

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

GABRIELA ROCHA DE ASSUNÇÃO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *in vitro* DE COMPLEXO DE INCLUSÃO
CARVACROL:HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA SOBRE *Rhipicephalus*
microplus (Acari: Ixodidae)

ALEGRE – ES

2021

GABRIELA ROCHA DE ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *in vitro* DE COMPLEXO DE INCLUSÃO
CARVACROL:HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA SOBRE *Rhipicephalus
microplus* (Acari: Ixodidae)**

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
Coorientadora: Profa. Dra. Erika Takagi Nunes

ALEGRE – ES

2021

R672d Rocha de Assunção, Gabriela, 1992-
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO in vitro DE
COMPLEXO DE INCLUSÃO
CARVACROL:HIDROXIPROPIL-?-CICLODEXTRINA
SOBRE Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) / Gabriela
Rocha de Assunção. - 2021.
52 f. : il.

Orientador: Vagner Tebaldi de Queiroz.
Coorientadora: Erika Takagi Nunes.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Parasitologia Veterinária. 2. Bovinos - Parasitos. 3.
Acaricidas. 4. Terpenos. 5. Boophilus microplus. I. Tebaldi de
Queiroz, Vagner. II. Takagi Nunes, Erika. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

GABRIELA ROCHA DE ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *in vitro* DE COMPLEXO DE INCLUSÃO
CARVACROL: HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA SOBRE *Rhipicephalus
microplus* (Acari: Ixodidae)**

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 30/08/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Pesquisadora Dr^a. Bárbara Rauta de Avelar
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Membro externo

Pesquisadora Dr^a. Carla Santana Francisco
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro externo



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 30/11/2021 às 20:17

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/320158?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me criou e me permitiu chegar até aqui;

À Jesus Cristo que morreu por mim para me salvar;

À minha família pelo apoio e amor incondicional;

Ao meu marido pela parceria, companheirismo, paciência e amor;

Ao meu orientador Vagner Tebaldi de Queiroz, por todo aprendizado, pela paciência e auxílio na condução do trabalho;

A minha coorientadora Erika Takagi Nunes, a professora Adriane Cristina Araújo Braga, a professora Isabella Martins por todo auxílio e disponibilização de materiais e equipamentos de laboratório;

À Bárbara Rauta de Avelar, professor Fabio Barbour Scott e ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, que foram fundamentais na parceria para realização da pesquisa;

À pesquisadora Carla Santana Francisco pela contribuição com o estudo e participação essencial na banca examinadora;

Ao Walter Bigui, Priscila Lorenzoni, Natália Guedes, e todos os demais membros do Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS-CNPq), pelo auxílio na execução do projeto, sempre com prontidão e boa vontade;

Aos meus professores nas disciplinas da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias;

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

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

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

Só eu conheço os planos que tenho para vocês: prosperidade e não desgraça e um futuro cheio de esperança. Sou eu, o Senhor, quem está falando. Então vocês vão me chamar e orar a mim, e eu responderei. JEREMIAS 29:11-12

RESUMO

ASSUNÇÃO, GABRIELA ROCHA DE. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *in vitro* DE COMPLEXO DE INCLUSÃO CARVACROL: HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA SOBRE *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** 2021, 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

Rhipicephalus microplus é responsável por significativos prejuízos à bovinocultura mundial e o controle desse parasito vem encontrando barreiras, como a resistência aos carrapaticidas. Carvacrol (CAR) é um potencial carrapaticida alternativo porém, devido a características como volatilidade e baixa dispersibilidade em água, sua aplicação à campo tem sido dificultada. No intuito de minimizar essas características, objetivou-se, com este trabalho, preparar e caracterizar o efeito do complexo de inclusão (CI) contendo CAR e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) sobre larvas de carrapatos *R. microplus*. O CI CAR:HP- β CD foi preparado pelo método de malaxagem e sua formação foi confirmada por análises termogravimétricas, espectroscopia no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Pela análise do gráfico de DTG para o CI não foi observada evidência da presença de CAR livre. Este resultado pode estar relacionado com o aumento na estabilidade do CAR em função da formação do CI. A partir dos espectros do CAR livre e complexado, obtidos por RMN de ^1H , observou-se variação dos deslocamentos químicos para os hidrogênios aromáticos sugerindo a inclusão do CAR na cavidade da HP- β CD. No espectro de ROESY 2D do CI também foi observada interação entre os prótons aromáticos do CAR e da cavidade HP- β CD, mostrando que a molécula de carvacrol é capaz de ser incorporada na cavidade HP- β CD. O efeito carrapaticida do CI foi avaliado através do teste de pacote larval, que, solubilizado em 5% (m v⁻¹) de DMSO, apresentou efeito larvicida (LC₉₀ 9,6 mg/mL) e aumento do tempo de ação do carvacrol, com mortalidade larval de 99,69% após 30h, quando comparados ao carvacrol livre, que apresentou mortalidade larval de 68,25% após mesmo período. Assim, a formação do CI CAR:HP- β CD através da técnica de malaxagem, conferiu proteção do composto ativo, diminