas já relatadas, as perdas indiretas causadas por *R. microplus* com os custos com controle químico, resíduos deixados nos produtos de origem animal e danos ambientais decorrentes do uso desses produtos, podem ser ainda maiores, uma vez que para calcular os prejuízos foram utilizados animais controle advindos de ambiente controlado (GRISI et al., 2014).

2.2 Carrapaticidas convencionais

O principal método usado para controle de populações de carrapato é o uso de carrapaticidas sintéticos como as amidinas, lactonas macrocíclicas, os organofosforados, fenilpirazóis e piretróides (KLAFKE et al., 2017). Contudo, tem sido cada vez mais necessário desenvolver e validar estratégias de controle de carrapatos, a fim de reduzir os prejuízos causados pela maioria dos compostos atualmente disponíveis no mercado. Como exemplo de malefícios dos acaricidas convencionais, destacam-se o surgimento crescente de populações de carrapatos resistentes, além da contaminação ambiental e resíduos em produtos de origem animal causados por tais substâncias (BIEGELMEYER et al., 2012; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018; SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004).

Os carrapaticidas convencionais podem ser classificados como carrapaticidas sistêmicos, como exemplo, as lactonas macrocíclicas (abamectina e ivermectina), e carrapaticidas de contato que compreendem os organofosforados, amidínicos e fenilpirazóis (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2007).

Os carrapaticidas convencionais possuem mecanismos de ação que agem principalmente no sistema nervoso do parasito, levando a paralisia e morte do

carrapato. Podem ser definidos basicamente quatro modos de ação destes carrapaticidas: a ativação dos canais de cloro, os antagonistas dos canais de cloro mediados por gaba, os moduladores dos canais iônicos e os inibidores da enzima acetil colinesterase. Além dos carrapaticidas que agem no sistema nervoso e sinapses neuromusculares, podem ser citados também carrapaticidas que agem como inibidores da cadeia de transporte e elétrons na mitocôndria e inibidores da síntese de quitina (LE GALL, 2016).

A classe química das formamidinas, a qual o amitraz pertence, foi amplamente usada no controle de carrapatos após sua introdução em 1975 (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004), mas, em 2003, trabalhos já apontavam a existência de resistência a essa classe (LI et al., 2003). O mecanismo de ação da molécula se dá através da interação com os receptores de octopamina no sistema nervoso central dos artrópodes, resultando em hiperexcitabilidade neural e morte destes (EVANS; GEE, 1980; DUDAI et al., 1987; JONSSON; HOPE, 2007).

Já entre as lactonas macrocíclicas, com relatos de sua introdução para uso em 1981, duas classes apresentam atividade carrapaticida: as avermectinas (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina) e as milbemicinas (moxdectina e milbecinaoxima), e também com notificações de resistência já relatadas (KLAFKE et al., 2006; MARTINS, 2001). Em relação ao modo de ação, atuam principalmente sobre o ácido γ -aminobutírico (GABA) e os canais de cloro-glutamato levando a abertura desses canais que leva a um aumento irreversível na condutância da membrana, com paralisia da musculatura e morte do parasito (CLARK et al., 1994; FRITZ et al., 1979).

Os organofosforados e cabarmatos, com introdução de uso em 1955, inibem irreversivelmente a ação da enzima AChE por possuírem capacidade de se ligar a esta enzima e interferir na transmissão nervosa, provocando constante estimulação que acarreta a morte por paralisia (MANSON et al., 1984). Estudos, anos depois, têm buscado esclarecer quais os mecanismos da ocorrência de resistência a esta classe (BAXTER; BARKER, 1999; NOLAN et al., 1994).

Na classe dos fenilpirazóis, se encontra o fipronil, que apesar de apresentar sítio de ação diferente das lactonas macrocíclicas, também possui ação no GABA, que é o sistema receptor responsável pela inibição da atividade neuronal. Quando bloqueado, leva a hiperexcitação do sistema nervoso e conseqüente morte do parasito (NARAHASHI et al., 2007). Foi introduzido no controle de carrapatos em 2010, sendo

que os mecanismos responsáveis pela resistência carrapaticida ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, estudos comprovam sua ocorrência nas populações de carrapatos nos anos seguintes à sua introdução (MILLER et al., 2013).

Piretróides são carrapaticidas que atuam no bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos com ação sobre o canal de sódio, o que resulta em repolarização retardada dos axônios nervosos, paralisia e morte do parasito, além de possuírem excelente atividade repelente (NARAHASHI et al., 1971). Começaram a ser utilizados nos anos 80 e em 1990 correspondiam a 25% de todos os pesticidas utilizados no mundo todo, graças a sua seletividade tóxica aos invertebrados (GEORGHIOU, 1990). Em meados de 2000, estudos já tentavam identificar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes a esta classe (JAMROZ et al., 2000).

2.3 Resistência

A resistência desenvolvida por populações de carrapatos tem sido relatada contra quase todos os carrapaticidas convencionais disponíveis, se tornando um grande problema para os pecuaristas do Brasil e do mundo. (CASTRO-JANER et al., 2010; GOMES; MOREIRA; CASTELL-PEREZ, 2011; GUERRERO; DAVEY; MILLER, 2001; MARCHESINI et al., 2020; KLAFKE et al., 2017; VALSONI et al., 2021)

A resistência a produtos químicos é definida como a capacidade adquirida por indivíduos de uma população de parasitos de sobreviver a doses de produtos químicos que são geralmente letais para uma população normal (DONG et al., 2014). Quando um carrapaticida é usado de maneira incorreta e intensivamente, ele provoca uma forte pressão de seleção eliminando os indivíduos sensíveis e atuando como agente de seleção. O desenvolvimento da resistência em populações de *R. microplus* compromete não apenas o produto comercial a que as populações foram expostas, mas pode comprometer todo o grupo químico do princípio ativo utilizado. Assim o desenvolvimento e aprimoramento de bases carrapaticidas são valiosos recursos no âmbito do manejo sanitário dos rebanhos (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018; DONG et al., 2014).

Dentre principais mecanismos de resistência aos parasiticidas em artrópodes, estão os que promovem redução na penetração e o aumento no sequestro e na

detoxificação dos fármacos. Assim, a efetividade dos parasiticidas é reduzida. Também pode levar a diminuição da sensibilidade no local alvo ou alteração do local de destino, reduzindo a eficácia do fármaco (GUERRERO; DAVEY; MILLER, 2001; GUERRERO; LOVIS; MARTINS, 2012). Para *R. microplus*, por exemplo, alterações na cinética de expressão dos canais de sódio é considerado um importante mecanismo envolvido na resistência a piretróides, enquanto o aumento na síntese de enzimas relacionadas à detoxificação de pesticidas é um importante mecanismo envolvido na resistência aos organofosforados (GUERRERO; LOVIS; MARTINS, 2012; BAXTER; BARKER, 1999; NOLAN et al., 1994; JAMROZ et al., 2000).

No caso dos piretróides, que agem nos canais de sódio, induzindo a abertura dos canais e despolarização, permitindo assim a entrada contínua de sódio para dentro da célula, a insensibilidade e resistência podem ocorrer através da substituição de um único nucleotídeo da proteína codificada pelo gene do canal de sódio (LEE et al., 1999).

Resultados recentes têm demonstrado o status avançado da resistência, até mesmo aos grupos químicos mais modernos, para o controle de *R. microplus*, como ao fipronil e fluazuron, mesmo em fazendas sem histórico de uso desses carrapaticidas. Esse fato confirma que o comércio frequente de animais entre fazendas sem o controle adequado e, muitas vezes, sem nenhum tratamento antes ou após o transporte dos animais, propicia o surgimento de populações de carrapatos resistentes a produtos que nem chegaram a ser utilizados na propriedade (VALSONI et al., 2021). No Uruguai, por exemplo, o transporte de animais entre diferentes regiões do país foi considerado a principal causa de dispersão de populações resistentes aos carrapaticidas (MIRABALLES E RIET-CORREA; 2018).

Além disso, erros na aplicação dos produtos carrapaticidas, alta frequência de tratamentos, início dos tratamentos somente após a observação de fêmeas ingurgitadas, intervalo incorreto entre os tratamentos, altas taxas de lotação animal e predominância de raças taurinas, foram apontados como fatores favoráveis ao desenvolvimento da resistência (VILELA et al., 2020).

Outro manejo que predispõe ao desenvolvimento de resistência é a utilização de produtos antiparasitários com efeito carrapaticida, mas com intervalo e dosagem visando atingir outros parasitos. A ivermectina, por exemplo, também é muito usada para controlar nematoides gastrointestinais em bovinos, em intervalos de 30 dias para desparasitação de gado, o que pode contribuir para o cenário de resistência

carrapaticida, aumentando a pressão de seleção sobre as populações de carrapatos (VALSONI et al., 2021).

Ainda, a consequência mais problemática do desenvolvimento de resistência aos carrapaticidas é a seleção de populações de carrapatos com resistência a múltiplos fármacos, em que o controle químico de carrapatos nessas fazendas pode ser seriamente comprometido na ausência de uma abordagem integrada (KLAFKE et al 2017; MARCHESINI et al., 2020; VILELA et al., 2020). Resultados alarmantes de resistência simultânea a pelo menos três carrapaticidas diferentes revelam um novo cenário para o desafio do controle de carrapatos por meio de produtos químicos, considerando que ainda não existem no mercado novas drogas com um novo modo de ação para o controle de carrapatos multirresistentes (KLAFKE et al 2017).

Além disso, estão sendo relatadas novas mutações em *R. microplus* associadas à resistência aos produtos carrapaticidas convencionais (VILLAR et al., 2020). Assim, é de suma importância estabelecer novas ferramentas visando evitar a disseminação de resistência para outras áreas onde esse fenômeno ainda não ocorreu e reduzir a dependência do controle utilizando carrapaticidas convencionais (KLAFKE et al., 2017).

2.4 Alternativas no controle de carrapatos

Diferentes formas de controle têm sido propostas, sendo grande a necessidade de pesquisas que sejam direcionadas à busca de alternativas eficientes de controle do parasito (ABOELHADID et al., 2018; BIEGELMEYER et al., 2012).

Dentre as alternativas e estratégias de controle e prevenção de infestações de carrapatos podem ser citados o manejo de pastagem, controle biológico (como por exemplo, formigas, ácaros predadores, galinhas e outros), o uso de vacinas (quando disponíveis) contra carrapatos ou contra doenças transmitidas por carrapatos, e a utilização de carrapaticidas alternativos (DE LA FUENTE et al., 2016; GHOSH; AZHAHIANAMBI; YADAV, 2007; GOODENOUGH et al., 2017; LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016)

A necessidade de se encontrar alternativas ecologicamente seguras e sustentáveis para o controle de pragas, em substituição ao controle químico convencional, tem alavancado as pesquisas visando identificar compostos com

propriedades carrapaticidas de origem vegetal (BRAGA et al., 2018; CASTRO et al., 2018; PARVEEN et al., 2014).

O uso de óleos essenciais como possíveis métodos alternativos de controle de carrapatos tem sido um dos focos principais de pesquisas, demonstrando resultados promissores (BRAGA et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2018).

2.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis com baixo peso molecular. Podem conter cerca de 2 a 60 componentes em concentrações muito diferentes e são formados, principalmente, por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (CAMPOS et al., 2012; COSTA et al., 2015). O emprego de tais substâncias apresentam inúmeras vantagens comparadas ao uso de inseticidas ou acaricidas sintéticos, como o desenvolvimento mais lento de resistência, menor impacto ao meio ambiente e a saúde humana, além de serem biodegradáveis (EBADOLLAHI, 2013; ISMAN, 2006; MUTURI et al., 2011; PAVELA, 2015).

O desenvolvimento da resistência de pragas contra esses produtos naturais é baixo devido a variada composição dos óleos essenciais e seus múltiplos modos de ação. Assim, mesmo que ocorram populações que desenvolveram determinado mecanismo de resistência a um bioativo, ainda existirão outros componentes com mecanismos de ação diferentes agindo sobre esta população (EBADOLLAHI et al., 2020). Portanto, o uso de óleos essenciais é uma ferramenta inovadora para superar a resistência relatada aos carrapaticidas disponíveis (SALMAN et al., 2020).

Junto a essas vantagens, o impacto ambiental do uso de ativos de origem vegetal é muito menor comparado aos carrapaticidas convencionais, pois estes últimos têm sido considerados responsáveis por contaminação de água potável, resíduos em alimentos, efeitos negativos agudos ou crônicos em mamíferos e organismos não-alvo, como pássaros, abelhas, e outros animais, prejudicando o equilíbrio do ecossistema. O que dificilmente ocorreria com produtos de origem vegetal biodegradáveis, além de que os óleos essenciais geralmente não são tóxicos para mamíferos e outros vertebrados (EBADOLLAHI et al., 2020). Por isso, pesquisas voltadas à prospecção de produtos naturais têm sido cada vez mais necessárias em

virtude do crescimento da importância dada à preservação do meio ambiente e da utilização sustentável de recursos naturais (PAVELA, 2015, SALMAN et al., 2020).

2.5.1 Caracterização química

A composição química dos óleos essenciais e o teor de seus componentes estão diretamente relacionados a sua atividade biológica (ŠARAC et al., 2014). Portanto, a caracterização química destes é uma importante ferramenta na identificação e desenvolvimento de acaricidas naturais (JIA et al., 2018).

Para avaliar o teor e o perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse presentes no óleo essencial, podem ser utilizados métodos cromatográficos e espectroscópicos (ABRANCHES, 2012). Dentre as técnicas usadas atualmente para estudo químico de óleos essenciais destacam-se a Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (ARAÚJO et al., 2019; BOURIAH et al., 2021; CERCEAU et al., 2020; VELOSO et al., 2020).

A cromatografia é uma técnica de separação baseada na distribuição de um composto entre uma fase móvel e outra estacionária. A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica analítica utilizada, principalmente, para a separação de compostos voláteis, apesar de que compostos hidroxilados podem ser analisados através do processo de derivatização com o intuito de aumentar a sua volatilidade. Já a espectrometria de massas (EM) se baseia na ionização das moléculas de interesse e separação dos íons com base em suas diferentes razões massa/carga a fim de se obter informações da massa molar e de características estruturais de substâncias presentes na amostra. É considerada uma técnica sensível de análise molecular, com capacidade de determinar o peso molecular e obter informações estruturais do analito, como o número de insaturações e anéis (HOFFMANN; STROOBAN, 2007). O acoplamento da CG à EM fornece informações que auxiliam na identificação estrutural de cada componente. Assim, CG-EM é uma análise qualitativa importante na identificação de compostos e permite comparação com bibliotecas espectrais (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). Além disso a CG-EM tem sido considerada uma valiosa técnica para análise de componentes não polares e produtos

naturais voláteis, entre eles, mono-, sesqui- e triterpenos (IBEKWE; AMEH, 2015; PATEL et al., 2010).

A técnica analítica de RMN é uma análise que consiste em uma determinação estrutural não destrutiva. É uma ferramenta valiosa na determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto de molécula. Os espectrômetros de ressonância magnética nuclear irradiam o composto com energia eletromagnética numa frequência constante, variando ao mesmo tempo a intensidade do campo magnético. Quando o campo magnético alcança a intensidade adequada, os núcleos absorvem a energia e ocorre a ressonância. Essa absorção provoca uma pequena corrente elétrica que flui ao longo de uma bobina receptora que envolve a amostra. O instrumento então amplifica esta corrente e a exibe como um sinal em um papel gráfico, calibrado em unidades de frequência (Hz). O resultado é um espectro de RMN (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

É uma técnica que fornece informações sobre o número de núcleos atômicos com propriedades magnéticas e momento angular de *spin*. As técnicas disponíveis de RMN, entre outras, são: ^1H , ^{13}C , APT, NOESY, COSY, HMQC e HMBC, HETCOR. Elas permitem identificar a proximidade espacial ou mesmo a conectividade de alguns átomos, auxiliando na elucidação estrutural do composto constituído pelas diferentes partes da molécula (SOLOMONS; FRYHLE, 2002). Vários núcleos podem ser estudados, porém os mais disponíveis são o ^1H e ^{13}C . Porém, apesar do alto potencial da técnica, apresenta uma baixa sensibilidade devido à baixa abundância de núcleo que tenha a propriedade de *spin* natural, com exceção do hidrogênio e também dificuldade em se trabalhar com mistura de solventes, devido à alteração de deslocamento químico.

2.5.2 Óleo essencial de eucalipto

Para o gênero *Eucalyptus* sp., pertencente à família Myrtaceae, já foram descritas cerca de 850 espécies (SLEE et al. 2006; NICOLLE, 2019). Embora o eucalipto contenha um número elevado de espécies diferentes, quase todas as plantações são de espécies que têm um histórico comprovado de desempenho excelente. Essas espécies, conhecidos como as 'Nove Grandes', (HARWOOD, 2011), incluem *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. nitens*,

E. urophylla, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. pellita*, com estes (e seus híbridos) respondendo por mais de 90% da área total de florestas plantadas de eucalipto em todo o mundo. Esses nove gêneros foram estudados extensivamente e são conhecidos por atingir a maior produtividade e valor em relação a qualquer outra espécie na maioria das regiões (STANTURF et al. 2013).

No Brasil, as principais espécies que têm seus óleos essenciais comercializados são *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* (CHAGAS et al., 2002). Embora seja uma planta exótica, pois é de origem australiana, o eucalipto se adaptou bem ao clima tropical no Brasil, (VALVERDE et al., 2004). Estima-se que 76% de toda plantação de eucalipto seja destinada à produção de madeira, e que a produção no país tem sido até maior que em países de clima temperado (FAO, 2016).

Na indústria, além da produção de madeira para serraria, mourões, postes, laminados, o eucalipto também é utilizado na produção de energia, lenha e carvão vegetal, celulose, e extração de óleos e resinas (GAMA-RODRIGUES et al., 2008; GONÇALVES, 1995). Os eucaliptos também possuem uma grande diversidade e alta concentração de óleos essenciais (misturas de mono- e sesquiterpenos) que podem ser extraídos das folhas, que muitas vezes são descartadas pela indústria madeireira (BATISH et al., 2008), mas que podem ser aproveitadas pela indústria farmacêutica, já que os óleos essenciais de eucalipto possuem reconhecida atividade contra fungos, bactérias, insetos e ácaros (MOSSI et al., 2011).

Os estudos com óleos essenciais extraídos de folhas de eucalipto no controle de carrapatos ainda são escassos quando comparado aos estudos de atividade antimicrobiana. Contudo, pesquisas têm demonstrado o potencial desses óleos contra microrganismos e artrópodes (AUYSAWASDI et al., 2016; ELAISSI et al., 2011; GILLES et al., 2010; NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

Dentre as diversas espécies de *Eucalyptus* spp., a composição química dos óleos essenciais pode apresentar composições muito diferentes, apresentando também diferentes atividades biológicas. Em meio aos principais componentes majoritários já observados nas espécies de eucalipto, podem ser citados o α -pineno, *p*-cimeno, limoneno, eugenol, 4-vinilguaiacol, citronellal, 1,8 cineol, entre outros (BATISH et al., 2008; GRISI et al., 2014; LU et al., 2016).

2.5.3 Modo de ação e atividade biológica

A composição dos óleos essenciais de eucalipto varia de espécie para espécie, sendo misturas complexas com dezenas de componentes. Dentre esses, geralmente são dois ou três componentes majoritários que determinam as propriedades biológicas do óleo (BATISH et al., 2008; PAVELA, 2015).

O modo de ação sobre artrópodes, especialmente carrapatos, ainda não está totalmente esclarecido. Adenubi et al., (2018) relataram que dentre os estudos que avaliaram o potencial carrapaticida de plantas, 93% deles determinaram os compostos bioativos presentes, mas apenas 17% tentaram determinar o mecanismo de ação do óleo essencial ou composto isolado.

Entretanto, estudos apontam que tais substâncias atuam em conjunto tanto nos processos fisiológicos quanto comportamentais do parasito, repelindo ou inibindo a alimentação no hospedeiro, bem como interferindo na ecdise, na ruptura da cutícula, na inibição respiratória, reduzindo o crescimento e desenvolvimento, e inibindo a reprodução (COSTA et al., 2015; GHOSH; CHOWDHURY; CHANDRA, 2012; ISMAN, 2000).

Gomes et al. (2014), relataram que o modo de ação do óleo essencial da espécie *Lippia sidoides* por exemplo, que possui em sua composição timol, o-cimene, cariofileno e mirceno, atua bloqueando receptores GABA, prejudicando o fluxo de íons, levando a alterações nos impulsos nervosos e morte do carrapato.

No caso da ação sobre fungos da espécie *Pseudocercospora griseola*, Hoyos et al. (2012), observaram que houve desorganização geral e vazamento do citoplasma, ruptura da membrana plasmática e da parede celular além da perda do conteúdo celular, causando danos irreversíveis na estrutura fúngica.

Em relação à ação antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto sobre bactérias do gênero *Pseudomonas*, existem relatos de alterações desde a permeabilidade da membrana celular até danos na ultraestrutura e morfologia das bactérias (LU et al., 2016).

3. REFERENCIAS

- ADENUBI, O. T. et al. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 779–806, 2018.
- ABOELHADID, S. M. et al. Effect of high concentrations of lufenuron, pyriproxfen and hydroprene on *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Veterinary Parasitology**, v. 256, p. 35–42, 2018.
- ABRANCHES, M. V. **Plantas medicinais e Fitoterápicos: Abordagem teórica com ênfase em nutrição**. 1. ed. Viçosa: A. S. Sistemas, 2012.
- ANDREOTTI, R. et al. **Controle do carrapato por meio de vacina - situação atual e perspectivas**. Campo Grande. Embrapa Gado de Corte, 58p. 2002.
- ARAÚJO, F. D. P. et al. Nanoemulsion containing essential oil from *Xylopiya ochrantha* mart. Produces molluscicidal effects against different species of *Biomphalaria* (*Schistosoma* hosts). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 2, p. 1–8, 2019.
- AUYSAWASDI, N. et al. Improving the effectiveness of three essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). **Parasitology Research**, v. 115, n. 1, p. 99–106, 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BARROS-BATTESTI, D. et al. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. ICTTD; Ins ed. São Paulo; v. 9; 2006.
- BATISH, D. R. et al. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166–2174, 2008.
- BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 11, p. 1765–1774, 1999.
- BIEGELMEYER, P. et al. Bovine resistance to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. **Archivos de zootecnia**, v. 61, n. 0, p. 1–11, 2012.
- BIEGELMEYER, P. et al. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 3–4, p. 231–237, 2015.
- BOOTH, T. H. Eucalypt plantations and climate change. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 28–34, 2013.
- BOURIAH, N. et al. Composition and profiling of essential oil, volatile and crude extract constituents of *Micromeria inodora* growing in western Algeria. **Journal of**

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 195, 2021.

BRAGA, A. G. S. et al. Acaricidal activity of extracts from different structures of *Piper tuberculatum* against larvae and adults of *Rhipicephalus microplus*. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 57–62, 2018.

BROVINI, C. N.; FURLONG, J.; CHAGAS, A. C. DE S. Influência dos fatores climáticos da biologia e no comportamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* a campo. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 71–76, 2003.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2013.

CAMPOS, R. N. S. et al. Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 237, p. 67–78, 2012.

CARDOSO, A. DOS S. et al. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Veterinary Parasitology**, v. 280, p. 109090, 2020.

CASTRO-JANER, E. et al. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3–4, p. 300–306, 2010.

CASTRO, K. N. DE C. et al. In vitro efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2018.

CERCEAU, C. I. et al. ¹H-NMR and GC for detection of adulteration in commercial essential oils of *Cymbopogon* spp. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 1, p. 88–97, 2020.

CHACÓN, S. C. et al. Efeito de Três Temperaturas Constantes Sobre a Fase Não Parasitária de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 12, n. 1, p. 13–20, 2003.

CHAGAS, A. C. DE S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 39, n. 5, p. 247–253, 2002.

CHAGAS, A. C. S. et al. In vitro and in vivo acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 277–284, 2014.

CHAGAS, A. C. DE S. et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427–432, 2016.

CLARK, J. M. et al. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms, and management implications. **Annual Review of Entomology**, 1994.

COSTA, A. V. et al. Chemical composition of essential oil from *Eucalyptus citriodora* leaves and insecticidal activity against *Myzus persicae* and *Frankliniella schultzei*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 2, p. 374–381, 2015.

SILVEIRA, J. A. G.; ARAÚJO, R. N. Atlas de Parasitologia Veterinária. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 92, 2019.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Distinct immune response profile during *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations of guzerat dairy herd according to the maternal lineage ancestry (mitochondrial DNA). **Veterinary Parasitology**, v. 273, p. 36–44, 2019.

DE LA FUENTE, J. et al. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 12, p. 754–769, 2016.

DE OLIVEIRA, M. K. F.; PEDRASSANI, D. Extrato hidroalcoólico de eucalipto, *Eucalyptus dunnii*, no controle do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, p. 41, 2017.

DONG, K. et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 50, p. 1–17, 2014.

DUDAI, Y., BUXBAUM, J.; CORFAS, G.; OFARIM, M. Formamidine interact with *Drosophila* octopamine receptors, alter the flies' behavior and reduce their learning ability. **Journal of Comparative Physiology A.**, v.161, p.739-746, 1987.

EBADOLLAHI, A. Essential Oils Isolated from Myrtaceae Family as Natural Insecticides. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, n. 3, p. 148–175, 2013.

EBADOLLAHI, A.; ZIAEE, M.; PALLA, F. Essential oils extracted from different species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1–15, 2020.

ELAISSI, A. et al. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1427–1434, 2011.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (Colombo, PR). **Plantio de Eucalipto na Pequena Propriedade Rural**, Curitiba, 2000. 32p.

ESTRADA-PEÑA, A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 34, n. 1, p. 53–65, 1 abr. 2015.

EVANS, P.D.; GEE, J.D. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. **Nature**, v.28, p.60-62, 1980.

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

2017, p. 131–136, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The impact of disasters and crises on agriculture and food security.** Rome: FAO; 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cb3673en>. Acesso em: 10 setembro. 2021, 09:30.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Response to Containment of Tick Resistance and Tick-Borne Diseases in Uganda.** Rome: FAO; 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/3/cb1372en/CB1372EN.pdf>. Acesso em: 12 setembro. 2021, 11:30.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities.** Rome: FAO; 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i6030e/i6030e.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2021, 13:30.

FREITAS, M. G.; COSTA, H. M. A.; COSTA, J. O.; IIDE, P. **Entomologia e acarologia Médica e Veterinária.** 4 ed. Belo Horizonte, 1978. p.252

FRITZ, L. C. et al. Avermectin B1a irreversibly blocks postsynaptic potentials at the lobster neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 2062–2066, 1979.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 159, p. 1–7, 2007.

GAMA-RODRIGUES, E. F. DA et al. Alterações na biomassa e na atividade microbiana da serapilheira e do solo, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa por plantações de eucalipto, em diferentes sítios da Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1489–1499, 2008.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, n. SUPPL., 2004.

GEORGHIOU, G.P. Overview of Insecticide Resistance. In: M.B. GREEN, H.M LEBARON E W.K. MOBERG. Managing Resistance to Agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. Washington D.C.: **ACS Symposium Series. American Chemical Society**, n.421, p.18-41, 1990.

GHOSH, A.; CHOWDHURY, N.; CHANDRA, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 5, p. 581–598, 2012.

GHOSH, S.; AZHAHANAMBI, P.; YADAV, M. P. Upcoming and future strategies of tick control: A review. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, n. 2, p. 79–89, 2007.

GILLES, M. et al. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731–737,

2010.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Microencapsulated Antimicrobial Compounds as a Means to Enhance Electron Beam Irradiation Treatment for Inactivation of Pathogens on Fresh Spinach Leaves. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, 2011.

GOMES, G. A. et al. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 41–45, 2014.

GOMES R.C, FEIJÓ G.L.D, CHIARI L. **Evolução e qualidade da pecuária brasileira**. Nota técnica. 1-4. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande. p. 4; 2017.

GONÇALVES, J. L. D. M. Recomendações de Adubação para *Eucalyptus*, Pinus e Espécies Típicas da Mata Atlântica. **Documentos Florestais**, n. 15, p. 1–23, 1995.

GOODENOUGH, A. E. et al. Managing grassland for wildlife: The effects of rotational burning on tick presence and abundance in African savannah habitat. **Wildlife Biology**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

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

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

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p. 1–6, 2012.

GUGLIELMONE, A. A. et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, p. 1–28, 2010.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo. Editora PLÉIADE/FAPESP. 1^oed. 2001. p.218.

GUPTA, S. et al. Esterase mediated resistance in deltamethrin resistant reference tick colony of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 69, n. 2, p. 239–248, 2016.

HARWOOD, C. New introductions - doing it right In: WALKER, J. (Ed.) Developing a eucalypt resource: learning from Australia and elsewhere Wood Christchurch: **University of Canterbury**, 2011. p.125-136.

HIGA, L. DE O. S. et al. Evidence of acaricide resistance in different life stages of *Amblyomma mixtum* and *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from the same farm in the state of Veracruz, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 174,

p. 104837, 2020.

HOFFMANN, E. De; STROOBANT, V. Mass Spectrometry - Principles and Applications. **Mass Spectrometry Reviews** 29; 2007.

HOYOS, J. M. Á. et al. Atividade antifúngica e alterações ultraestruturais em *Pseudocercospora griseola* tratado com óleos essenciais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 270–284, 2012.

IBEKWE, N.; AMEH, S. Hyphenated Techniques in Liquid Chromatography as Current Trends in Natural Products Analysis. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 132–149, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal, 2015**. Disponível em: <https://tinyurl.com/y8vk7u3s>. Acesso em: 20 junho. 2021, 12:00.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8–10, p. 603–608, 2000.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45–66, 2006.

JAMROZ, R. C. et al. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 5, p. 685–695, 2000.

JIA, M. et al. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 59–66, 2018.

JONSSON, N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 193–198, 2007.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 1–10, 2006.

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

KLAFKE, G. M. et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 386–390, 2006.

KRANTZ, G.W.; D.E. WALTER. **A Manual of Acarology**. 3rd ed. Texas Tech University Press, Lubbock, 807 pp. 2009.

KUMAR, R.; SHARMA, A. K.; GHOSH, S. Menace of acaricide resistance in cattle tick, *Rhipicephalus microplus* in India: Status and possible mitigation strategies. **Veterinary Parasitology**, v. 278, p. 108993, 2020.

LEE, T. W. Conversational Interviews. **Using qualitative methods in organisational research**, p. 1–8, 1999.

LE GALL, V. L. **Bases Moleculares da Resistência a Ivermectina em *Rhipicephalus Microplus***. 2016. 113f. Dissertação (Mestrado): São Paulo. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo Departamento de Genética e Biologia, 2016.

LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 573–585, 2016.

LI, A. Y. et al. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 4, p. 482–490, 2003.

LIMA, A. S. et al. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 59–65, 2018.

LU, H. et al. Antimicrobial activity of *Eucalyptus* essential oil against *Pseudomonas* in vitro and potential application in refrigerated storage of pork meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 994–1001, 2016.

MANSON J. M. et al. Effects of oral exposure to trichloroethylene on female reproductive function. **Toxicology**, v. 32, 1984.

MARCHESINI, P. et al. Acaricidal activity of (E) -cinnamaldehyde and α -bisabolol on populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) with different resistance profiles. **Veterinary Parasitology**, v. 286, 2020.

MARTINS, J. R. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.

MILLER, R. J. et al. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1–2, p. 97–101, 2013.

MIRABALLES, C.; CORREA, F. R. A review of the history of research and control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay. **Experimental and Applied Acarology**, n. 0123456789, 2018.

MOLINARO, E. MORAES; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro, v. 4, 476p. 2012.

MONTEIRO, C. M. DE et al. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1295–1300, 2012.

MOSSI, A. J. et al. Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* ssp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 2, p. 273–277, 2011.

MUTURI, E. J. et al. Larval environmental stress alters *Aedes aegypti* competence for *Sindbis* virus. **Tropical Medicine and International Health**, v. 16, n. 8, p. 955–964, 2011.

MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356–362, 2014.

NARAHASHI, T. **Mode of action of pyrethroids**. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, v. 44, 1971. 337-345 p.

NARAHASHI, T. et al. Differential actions of insecticides on target sites: Basis for selective toxicity. **Human and Experimental Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 361–366, 2007.

NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 1, p. 39–47, 2011.

NICOLLE, D. **Classification of the Eucalypts (Angophora, Corymbia and Eucalyptus)**. version 4, 2019. Disponível em: <http://www.dn.com.au/Classification-Of-The-Eucalypts.pdf>. Acesso em: 12 set. 2021, 09:22.

NOGUEIRA, J. A. P. et al. Repellency effect of *Pilocarpus spicatus* A. St.-Hil essential oil and nanoemulsion against *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 215, p. 107919, 2020.

NOLAN, J. **Acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus***. In: REPORT OF WORKSHOP LEADER - FAO/UN consultant, Porto Alegre, RS, Brazil. Abstract... Porto Alegre, 21-25 p; 1994.

NOVATO, T. et al. In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 260, n. July, p. 1–4, 2018.

PARVEEN, S. et al. In vitro evaluation of ethanolic extracts of *Ageratum conyzoides* and *Artemisia absinthium* against cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

PATEL, K. et al. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. **Pharmaceutical Methods**, v. 1, n. 1, p. 2, 2010.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, 2015.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 118–122, 2015.

PEREIRA, M.C. LABRUNA, M.B. Capítulo 3: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M.B.; Szabó, M. P. J.; Klafke, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, controle e resistência (2008). **MedVet Livros**, São Paulo, 15-56, 2008.

PÉREZ DE LEÓN, A. A.; MITCHELL, R. D.; WATSON, D. W. Ectoparasites of Cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 173–185, 2020.

PETROVIĆ, G. et al. Essential oil analysis of different plant parts of *Geocaryum cynapioides* (Guss) L. Engstrand. **Biologica Nyssana**, v. 9, p. 31–35, 2018.

POWELL, R.; REID, T.; Project tick control. **Queensland Agricultura Journal**, v.108, n.6, p.279-300, 1982.

QUADROS, D. G. et al. Plant-derived natural compounds for tick pest control in livestock and wildlife: Pragmatism or Utopia? **Insects**, v. 11, n. 8, p. 1–25, 2020.

QUEIROZ, V. T. DE et al. 1,8-cineole and castor oil in sodium lauryl ether sulphate disrupt reproduction and ovarian tissue of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, 2020.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, 2013.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 3–29, 2018.

SALMAN, M. et al. Veterinary Parasitology Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against *Rhipicephalus* ticks in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 283, n. June, p. 109178, 2020.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S389–S403, 2004.

SANAVRIA, A.; PRATA, M. A. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 5, n. 2, p. 87–90, 1996.

SANTARÉM, V. A.; SARTOR, I. F. The free-living phase and seasonal variation of *Boophilus microplus* in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 11–20, 2003.

ŠARAC, Z. et al. Biological activity of *Pinus nigra* terpenes-Evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. **Computers in Biology and Medicine**, v. 54, n. 1, p. 72–78, 2014.

SERRA-FREIRE, N. M.; SENA, L. M. M. DE; BORSOI, A. B. P. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 2, p. 69–72, 2011.

SLEE, A.V.; BROOKER, M.I.H.; DUFFY, S.M.; WEST, J.G. **Euclid, Eucalypts of Australia**. 3ª Ed. CSIRO Publishing, Australia, 2006.

SILVA, R. C. E et al. Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from *Psidium* Species and Their Biological Properties. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 965, 2021.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 490p. 2007.

SOLOMONS T. W. G.; FRYHLE C. B. **Química Orgânica**, 7a Ed., V.1, São Paulo, 2002.

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

STANTURF, J. A. et al. *Eucalyptus* beyond Its Native Range: Environmental Issues in Exotic Bioenergy Plantations. **International Journal of Forestry Research**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. Tradução da 4ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2017.

TEMPLETON, W. An introduction of the chemistry of terpenoids and steroids. In: DUNKEL, F.V. & SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. ssp. *vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2021. **Cattle & Beef**. Washington, D.C.: Economic Research Service. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/brazil-livestock-and-products-annual-8>. Acesso em: 12 setembro. 2021.

VALSONI, L. M. et al. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluazuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 2961, n. 1, p. 1–7, 2021.

VALVERDE, S. R. et al. O comportamento do mercado da madeira de eucalipto no Brasil. **Biomassa & Energia**, v. 1, n. 4, p. 393-403, 2004

VELOSO, C. A. G. et al. Composição química do óleo essencial de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill e sua atividade antibiofilme. **Brazilian Journal of Development**, v.

6, n. 3, p. 12887–12898, 2020.

VILELA, V. L. R. et al. Ticks and Tick-borne Diseases Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 4, p. 101413, 2020.

VILLAR, D. et al. Resistance profile and molecular characterization of pyrethroid resistance in a *Rhipicephalus microplus* strain from Colombia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 34, n. 1, p. 105–115, 2020.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA DIVERSIDADE QUÍMICA POR CG-EM E RMN DE ^1H E POTENCIAL CARRAPATICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp.

Artigo submetido à publicação ao periódico Journal of Cleaner Production.

RESUMO

PAULUCIO, VANDERSON DE ATAIDE. **ESTUDO DA DIVERSIDADE QUÍMICA POR CG-EM E RMN DE ¹H E POTENCIAL CARRAPATICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus* spp.** 2021.

Considerando a importância do desenvolvimento de tecnologias alternativas no controle de *Rhipicephalus microplus*, o desenvolvimento de resistência aos acaricidas convencionais e a crescente demanda por produtos sustentáveis no controle de parasitos, objetivou-se, com este trabalho o estudo da diversidade química e a avaliação da atividade carrapaticida do óleo essencial de oito espécies de *Eucalyptus* spp. sobre *R. microplus*. A caracterização química foi realizada através da Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas e da Ressonância Magnética Nuclear. O ensaio *in vitro* foi realizado através do teste de pacote larval (LPT). Os monoterpenos hidrocarbonetos representaram mais de 64% das classes e o α -pineno foi componente principal entre os OEs estudados. Através da análise de similaridade química foi possível distinguir dois grupos, em que as espécies *E. smithii* (ESM) e *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (EURC) formaram o mesmo grupo, demonstrando ser significativamente diferentes das demais espécies avaliadas, mas não apresentaram semelhança em relação a atividade carrapaticida. Os componentes α -pineno e 1,8-cineol foram apontados como os compostos que discriminaram essas duas espécies das demais. No ensaio biológico, as espécies *E. grandis* (EGR), *Eucalyptus tereticornis* (ETI) e a espécie híbrida *E. urophylla* x *E. grandis* (EURG) apresentaram valores acima de 99% de mortalidade larval nas concentrações a partir de 1,25% (m v⁻¹). EGR apresentou os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ (0,38 e 0,78% m v⁻¹). Através de análise utilizando a técnica de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonalizado (OPLS-DA), foi possível relacionar os componentes α -pineno e γ -terpineno com a atividade carrapaticida. No ensaio biológico para avaliar a ação destes e outros componentes majoritários isolados e em conjunto, a combinação do α -pineno e γ -terpineno, demonstraram menores valores de CL₅₀ (5,76 m v⁻¹) e CL₉₀ (10,01 m v⁻¹), sendo considerados promissores no desenvolvimento de acaricidas alternativos com vistas ao uso no controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: controle alternativo; monoterpenos; carrapato-do-boi.

ABSTRACT

PAULUCIO, VANDERSON DE ATAIDE. **CHEMICAL DIVERSITY BY GC-MS AND ¹H NMR AND ACARICIDAL ACTIVITY OF *Eucalyptus* spp. ESSENTIAL OILS.** 2021.

Considering the importance of developing alternative technologies in the control of *R. microplus*, the development of resistance to conventional acaricides and the growing demand for sustainable products in the control of parasites, this work aimed to study the chemical diversity and evaluate the tick activity of the essential oil of eight species of *Eucalyptus* spp. about *R. microplus*. The chemical characterization was carried out using Gas Chromatography coupled with a Mass Spectrometer and Nuclear Magnetic Resonance. The in vitro assay was performed using the larval pack test (LPT). Hydrocarbon monoterpenes represented more than 64% of the classes and α -pinene was the main component among the studied EOs. Through the chemical similarity analysis it was possible to distinguish two groups, in which the species *E. smithii* (ESM) and *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (EURC) formed the same group, demonstrating to be significantly different from the other species evaluated, but did not present similarity in relation to the tick activity. The α -pinene and 1,8-cineole components were identified as the compounds that discriminated these two species from the others. In the biological assay, the species *E. grandis* (EGR), *E. tereticornis* (ETI) and the hybrid species *E. urophylla* x *E. grandis* (EURG) presented values above 99% of larval mortality at concentrations from 1.25% (m v⁻¹). EGR showed the lowest values of CL₅₀ and CL₉₀ (0.38 and 0.78% m v⁻¹). Through analysis using the Orthogonalized Partial Least Squares (OPLS-DA) technique, it was possible to relate the α -pinene and γ -terpinene components with the tick activity. In the biological assay to evaluate the action of these and other major components isolated and together, the combination of α -pinene and γ -terpinene, showed lower values of LC₅₀ (5.76 m v⁻¹) and LC₉₀ (10.01 m v⁻¹), being considered promising in the development of alternative acaricides with a view to their use in the control of *R. microplus*.

Keywords: alternative control; monoterpenes; cattle tick.

1. INTRODUÇÃO

Em 2019, o Brasil foi o segundo maior produtor e exportador de carne bovina mundial, alcançando cerca de 10 milhões de toneladas. Mas, apesar das estimativas apontarem crescimento de 4% do rebanho bovino brasileiro em 2021, apontam também queda de 6% da produção de carne bovina no país (USDA, 2021). Embora o Brasil tenha enorme potencial para expandir ainda mais sua produção animal, os parasitas representam sérios problemas para os produtores de carne bovina e de leite (GRISI et al., 2014; JONSSON, 2006), gerando perdas econômicas de cerca de USD 13,9 bilhões por ano, quando os cálculos incluíram uma combinação de endo- e ectoparasitas bovinos (CHAGAS et al., 2016; GRISI et al., 2014; MONTEIRO et al., 2012).

Rhipicephalus microplus é um dos ectoparasitas bovinos de maior relevância mundial e o tratamento químico com carrapaticidas convencionais tem sido o principal método de controle desse parasito. No mercado mundial em 2019, os carrapaticidas representaram cerca de US \$ 275,1 milhões, em que mais da metade correspondia à indústria da pecuária (QUADROS et al., 2020; BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011). Entretanto, há relatos de resistência do carrapato bovino a vários desses produtos, como à cipermetrina, ivermectina, amitraz, deltrametrina e fipronil (CASTRO-JANER et al., 2010; RODRÍGUEZ-HIDALGO et al., 2017; SHYMA et al., 2015).

Em um mundo sustentável é fundamental investir no desenvolvimento de uma indústria farmacêutica fitoterápica, com soluções para a ameaça causada por cepas de carrapatos resistentes e doenças transmitidas por este parasito. Além disso, produtos à base de plantas podem agregar valor aos produtos de origem animal, possibilitando produção de gado orgânico, bem como contribuir na prevenção de contaminação química de alimentos e do meio ambiente (ADENUBI et al., 2018).

Por serem biodegradáveis e de baixa toxicidade aos mamíferos (CLEMENTE et al., 2007), os carrapaticidas de origem vegetal tem um apelo comercial muito grande, atendendo ao clamor da população por produtos sustentáveis e mais seguros (ARAFÁ et al., 2021; BARAN et al., 2020; FIGUEIREDO et al., 2018; JIA et al., 2018). Entretanto, um dos maiores problemas enfrentados no desenvolvimento de formulações carrapaticidas de origem vegetal é a necessidade de material vegetal para produção em grande escala (QUADROS et al., 2020).

Por outro lado, entre as plantas com potencial carrapaticida, o gênero *Eucalyptus* L'Hérit (Myrtaceae) está entre os mais plantados no mundo. Estima-se o valor de seis milhões de hectares de plantações, em sua maioria para indústria madeireira, onde as folhas, frutos e flores geralmente não são aproveitados (CHAGAS et al., 2002; DE OLIVEIRA; PEDRASSANI, 2017). Essas diferentes partes da planta, podem ser utilizadas para extrair óleo essencial (OE), que contém em sua composição uma variedade de compostos químicos, como monoterpenos e compostos fenólicos (DHAKAD et al., 2018; VUONG et al., 2015).

Outro fato a ser considerado entre as etapas do desenvolvimento de formulações carrapaticidas de origem natural é a necessidade de padronização química (QUADROS et al., 2020), pois a composição química dos óleos essenciais pode variar em função de diferentes fatores (ŠARAC et al., 2014). Assim, visando possibilitar a padronização de formulação eficiente, estudos que realizem a caracterização química dos óleos essenciais e identificação dos bioativos relacionados a ação sobre carrapatos representam uma importante ferramenta na identificação e desenvolvimento de carrapaticidas naturais (JIA et al., 2018).

O presente estudo teve por objetivo determinar a composição química de oito espécies de *Eucalyptus* spp. e compará-las quanto à similaridade química. Além disso, este trabalho também avaliou a atividade carrapaticida dos óleos essenciais destas espécies frente a larvas de *R. microplus* visando determinar componentes bioativos através de análise multivariada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas folhas de oito espécies de eucalipto, *Eucalyptus smithii* R.T. Baker (ESM), *Eucalyptus tereticornis* Sm. (ETI), *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake (EURP), *Eucalyptus grandis* W. Hill (EGR), *Eucalyptus alba* Reinw. ex Blume (EAL), *Eucalyptus saligna* Sm. (ESA), e duas espécies híbridas, *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* (EURC) e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (EURG). *Eucalyptus tereticornis* Sm. é sinônimo de *Eucalyptus umbellata* (Gaertn.) Domin e *Leptospermum umbellatum* Gaertn. As sementes desses materiais genéticos foram adquiridas comercialmente e as mudas foram produzidas e transplantadas no Viveiro Experimental do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Campus de Alegre, Espírito Santo, localizado às margens da Rodovia Federal 482, que liga o município de Jerônimo Monteiro ao de Alegre. A coleta das folhas foi realizada a partir das plantas com sete anos, no período da manhã, no mês de fevereiro de 2018. O clima da região é quente e úmido, precipitação média anual de 1200 mm/ano, apresentando estações bem definidas, uma chuvosa e outra seca. A temperatura média anual é de 23 °C (INCAPER, 2011) e a maior parte do relevo da área experimental caracteriza-se por ser plano.

2.2 Análises químicas

2.2.1 Extração de óleos essenciais (OEs), determinação do teor de umidade e rendimento

As amostras das folhas frescas (300 g) foram misturadas com 3 L de água destilada e submetidas à hidrodestilação por 3h a 100 °C, utilizando aparelho do tipo Clevenger. O destilado obtido foi centrifugado por 15min a 25 °C (modelo 206 BL, Fanem-Baby®, São Paulo, Brasil).

Para determinar o teor de umidade, 10 g das folhas trituradas foram submetidos a extração com 125 mL de diclorometano, através do aparelho Dean-Stark sob destilação a 100 °C por 3 h. O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito por Pimentel et al., (2006). Esta técnica baseia-se no princípio da imiscibilidade dos solventes, onde torna-se possível verificar o volume de água no final do procedimento (DEAN; STARK, 1920). Os teores de umidade dos óleos e o rendimento foram calculados a partir das equações 1 e 2, respectivamente:

$$U (\%) = \frac{V_w}{PM} \cdot 100 \quad (1)$$

$$Rendimento (\%) = \frac{OE}{PM - \frac{PM \cdot U}{100}} \quad (2)$$

onde, U = teor de umidade (%); V_w = volume de água (mL); PM = material vegetal (g) e OE = óleo essencial (g).

Cada amostra de OE foi dividida em três partes e armazenada a -20 °C até a análise de CG-EM, RMN de ^1H e bioensaio.

2.2.2 Análise CG-EM identificação e processamento de dados

As análises CG-EM foram realizadas utilizando aparelho Shimadzu GC-2010 Plus / QP Plus 2010 acoplado a detector por ionização de chama (FID) utilizando coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm). As condições cromatográficas e espectrométricas foram dadas da seguinte forma: a taxa de fluxo de gás de arraste (hélio) foi de 1,78 mL. min^{-1} ; temperatura da injeção. = 22 °C; temperatura da coluna. = 40 °C; split ratio = 1:5; pressão da coluna = 100 kPa; programa de temperatura = 40 - 240 °C com 3°C. min^{-1} e 35 min de espera a 240 °C; modo de ionização eletrônica (EI) a 70 eV; faixa de massa = 30 – 700 Da; temperatura da fonte de íons= 200 °C e temperatura da interface. = 240 °C. Aliquota de 1 μL (0,625 μL OE/mL de diclorometano) de cada amostra foi injetado para análise. A concentração de cada constituinte foi calculada como o percentual da área de pico correspondente à área total de todos os picos observados no cromatógrafo. A identificação dos compostos

presentes nos OEs foi realizada comparando-se o índice de retenção (IR), calculado a partir da injeção de uma mistura de alcanos lineares (C₉ – C₂₆) com os da literatura (ADAMS, 2007). A identificação também foi realizada comparando os espectros de massa obtidos experimentalmente com os disponíveis no banco de dados do equipamento (Wiley 7.0 e NIST 11).

Para análise de similaridade química e bioensaio, todos os perfis CG-EM foram processados *in silico* utilizando o software MZmine. Nesta análise, utilizou-se *peak detection*, *chromatogram builder*, *chromatogram deconvolution* e *join aligner* dos seguintes parâmetros: nível de ruído = 1; intervalo de tempo mínimo = 0,2 min; altura mínima = 1,5; *m/z* tolerância = 0,1 ou 100 ppm; *baseline cut-off algorithm* e *baseline level* = 1. Os dados CG-EM processados foram exportados como tabelas de excel contendo ID, *m/z*, tempo de retenção e área de pico.

2.2.3 Análise de RMN e processamento de dados

Um total de oito óleos essenciais de eucalipto foram analisados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear usando um espectrômetro Bruker, Avance III 500 MHz. Para obter o espectro de ¹H, 100 µL de cada amostra foi diluído em 600 µL de CD₃OD a 0,05% v/v, contendo TMSD, 99,8%. Piridina (1,75% m v⁻¹) foi utilizada como padrão interno nos experimentos com CDCl₃. Para aquisição do espectro unidimensional de prótons (RMN de ¹H) foram obtidas 100 varreduras, e para ¹³C, 1000 varreduras utilizando a sequência de pulso ZG30.

Os dados obtidos pela análise de RMN de ¹H foram processados usando o software MestreNova versão 8 (Mestrelab Research S.L.®) antes da análise multivariada (SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA, 2016). Os espectros de RMN de ¹H dos respectivos extratos foram alinhados e processados no modo espectro ativo. Pré-processamento incluiu a correção de linha de base usando o método *Whittaker-Smoother*, apodização estava em uma função gaussiana de 1 GB [Hz], a normalização estava no sinal mais alto equivalente a 100, suavização foi feita com o método *Savitzky-Golay*, a faixa de intervalo para o espectro completo usou um valor de 0,01 ppm, em seguida, submetido a uma segunda etapa de normalização para normalizar a intensidade de cada intervalo. Os dados de RMN processados foram exportados como tabelas do Excel contendo a intensidade dos sinais para cada

deslocamento químico em intervalos de 0,01 ppm. Foram utilizados valores de deslocamento químico entre 0 a 10 ppm para os dados espectrais ^1H . Os picos de solvente para CD_3OD foram excluídos manualmente no MS-Excel.

2.3 Bioensaio

As larvas de *Rhipicephalus microplus* utilizadas no bioensaio foram provenientes da postura de fêmeas ingurgitadas da cepa MOZO mantidas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, sendo a cultura de carrapatos aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (registro CEUA - nº 4667181218/2019). Fêmeas ingurgitadas foram lavadas em água destilada, secas, colocadas em placas de Petri e mantidas dentro de câmara climatizada (27 ± 1 °C e umidade relativa (RH) >80 %) para oviposição. Após 21 dias, os ovos foram pesados em alíquotas de 200 mg, colocados em seringas plásticas de 5 mL com corte de extremidade distal, e fechados com algodão hidrofílico. As seringas foram então mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade mencionadas anteriormente. Para realização dos testes foram utilizadas larvas de 14 a 21 dias após a eclosão. O experimento foi realizado no Laboratório de Zoologia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo.

2.3.1 Teste de pacote larval (LPT)

O teste do pacote larval foi realizado de acordo com Stone; Haydock, (1962), adaptado por Monteiro et al., (2012). Aproximadamente 100 larvas foram colocadas no centro de papel filtro medindo 6x6 cm. Estes papéis foram então dobrados, e as bordas foram seladas com cliques bulldog. Cada pacote foi umedecido em cada lado com 90 μL da solução a ser testada. Água destilada e 3% (m v^{-1}) o solubilizante Tween 80[®] foram utilizados como tratamento controle negativo. Os grupos experimentais foram mantidos dentro de câmaras climatizadas a 27 ± 1 °C e UR $>80\pm 10$ %. Após 24 horas, os pacotes foram abertos, e tanto as larvas vivas quanto as mortas foram contabilizadas. A capacidade das larvas de se movimentarem na superfície do papel

filtro foi usada como critério para determinar se as larvas estavam vivas ou mortas. A mortalidade foi expressa em porcentagem (larvas mortas totais $\times 100$ / larvas totais).

Experimento 1 – Triagem para seleção dos OEs com maior atividade

O efeito dos OEs das espécies *E. smithii*, *E. tereticornis*, *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. alba*, *E. saligna*, e as espécies híbridas *E. urophylla* x *E. camaldulensis*, e *E. urophylla* x *E. grandis*, nas concentrações de 7,5; 5,0; 2,5 e 1,25% (m v⁻¹), em três repetições, solubilizados em Tween 80® a 3% (m v⁻¹), sobre a mortalidade de larvas de *R. microplus* foi avaliado. Os resultados foram submetidos à análise descritiva e expressos como percentual de mortalidade média \pm erro padrão da média nas concentrações. Foram selecionados os OEs que apresentaram mortalidade próxima a 100% para o cálculo de CL₅₀ e CL₉₀, que foram testados nas concentrações de 0,06 a 2% (m v⁻¹), solubilizados em Tween 80® a 3% (m v⁻¹), com seis repetições de cada concentração. Os dados de mortalidade larval e composição química de cada OE foram confrontados e submetidos a análise multivariada para determinação de componentes bioativos. Com base nos resultados, o OE da espécie que apresentou maior atividade carrapaticida comparado às demais espécies, foi selecionado para os testes seguintes.

Experimento 2 – Determinação de valores de CL₅₀ e CL₉₀ de componentes majoritários e suas misturas

Para validar os resultados obtidos sobre a relação dos componentes bioativos no efeito sobre a mortalidade larval, a atividade carrapaticida dos componentes majoritários do OE da espécie *E. grandis*, foi avaliada individualmente e também das misturas entre eles. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ de três componentes majoritários, limoneno, γ -terpineno e *p*-cimeno, foram determinados através do LPT nas concentrações de 0,25 a 7,5% (m v⁻¹) de cada componente separadamente, diluídos em Tween 80® a 3% (m v⁻¹), com seis repetições cada. As misturas e proporções testadas foram γ -terpineno (29% m v⁻¹) + α -pineno (71% m v⁻¹); γ -terpineno (24,2% m v⁻¹) + α -pineno (59,1% m v⁻¹) + *p*-cimeno (16,7% m v⁻¹); γ -terpineno (23,2% m v⁻¹) + α -pineno (57% m v⁻¹) + *p*-cimeno (16,1% m v⁻¹) + limoneno (3,7%); γ -terpineno (21,5% m v⁻¹) + α -pineno (53,8% m v⁻¹) + *p*-cimeno (15,1% m v⁻¹) + 1,8-cineol (9,2% m v⁻¹); γ -terpineno (21,2% m v⁻¹) + α -pineno (52% m v⁻¹) + *p*-cimeno (14,16% m v⁻¹) + 1,8-cineol (8,9% m v⁻¹) + limoneno (3,3% m v⁻¹). Para determinação dos valores de CL₅₀ e CL₉₀

de cada mistura, foram testadas as concentrações de 1 a 25% (m v⁻¹), diluídos em Tween 80[®] a 3% (m v⁻¹) com seis repetições. As concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) e seus respectivos limites de confiança (IC 95 %), foram calculadas por meio do modelo de Probit, realizado pelo software RStudio (v. 1.3.1093).

2.4 Análise quimiométrica

Para a análise de similaridade química, a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) e a Análise de Componente Principal (PCA) foram realizados pelo software R (v.3.5.1; R Development Core Team, Viena, Áustria) a fim de determinar tendências de agrupamentos. A matriz de dados de CG-EM e RMN de ¹H foram analisadas separadamente. Para a análise de atividade biológica (*in silico*), Mínimos Quadrados Parciais Ortogonalizado – Análise Discriminate (OPLS-DA), foi realizada através do software SIMCA-P (v. 13.0.2.0; Umetrics, Sweden), para determinar os compostos mais correlacionados com a atividade larvicida. Os dados de CG-EM e RMN de ¹H foram analisados por matriz concatenada, que foi gerada pela fusão dos dados (FORSHED et al., 2007) após o procedimento de escalonamento de cada bloco, separadamente (SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA, 2016). O modelo OPLS-DA foi gerado a partir de matriz concatenada em conjunto com os resultados dos testes biológicos. A qualidade do modelo foi descrita pelo coeficiente de explicação (R²X), pelo coeficiente de correlação (R²Y) e pelo coeficiente de predição (Q²) e ANOVA.

3. RESULTADOS

3.1 Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp.

Os rendimentos dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. variaram de 0,35 a 1,36 % (m m⁻¹), cujos maiores rendimentos de óleo foram encontrados para o híbrido *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (1,36%), seguido por *E. smithii* (1,02%), *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (0,85%), *E. tereticornis* (0,71%) e *E. grandis* (0,69%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química e rendimento dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. cultivado na região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil.

(continua)

Componentes	FM	RT*	IR* _{calc.}	RI lit.	<i>Eucalyptus</i> spp. – área de pico (%)								
					EAL	EGR	EURP	ESA	ETI	ESM	EURC	EURG	
isobutyl isobutirato	C ₈ H ₁₆ O ₂	8,13	909	908						0,6			
α-tujeno	C ₁₀ H ₁₆	8,5	917	924				0,81	0,17				
α-pineno	C ₁₀ H ₁₆	8,77	923,44	932	28,34	45,65	38,11	0,24	84,47	8,04	4,82	34,73	
canfeno	C ₁₀ H ₁₆	9,37	936,8	946	0,21	0,49	0,26						0,43
β-pineno	C ₁₀ H ₁₆	10,57	964	974	0,62		22,21		0,19	0,44			0,22
mirceno	C ₁₀ H ₁₆	11,39	982,67	988	0,16		0,5	0,19		0,34	0,11		
α-felandreno	C ₁₀ H ₁₆	11,89	994	1002	0,16		0,54	31,94		0,31			0,08
isoamil butirato	C ₉ H ₁₈ O ₂	12,46	1006	1007						0,40			
α-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	12,46	1006	1014				0,31					
ρ-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	12,86	1014,13	1020	1,13		0,53	7,67	0,65	2,72	0,61	2,74	
β-felandreno	C ₁₀ H ₁₆	13,02	1018	1025				2,83					
o-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	13,04	1018	1022		12,86							
Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	13,07	1018,63	1024	32,6	2,92	3,42		2,66	7,35	7,07	6,07	
1,8-cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	13,19	1021,14	1026	25,47	7,81	4,07			67,46	70,96	37,08	
(Z)-β-ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	13,63	1030	1032	1,72						0,41	1,56	
(E)-β-ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	13,96	1037	1044	0,08	0,21							
γ-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	14,55	1049,5	1054	0,46	18,59	0,71	0,45		0,11	0,29	0,09	
terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	15,95	1078	1086	0,77		0,33	0,56			0,18	0,12	
isopentil isovalerato	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	16,94	1098,67	1102	0,11						0,15		

Tabela 1 – Composição química e rendimento dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. cultivado na região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil.

(continuação)

Componentes	FM	RT*	IR* _{calc.}	RI lit.	<i>Eucalyptus</i> spp. – área de pico (%)								
					EAL	EGR	EURP	ESA	ETI	ESM	EURC	EURG	
endo-fencol	C ₁₀ H ₁₈ O	17,17	1103	1114	0,12								0,26
α-camfolenal	C ₁₀ H ₁₆ O	17,8	1116	1122						0,17			0,16
trans-pinocarveol	C ₁₀ H ₁₆ O	18,37	1128	1135									0,13
borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	19,78	1156,33	1165	0,13	0,39							0,46
terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	20,33	1167,2	1174	0,15	0,65				0,34	0,61		0,3
α-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	20,99	1180,57	1186	0,65	0,94	0,43			1,74	2		2,78
α-terpinil acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	28,47	1339,75	1346	6,28	1,92					11,73		12,79
(E)-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	31,39	1405,67	1417	0,25		6,48	0,74					
trans-α-bergamoteno	C ₁₅ H ₂₄	32,22	1425	1432						0,16			
aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	32,23	1425	1439			1,28						
α-humuleno	C ₁₅ H ₂₄	32,86	1440	1452			0,71						
alloaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	33,17	1447	1458					0,34				
ledeno	C ₁₅ H ₂₄	34,73	1484	1496			3,45						
biciclogermacreno	C ₁₅ H ₂₄	34,73	1484	1500	0,24				4,96				
germacreno B	C ₁₅ H ₂₄	37,3	1546	1559					0,15				
palustrol	C ₁₅ H ₂₆ O	37,62	1554	1567			0,31						
espatulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	38,04	1564	1577	0,12		2,63	4,02	1,54				
γ-eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	40,59	1628,5	1630					3	1,28			
α-acorenol	C ₁₅ H ₂₆ O	40,88	1636	1632					2,4				

Tabela 1 – Composição química e rendimento dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. cultivado na região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil.

(conclusão)

Componentes	FM	RT*	IR* _{calc.}	RI lit.	<i>Eucalyptus</i> spp. – área de pico (%)								
					EAL	EGR	EURP	ESA	ETI	ESM	EURC	EURG	
β -eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	40,89	1636	1649			0,51						
agarospirol	C ₁₅ H ₂₆ O	41,01	1640	1646			0,69						
Monoterpenos hidrocarbonetos						80,73	66,61	45	88,13	19,31	13,49	46,04	
Monoterpenos Oxigenados					32,91	11,71	4,5	0	1,16	69,55	85,45	53,96	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					0,49	0	11,92	6,19	0,16	0	0	0	
Sesquiterpenos Oxigenados					0,12	0	4,14	4,02	6,94	1,28	0	0	
Não identificado (%)					0,24	7,56	12,84	44,78	3,6	9,85	1,07	0	
Total identificado (%)					99,76	92,44	87,16	55,22	96,4	90,15	98,93	100	
Rendimento OE (%)					0,37	0,69	0,35	0,44	0,71	1,02	1,36	0,85	

Legenda: CAS = Serviço de Resumo Químico; FM = fórmula molecular; MM = massa molar (g/mol); RT = tempo de retenção (min.); Rlit. = índice de retenção literatura de Adams (2007); Rcalc. = índice de retenção calculado em relação a n-alcanos (C9-C26) em uma coluna Rtx-5MS; MS = espectro de massa da biblioteca Wiley 7.0 e NIST 11; Espécies de eucalipto estudadas: *E. alba* (EAL), *E. saligna* (ESA), *E. urophylla* (EURP), *E. grandis* (EGR), *E. tereticornis*, *E. smithii* (ESM), *E. urophylla* x *E. camaldulensis* (EURC) e *E. urophylla* x *E. grandis* (EURG).

A composição química das espécies de *Eucalyptus* spp. investigadas apresentou predominância de monoterpenos de hidrocarbonetos, (mais de 66%), nas espécies *Eucalyptus tereticornis* (ETI), *Eucalyptus grandis* (EGR), *Eucalyptus alba* (EAL) e *Eucalyptus urophylla* (EURP), mostrando α -pineno como componente principal. A classe dos monoterpenos oxigenados, (mais de 53%), foi a segunda classe mais produzida presente nas espécies *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (EURG), *Eucalyptus smithii* (ESM) e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* (EURC), em que o 1,8-cineol (eucaliptol) foi o principal composto encontrado. Observou-se também a presença de sesquiterpenos oxigenados e sesquiterpenos de hidrocarbonetos em baixas concentrações, variando de 0,12-6,94% e de 0,16-11,92%, respectivamente.

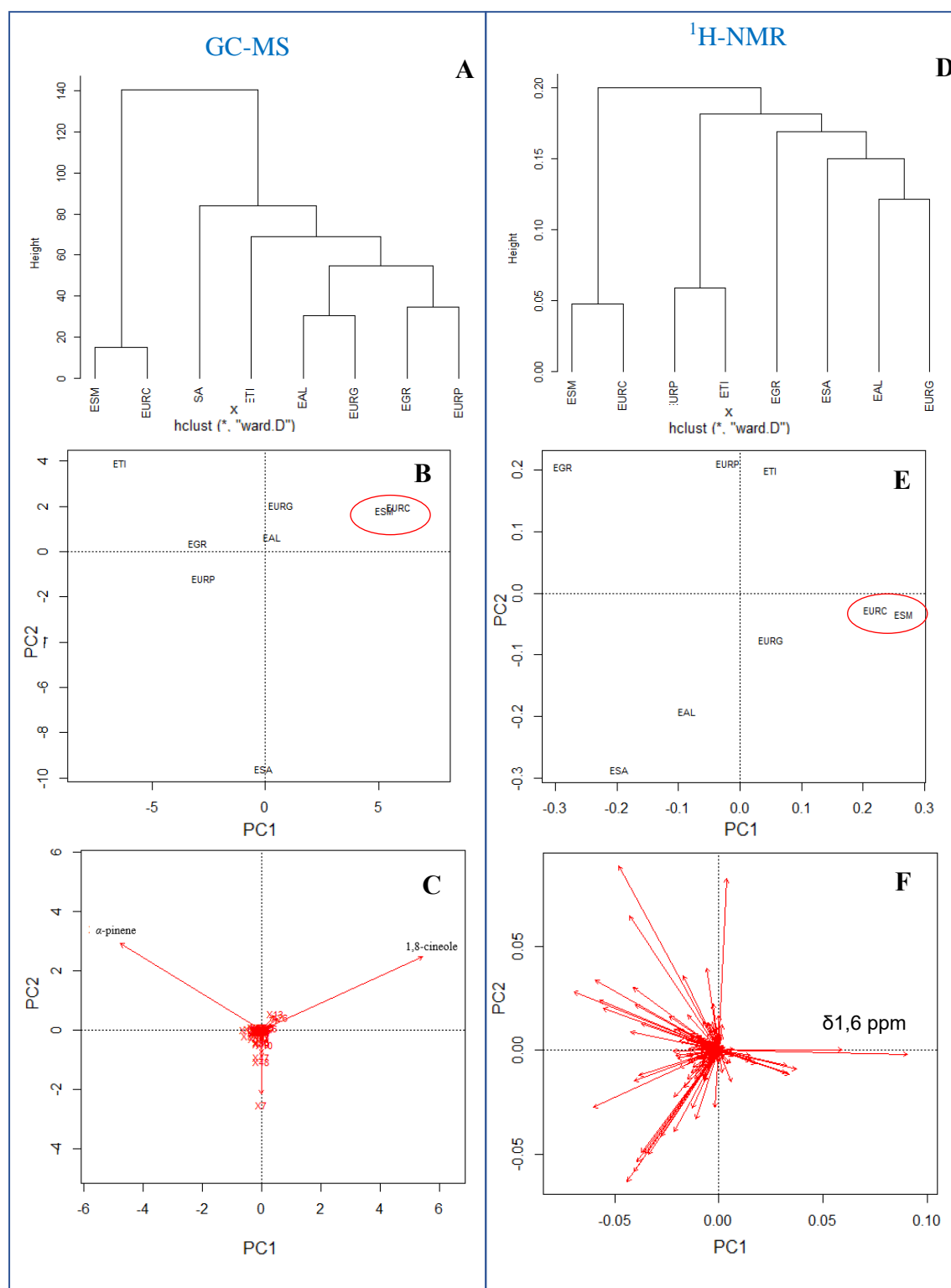
3.2 Análise de similaridade química entre espécies de eucalipto

O processamento dos dados de CG-EM e RMN de ^1H das oito espécies gerou duas matrizes independentes, contendo 1712 e 1001 variáveis, respectivamente.

Na análise HCA, a distância Euclidiana e o algoritmo de ligação *Ward.D* foram usados para realizar o estudo. Estes resultados mostraram que, independentemente da ferramenta analítica usada, ESM e EURC são significativamente diferentes das outras espécies (Figuras 1-A e 1-D). Também foi observado que todos os resultados obtidos das diferentes formas de análise de dados (CG-EM e RMN), seja de forma isolada ou concatenados foram semelhantes.

Na análise de PCA, as matrizes obtidas com os dados de CG-EM e RMN de ^1H explicaram, respectivamente, 99% and 98% da variância apresentada a partir de 6 componentes principais. A análise de PCA e as variáveis peso (*loadings*) de CG-EM apontaram para as variáveis α -pineno e 1,8-cineol como os compostos que discriminaram essas duas espécies das demais (Figuras 1-B e 1-C). Conforme já verificado na Tabela 1, existem altas concentrações de 1,8 cineol e baixas concentrações de α -pineno nas espécies ESM e EURC, justificando a diferenciação destas. Os dados de RMN de ^1H também corroboram com os resultados de similaridade química, o que contribui para a confiabilidade dos resultados obtidos (Figuras. 1-D e 1-E).

Figura 1 - Análise de similaridade química de óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* spp., empregando dados de CG-EM e RMN de ^1H por análise multivariada.



Legenda: (A) análise de HCA de dados de CG-EM; (B-C) PCA e variáveis peso (*loadings*) de dados de CG-EM; (D) análise de HCA de dados RMN de ^1H ; (E-F) PCA e *loadings* de dados de RMN de ^1H .

3.3 Bioensaio

Ao avaliar o efeito dos óleos essenciais extraídos das diferentes espécies do gênero *Eucalyptus* spp. sobre larvas de carrapato da espécie *R. microplus*, observou-se atividade carrapaticida contra essas formas de vida do parasito. Os valores de mortalidade obtidos se encontram na Tabela 2.

Tabela 2- Valores de mortalidade média de larvas de *Rhipicephalus microplus* submetidas a óleos essenciais extraídos das oito espécies de eucalipto avaliadas, em diferentes concentrações.

Espécies	Concentrações % (m v ⁻¹)				
	0,00	1,25	2,50	5,00	7,50
EAL	5,01 ± 3,27*	5,59 ± 0,77	47,22 ± 3,62	97,55 ± 1,72	95,53 ± 3,48
EGR	5,01 ± 3,27	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
EURP	5,01 ± 3,27	5,41 ± 0,09	18,37 ± 3,89	63,83 ± 2,30	93,62 ± 4,43
ESA	5,01 ± 3,27	7,84 ± 0,90	26,10 ± 4,97	86,55 ± 2,56	93,65 ± 2,30
ESM	5,01 ± 3,27	0,00 ± 0,00	9,97 ± 2,49	65,34 ± 7,75	100,00 ± 0,00
ETI	5,01 ± 3,27	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
EURC	5,01 ± 3,27	2,31 ± 1,34	21,06 ± 5,61	96,40 ± 1,80	98,25 ± 0,93
EURG	5,01 ± 3,27	100,00 ± 0,00	99,04 ± 0,48	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Controle negativo	1,09 ± 1,09	1,09 ± 1,09	1,09 ± 1,09	1,09 ± 1,09	1,09 ± 1,09

Legenda: * Erro padrão da média; EAL: *E. alba*; EGR: *E. grandis*; EURP: *E. urophylla*; ESA: *E. saligna*; ESM: *E. smithii*; ETI: *E. tereticornis*; EURC: *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*; EURG: *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*

Frente aos resultados observados, em que EGR, ETI e EURG apresentaram valor de 100% de mortalidade a partir de 1,25% (m v⁻¹), foi feita a determinação das concentrações letais para 50 e 90% das larvas (CL₅₀ e CL₉₀) dessas três espécies de eucalipto com maior atividade carrapaticida (Tabela 3). Os valores de CL₅₀ apresentados pelo óleo essencial de EGR, ETI e EURG foram de 0,38, 0,56 e 0,84 % (m v⁻¹) e os valores observados de CL₉₀ foram de 0,79, 1,02 e 1,83 % (m v⁻¹), respectivamente.

Tabela 3 - Valores de CL₅₀ e CL₉₀ sobre as larvas de *Rhipicephalus microplus* em diferentes tratamentos.

Tratamentos	(continua)			
	CL _{50a} (95% IC ^b)	CL _{90c} (95% IC ^b)	Desvio	R ²
<i>E. grandis</i>	0,38 (0,35-0,41)	0,79 (0,70-0,90)	4,05	0,96
<i>E. tereticornis</i>	0,56 (0,53-0,59)	1,02 (0,95-1,12)	4,88	0,90

Tabela 3 - Valores de CL₅₀ e CL₉₀ sobre as larvas de *Rhipicephalus microplus* em diferentes tratamentos.

(conclusão)

Tratamentos	CL _{50a} (95% IC ^b)	CL _{90c} (95% IC ^b)	Desvio	R ²
<i>E. urograndis</i>	0,84 (0,78-0,90)	1,83 (1,59-2,22)	3,77	0,95
<i>p</i> -cym ³	1,30 (1,25-1,35)	2,48 (2,36-2,62)	4,57	0,94
lim ⁵	1,73 (1,64-1,84)	3,55 (3,24-3,95)	4,13	0,90
γ -ter ²	2,04 (1,97-2,12)	3,99 (3,76-4,26)	4,4	0,97
1,8-cin ⁴	10,85 (10,41-11,30)	19,18 (18,62-21,24)	4,90	0,93
α -pin ¹	37,58 (32,96-44,13)	- ^d	1,90	0,98
α -pin ¹ + γ -ter ²	5,76 (5,37-6,15)	10,01 (9,25-11,02)	5,34	0,96
α -pin ¹ + γ -ter ² + <i>p</i> -cym ³	11,31 (10,09-13,28)	25,61 (20,06-37,39)	3,60	0,94
α -pin ¹ + γ -ter ² + <i>p</i> -cym ³ + 1,8-cin ⁴	10,11 (9,52-10,72)	19,06 (17,22-21,79)	4,65	0,97
α -pin ¹ + γ -ter ² + <i>p</i> -cym ³ + 1,8-cin ⁴ + lim ⁵	16,37 (15,40-17,56)	30,407 (26,61-36,96)	4,76	0,98

Legenda: ¹ α -pineno; ² γ -terpineno; ³ *p*-cimeno; ⁴ 1,8 cineol; ⁵ limoneno; ^a Concentração letal suficiente para matar 50% das larvas; ^b 95% de intervalo de confiança; ^c Concentração letal suficiente para matar 90% das larvas; ^d Não foi possível identificar o valor de CL₉₀.

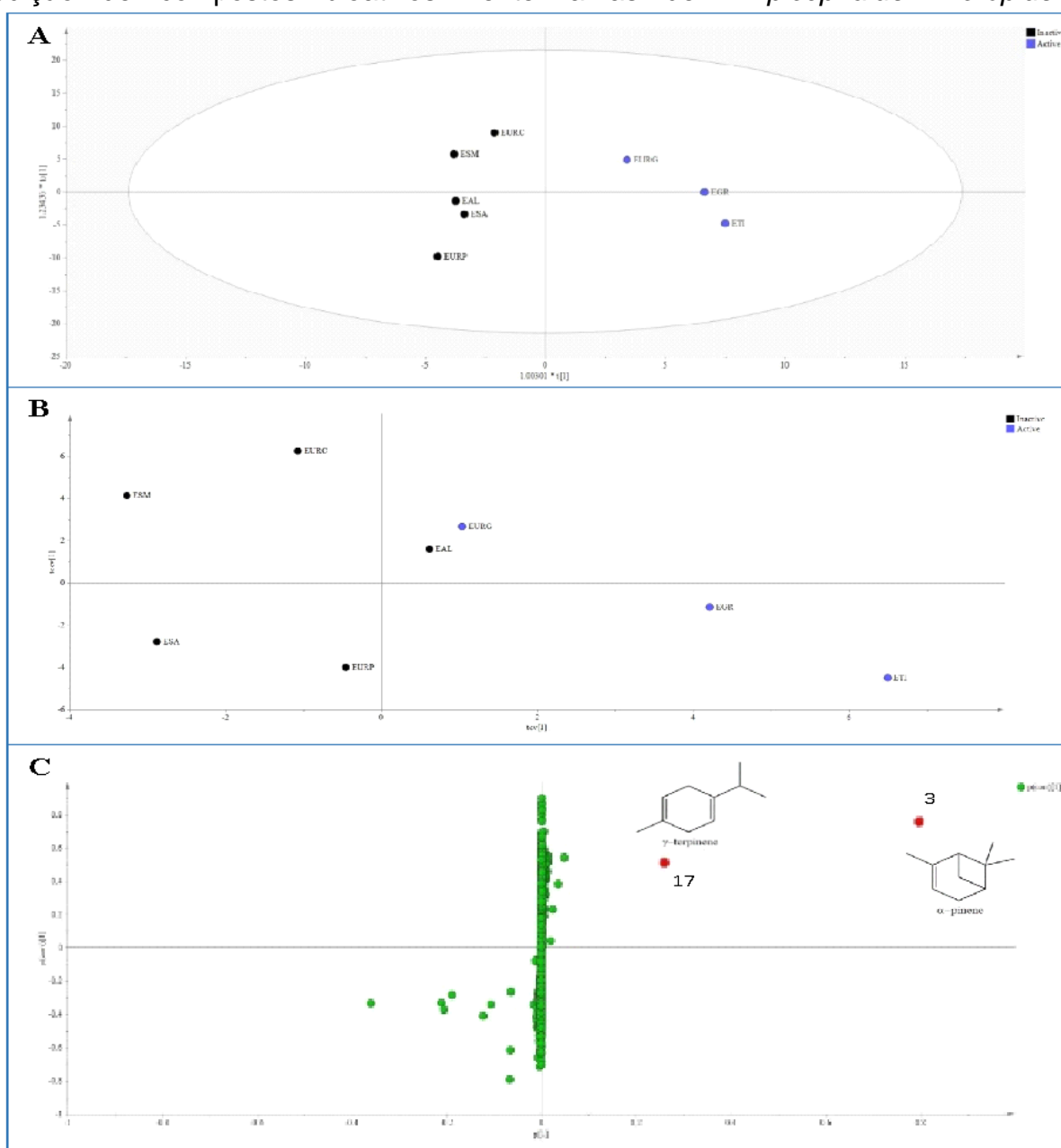
Para os componentes majoritários, limoneno, γ -terpineno, *p*-cimeno, 1,8 cineol e α -pineno foram determinados os valores de CL₅₀ de 1,73, 2,04, 1,30, 10,85 e 37,58% (m v⁻¹), respectivamente. Já, entre os valores de CL₉₀ observados, o *p*-cimeno demonstrou menor valor, 2,48% (m v⁻¹), seguido do limoneno 3,55% (m v⁻¹), γ -terpineno 3,99% (m v⁻¹) e 1,8 cineol com 19,18% (m v⁻¹). Para o componente α -pineno, não foi possível obter dados de CL₉₀ pois apresentou baixa atividade mesmo em altas concentrações. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ da mistura dos componentes majoritários também se encontram na Tabela 3.

3.4 Determinação de componentes bioativos através de OPLS-DA

A matriz concatenada foi submetida à análise multivariada para determinação de componentes bioativos por OPLS-DA. À essa matriz foi adicionada a variável Y de acordo com os resultados obtidos nos testes biológicos na concentração de óleo de 1,25% (m v⁻¹) (Tabela 2). Esse modelo de classificação proporcionou excelente separação entre dois grupos (Figura 2-A) usando três componentes principais a um

nível de significância de 0,05, resultando nos seguintes coeficientes: $R^2X = 0,79$, $R^2Y = 0,93$ e $Q^2 = 0,61$. A qualidade do ajuste do modelo proposto foi confirmada observando a CV-ANOVA ($p < 0,0001$) (Figura 2-B), e observando a validação cruzada a partir da raiz quadrada do erro médio ($RMSE_{cv} = 0,25$) indicando significância estatística. A seleção das variáveis foi realizada por meio do S-plot (Figura 2-C). A partir desta análise supervisionada OPLS-DA, duas variáveis foram altamente correlacionadas com a atividade carrapaticida: α -pineno e γ -terpineno.

Figura 2 - Modelo OPLS-DA do perfil metabólico dos OEs de *Eucalyptus* spp. para predição de compostos bioativos frente larvas de *Rhipicephalus microplus*



Legenda: (A) Plotagem das espécies, (B) Plotagem da validação cruzada (C) S-plot e compostos bioativos. Variáveis relevantes estão destacadas em vermelho.

4. DISCUSSÃO

Apesar do presente estudo apontar para a produção de compostos da classe dos hidrocarbonetos monoterpênicos, tendo como composto majoritário o α -pineno, este fato não se repete nos demais estudos realizados com espécies de eucalipto. Em estudo realizado por Elaissi et al., (2011), que avaliou a composição química do óleo essencial de folhas de 20 espécies do gênero *Eucalyptus* advindos do norte da Tunísia, mostrou que a classe principal de componentes encontrados foi de monoterpênicos oxigenados, em que o 1,8-cineol foi o principal componente majoritário presente. A classe dos sesquiterpenos oxigenados foi a segunda classe principal representada essencialmente por borneol. Somente a terceira classe predominante encontrada foi a dos monoterpênicos hidrocarbonetos, principal classe encontrada no presente estudo, em que o α -pineno foi o composto principal dentro desta classe, assim como no estudo de Elaissi et al., (2011).

Os componentes majoritários relatados por Elaissi et al. (2011) na composição do OE da espécie EGR também apresentaram diferenças entre os resultados do presente estudo. No estudo anterior foram observados níveis relevantes de alfa-felandreno ($6,3 \pm 4,2\%$), biciclogermacreno ($6,7 \pm 3,1\%$), *p*-cimeno ($11,7 \pm 3,2\%$), espatulenol ($15,3 \pm 5,8\%$) e criptona ($5,7 \pm 2,3\%$), em que alguns destes componentes, como criptona, não foram identificados na caracterização do OE da espécie EGR realizada no presente estudo. Os componentes majoritários na composição química do óleo essencial da espécie *E. tereticornis* relatadas por Elaissi et al. (2011), também diferiram dos majoritários para essa espécie observados no presente estudo. Para o óleo essencial da planta advinda da Tunísia, *p*-cymeno (17,5%), espatulenol (12,5%) e limoneno (10%) apresentaram as maiores concentrações na composição do óleo essencial.

De acordo com os nossos resultados, entre as oito espécies avaliadas, ETI foi a espécie que mais produziu α -pineno (84,47%), superando a produção de outros cultivares da mesma espécie. Anteriormente havia sido relatado valor na literatura de 30,1% de α -pineno em cultivares indianas (KAUR et al., 2011). No presente estudo, a espécie híbrida *E. urophylla* x *E. camaldulensis* apresentou as maiores concentrações de 1,8-cineol (70,25%), Tabela 1. Valor semelhante ao relatado por Gallon et al., (2020) em cultivares dessa espécie cultivadas em SC-Brasil e em cultivares de *E. tereticornis* cultivadas no CE-Brasil (COELHO-DE-SOUZA et al., 2005). No entanto,

concentrações elevadas desse composto já foram relatadas em *E. saligna* (93,2%) em cultivares Argentinos (TOLOZA et al., 2006), mas não foi verificado para esta espécie no presente estudo.

Essas diferenças encontradas reforçam que apesar de espécies de plantas do mesmo gênero apresentarem composição semelhante, essa composição pode variar de acordo com níveis de nutrientes do solo, incidência de luz solar, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, dentre outros fatores (JEMÂA et al., 2012; VINTURELLE et al., 2017). Mesmo entre exemplares da mesma espécie, os componentes do OE podem apresentar variações em sua composição e, conseqüentemente, variação na atividade biológica (LIMA et al., 2018; SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA, 2016).

A atividade carrapaticida apresentada pelos OEs das espécies EGR, ETI e EURG foram as mais eficientes em comparação às demais espécies testadas no presente trabalho (Tabela 2) e se mostraram promissoras em relação a outras espécies de *Eucalyptus* spp. já testadas. Chagas et al. (2002), ao avaliar o efeito carrapaticida de três espécies deste gênero nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 30% ($m v^{-1}$) dos OEs solubilizados em metanol, reportaram 100% de mortalidade após a exposição larval ao óleo essencial de *E. citriodora* e *E. staigeriana* a partir da concentração de 10% ($m v^{-1}$). Já o óleo essencial da espécie *E. globulus* apresentou mortalidade de 100% das larvas apenas na concentração de 20% ($m v^{-1}$). Nesse estudo os autores não relataram a composição química dos OEs.

Apesar do estudo de diversidade química agrupar espécies de *Eucalyptus* spp. que apresentam OEs com composição química semelhante, nem sempre a atividade biológica apresentada pelos OEs destas espécies apresentará resultados semelhantes. Tal fato pode ser observado para os OEs das espécies ESM e EURC que se encontram no mesmo grupo (Figuras 1-A e 1-B) e apresentam valores discrepantes para atividade carrapaticida (Tabela 2). A partir da concentração de 5% ($m v^{-1}$) o óleo essencial de EURC apresentou mortalidade larval acima de 96%. Já ESM, apresentou valor de mortalidade larval de apenas 65,34% na mesma concentração. Por outro lado, as espécies EGR, ETI e EURG, pertencentes ao outro grupo, apresentaram valores de mortalidade larval acima de 99% a partir da concentração de 1,25% ($m v^{-1}$).

Embora o OE de espécies de *Eucalyptus* spp. pertencentes a um mesmo grupo apresente constituintes químicos em comum, pequenas variações no teor desses

constituintes e/ou a diferença na composição química dos OEs entre as espécies pode resultar em diferentes respostas biológicas, devido às complexas interações entre os componentes químicos (ALBUQUERQUE et al., 2013; LIMA et al., 2018).

Considerando que os OEs são constituídos por uma mistura complexa de constituintes químicos (COSTA et al., 2015), e que apenas a partir das informações do estudo de diversidade química não é possível estabelecer uma relação direta com a atividade biológica dos OEs, a realização de estudos envolvendo modelos matemáticos para correlacionar a composição química dos OEs e os resultados de atividade biológica são relevantes para o direcionamento dos trabalhos de pesquisa. A realização destes estudos permite a identificação de constituintes químicos presentes nos OEs, como componentes bioativos, que estejam associados à atividade carrapaticida. O desenvolvimento de formulação padronizada a partir da mistura destes componentes minimiza as variações observadas na atividade biológica que pode existir em função de variações sazonais na composição química e/ou teor dos constituintes químicos presentes no OE (CERCEAU et al., 2020, QUADROS et al., 2020).

Os resultados obtidos pela análise utilizando Mínimos Quadrados Parciais Ortogonalizado – Análise Discriminate (OPLS-DA) para correlacionar a composição química e atividade biológica de cada espécie de *Eucalyptus* spp., apontaram que os componentes majoritários α -pineno e γ -terpineno estariam associados ao efeito biológico dos OEs (Figura 2-C). Estudos anteriores já apontaram atividade carrapaticida e inseticida de OEs que possuem em sua composição os monoterpenos α -pineno e γ -terpineno (APEL et al., 2009; CETIN et al., 2010; TRABOULSI et al., 2002). Apel et al. (2009), reportaram mortalidade de 100% das larvas de *R. microplus* submetidas ao óleo essencial de *Cunila incana* na concentração de 0,25% (m v⁻¹), que possui o α -pineno como componente majoritário (26,7%).

Entretanto, a influência dos demais componentes do OE no efeito sobre os carrapatos não deve ser ignorada. Os OEs são constituídos de mistura variada de componentes, chegando a conter em sua composição até cerca de 60 constituintes em concentrações diferentes (BAKKALI et al., 2008; COSTA et al., 2015). O sinergismo, antagonismo e efeito aditivo entre tais componentes vêm sendo relatados em estudos recentes (DHINAKARAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019; VINTURELLE et al., 2017). Dhinakaran, Mathew e Munusamy (2019), ao avaliarem a ocorrência de sinergismo entre combinações de diferentes monoterpenos como γ -terpineno e

limoneno, observaram interação sinérgica entre eles e até mesmo efeito aditivo na atividade contra larvas de *Aedes aegypti*.

Assim, no intuito de validar o resultado da análise multivariada que evidenciou os componentes majoritários relacionados com a atividade biológica, e verificar a ação sinérgica entre eles, foi escolhido o OE de EGR e seus constituintes majoritários, incluindo, α -pineno e γ -terpineno para serem testados em combinação. O constituinte *p*-cimeno demonstrou maior eficácia contra larvas de *R. microplus*, com valores de CL₅₀ de 1,30% (m v⁻¹), e CL₉₀ de 2,48% (m v⁻¹). No estudo realizado por Lima et al. (2018), dentre os monoterpenos avaliados, *p*-cimeno também foi o constituinte que apresentou maior atividade carrapaticida (CL₅₀ 0,14% m v⁻¹). Esse monoterpeno hidrocarboneto é encontrado em óleos essenciais de várias espécies e, segundo estudos, contribui com a alta ação carrapaticida do óleo essencial de *O. gratissimum* (CRUZ et al., 2013; LAGE et al., 2015; LIMA et al., 2018).

Os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram os apresentados por limoneno (1,73 e 3,55% m v⁻¹) e γ -terpineno, (2,04 e 3,99% m v⁻¹). Entretanto, Cardoso et al. (2020) relataram que o limoneno possui baixa toxicidade sobre larvas de *R. microplus*. Cardoso et al. (2020), ainda no mesmo estudo, relataram atividade carrapaticida do γ -terpineno com valor de CL₅₀ de 0,31% (m v⁻¹). Assim como Lima et al. (2018), que já haviam relatado valor semelhante (CL₅₀ 0,30% m v⁻¹) para γ -terpineno. Vários monoterpenos aromáticos derivam do γ -terpineno, sendo assim, estes são normalmente encontrados juntos na composição de óleos essenciais (LIMA et al., 2018; POULOSE, 1978).

Os resultados do presente estudo apontaram a baixa atividade carrapaticida dos componentes majoritários α -pineno (CL₅₀ 37,58% m v⁻¹) e 1,8 cineol (CL₅₀ 10,85% m v⁻¹ e CL₉₀ 19,18% m v⁻¹), quando isolados. Essa ineficiência carrapaticida do 1,8 cineol já havia sido relatada por Hüe; Cauquil; Fokou, (2014) e Cardoso et al., (2020), que sugeriram que este constituinte não é absorvido pelas larvas de *R. microplus*, provavelmente devido a sua característica hidrofóbica (CASTRO et al., 2018), ou através da formação de filme que impede a passagem do composto pela cutícula do parasito (CHAGAS et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que os óleos essenciais apresentam atividade biológica superior à de seus componentes isolados (MIRESMALLI; BRADBURY; ISMAN, 2006; SINGH; KOUL; RUP, 2009). Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com a literatura, uma vez que o EGR demonstrou maior eficiência

sobre larvas de *R. microplus* (CL₅₀ 0,38% m v⁻¹ e CL₉₀ 0,78% m v⁻¹), quando comparado a seus constituintes majoritários testados isoladamente.

Apesar de alguns componentes majoritários terem apresentado atividade larvicida considerável quando isolados (Tabela 3), para uma formulação que diminua as chances do desenvolvimento de resistência pelas populações de carrapatos, é interessante que sejam combinados diferentes componentes bioativos para variar os mecanismos de ação, assim como ocorre no óleo essencial (BLANCO et al., 2017; EBADOLAH ET AL, 2020).

Assim, através dos resultados do ensaio biológico da mistura dos componentes majoritários do OE de EGR, a combinação de α -pineno e γ -terpineno apresentou os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ (5,76 e 10,01% m v⁻¹, respectivamente), quando comparados às demais misturas. Esses componentes, α -pineno e γ -terpineno, também foram apontados pela análise multivariada como relacionados a atividade carrapaticida.

O aumento na atividade carrapaticida observada pela mistura dos constituintes majoritários no presente estudo, pode ser atribuída ao efeito sinérgico de combinações de compostos com diferentes mecanismos de ação (BLANCO et al., 2017). Embora, o modo de ação dos componentes do OE seja apenas parcialmente compreendido (DHINAKARAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019), existem relatos de que devido a ampla variação no modo de ação dos óleos essenciais e de seus constituintes, o desenvolvimento de resistência é dificultado, sendo uma importante ferramenta para o controle de pragas (EBADOLLAHI; ZIAEE; PALLA, 2020; SALMAN et al., 2020).

Embora a atividade carrapaticida de espécies do gênero *Eucalyptus* spp. já tenha sido demonstrada em estudos anteriores (ALVES et al., 2014; COSTA et al., 2008; DE OLIVEIRA; PEDRASSANI, 2017), a maioria deles avaliaram o extrato etanólico e não o efeito dos óleos essenciais. Apesar de haver pouca informação disponível sobre o efeito dos óleos essenciais das diferentes espécies de eucalipto sobre carrapatos da espécie *R. microplus*, o referido estudo expande o conhecimento existente na literatura a respeito da atividade carrapaticida de OEs das espécies de eucalipto.

5. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos pela análise de similaridade química, as espécies ESM e EURC formaram o mesmo grupo, tanto para os dados de CG-EM quanto para RMN, diferenciando-se significativamente de todas as demais espécies avaliadas. Entretanto, apesar da similaridade química, não apresentaram atividade biológica semelhante. Os OEs das espécies ETI, EURG e EGR apresentaram atividade carrapaticida relevante na menor concentração testada (1,25% m v⁻¹), demonstrando potencial para controle do carrapato da espécie *R. microplus*. Os resultados obtidos na análise multivariada apontaram os componentes α -pineno e γ -terpineno como possíveis componentes bioativos relacionados ao efeito carrapaticida.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007, 804 p.
- ADENUBI, O. T. et al. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 779–806, 2018.
- ALBUQUERQUE, E. L. D. et al. Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. **Acta Tropica**, v. 127, n. 3, p. 181–186, 2013.
- ALVES, R. H. et al. Efeito do extrato etanólico de *Eucalyptus* sp. sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 113, 2014.
- APEL, M. A. et al. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, v. 105, n. 3, p. 863–868, 2009.
- ARAFÁ, W. M. et al. Control of *Rhipicephalus annulatus* resistant to deltamethrin by spraying infested cattle with synergistic *Eucalyptus* essential oil-thymol-deltamethrin combination. **Veterinary Parasitology**, v. 290, 2021.
- ASHOUR, H. M. Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, n. 3, p. 399–403, 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BARAN, A. I. et al. In vitro acaricidal activity of essential oil and alcoholic extract of *Trachyspermum ammi* against *Dermanyssus gallinae*. **Veterinary Parasitology**, v. 278, n. September 2019, p. 109030, 2020.
- BATISTA-PEREIRA, L. G. et al. Electrophysiological responses of *Eucalyptus* brown looper *Thyrintina arnobia* to essential oils of seven *Eucalyptus* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 555–561, 2006.
- BLANCO, A. R. et al. Efficacy of a fixed combination of tetracycline, chloramphenicol, and colistimethate sodium for treatment of *candida albicans* keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 10, p. 4292-4298, 2017.
- BOBIS, O. et al. *Eucalyptus* honey: Quality parameters, chemical composition and health-promoting properties. **Food Chemistry**, v. 325, p. 1–14, 2020.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D. DE; BARBOSA, C. DA S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p. 89–96, 2011.

BRASESCO, C. et al. Assessing in vitro acaricidal effect and joint action of a binary mixture between essential oil compounds (Thymol, phellandrene, eucalyptol, cinnamaldehyde, myrcene, carvacrol) over ectoparasitic mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). **Journal of Apicultural Science**, v. 61, n. 2, p. 203–215, 2017.

BUTLER, J.; POTTS, B. **More than a score: 21 eucalypt species with plantation potential**. 1ed. University of Tasmania, AU: Plant Science, 2018.

CAMILO, C. J. et al. Acaricidal activity of essential oils. **Trends in Phytochemical Research**, v. 1, n. 4, p. 183–198, 2017.

CARDOSO, A. DOS S. et al. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Veterinary Parasitology**, v. 280, p. 109090, 2020.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CASTRO-JANER, E. et al. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3–4, p. 300–306, 2010.

CASTRO, K. N. DE C. et al. In vitro efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2018.

CERCEAU, C. I. et al. ¹H-NMR and GC for detection of adulteration in commercial essential oils of *Cymbopogon* ssp. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 1, p. 88–97, 2020.

CETIN, H. et al. Veterinary Parasitology Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 287–290, 2010.

CHAGAS, A. C. DE S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 39, n. 5, p. 247–253, 2002.

CHAGAS, A. C. DE S. et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427–432, 2016.

CLEMENTE, M. A. et al. Avaliação do potencial de plantas medicinais no controle de

Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). **Medicina**, p. 516–518, 2007.

COELHO-DE-SOUZA, L. N. et al. Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its main constituent 1,8-Cineole on Guinea-Pig Tracheal Smooth Muscle. **Planta Med**, p. 8–10, 2005.

COELHO, L. et al. Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. **Veterinary Parasitology**, v. 277, n. August 2019, p. 108989, 2020.

COSTA, A. V. et al. Chemical composition of essential oil from *Eucalyptus citriodora* leaves and insecticidal activity against *Myzus persicae* and *Frankliniella schultzei*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 2, p. 374–381, 2015.

COSTA, F. B. et al. Eficácia de fitoterápicos em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião oeste do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 83-86, 2008.

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

DE OLIVEIRA, M. K. F.; PEDRASSANI, D. Extrato hidroalcoólico de eucalipto, *Eucalyptus dunnii*, no controle do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, p. 41, 2017.

DE SOUZA, M. A. et al. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 160–165, 2019.

DEAN, E. W.; STARK, D. D. A convenient method for the determination of water in petroleum and other organic emulsions. **Industrial e Engineering Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 486–490, 1920.

DHAKAD, A. K. et al. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 3, p. 833–848, 2018.

DHINAKARAN, S. R.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Synergistic terpene combinations as larvicides against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. **Drug Development Research**, v. 80, n. 6, p. 791–799, 2019.

DUH, P. DER et al. Antiproliferative activity and apoptosis induction of *Eucalyptus citriodora* resin and its major bioactive compound in melanoma B16F10 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 32, p. 7866–7872, 2012.

EBADOLLAHI, A.; ZIAEE, M.; PALLA, F. Essential oils extracted from different species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1–15, 2020.

ELAISSI, A. et al. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1427–1434, 2011.

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

FILOMENO, C. A. et al. The Chemical Diversity of *Eucalyptus* spp. Essential Oils from Plants Grown in Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, p. 1656–1665, 2016.

FORSLED, J.; IDBORG, H.; JACOBSSON, S. P. Evaluation of different techniques for data fusion of LC/MS and ¹H-NMR. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 85, n. 1, p. 102–109, 2007.

GALLON, C. et al. Chemistry matters: biological activity of *Eucalyptus* essential oils on mosquito larval mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 168, n. 5, p. 407–415, 2020.

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

HÜE, T.; CAUQUIL, L.; FOKOU, J. B. H. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum* species on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Parasitology research**, v. 114, n. 1, p. 91-99, 2014.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA E EXTENSÃO RURAL – Incaper. **Programa de assistência técnica e extensão rural (PROATER) 2011 – 2013**. Disponível em: <http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Caparao/Jeronimo_Monteiro.pdf>. Acesso em: 09 set. 2020.

JEMÂA, J. M. BEN et al. Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five *Eucalyptus* essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, p. 61–67, 2012.

JIA, M. et al. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 59–66, 2018.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 1–10, 2006.

KAUR, S. et al. Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 4, p. 297–302, 2011.

LAGE, T. C. DE A. et al. Experimental Parasitology Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* de Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ix. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 24–29,

2015.

LANUSSE, C. et al. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 34, n.8, p. 664-682, 2018.

LEM, M. F. et al. In Vitro ovicidal and larvicidal activities of stem bark of *Terminalia glaucescens* (Combretaceae) against *Haemonchus contortus*; **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 19, p. 2859–2868, 2014.

LIMA, A. S. et al. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 59–65, 2018.

MACEDO, I. T. F. et al. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1–2, p. 93–98, 2010.

MIRESMAILLI, S.; BRADBURY, R.; ISMAN, M. B. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 62, n. 4, p. 366-371, 2006.

MOJICA, E.-R. E; DEOCARIS, C. C.; ENDRIGA, M. A. Essential oils as anti-protozoal agents. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 29, n. 3, p. 41–43, 2004.

MONTEIRO, C. M. DE et al. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1295–1300, 2012.

PIMENTEL, F. A. et al. A Convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

POULOSE, A. J. Synthetase: A key enzyme monoterpenes' in the biosynthesis of aromatic enzyme assay and protein determination substrates and reagents. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 191, n. 1, p. 400-411, 1978.

QUADROS, D. G. et al. Plant-derived natural compounds for tick pest control in livestock and wildlife: Pragmatism or Utopia? **Insects**, v. 11, n. 8, p. 1–25, 2020.

RODRÍGUEZ-HIDALGO, R. et al. The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2017.

SALMAN, M. et al. Veterinary Parasitology Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against *Rhipicephalus* ticks in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109178, 2020.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

ŠARAC, Z. et al. Biological activity of *Pinus nigra* terpenes-Evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. **Computers in Biology and Medicine**, v. 54, n. 1, p. 72–78, 2014.

SHEN, K. H.; CHEN, Z. T.; DUH, P. DER. Cytotoxic effect of *Eucalyptus citriodora* resin on human hepatoma HepG2 cells. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 40, n. 2, p. 399–413, 2012.

SHYMA, K. P. et al. In vitro detection of acaricidal resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* against commercial preparation of deltamethrin, flumethrin, and fipronil from north gujarat, India. **Journal of Parasitology Research**, v. 2015, p. 5–7, 2015.

SINGH, R.; KOUL, O.; RUP, P. J. Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera : Pyralidae) **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 29, n. 2, p. 93-101, 2009.

SMORFITT, D. B.; HERBOHN, J. L.; HARRISON, S. R. Australian rainforest timbers as a valuable resource: Community perceptions and purchase habits of rainforest timber products. **Economic Analysis and Policy**, v. 31, n. 2, p. 161–173, 2001.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 3, p. 563–578, 1962.

TOLOZA, A. C. et al. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura : Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, n. Burgess 2004, p. 889–895, 2006.

TRABOULSI, A. F. et al. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). **Pest management science**, v. 58, n. 5, p. 491-495, 2002.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2020. **Cattle & Beef**. Washington, D.C.: Economic Research Service. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/animal-products/cattle-beef/>. Acesso em: 18 mai. 2021.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2021. **Cattle & Beef**. Washington, D.C.: Economic Research Service. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/brazil-livestock-and-products-annual-8>. Acesso em: 12 setembro. 2021.

VINTURELLE, R. et al. *In vitro* evaluation of essential oils derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Biochemistry Research International**, v. 2017, 2017.

VUONG, Q. V. et al. Botanical, phytochemical, and anticancer properties of the *Eucalyptus* species. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 6, p. 907–924, 2015.

ZAMAN, M. A. et al. *In vitro* and *in vivo* acaricidal activity of a herbal extract. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 431–436, 2012.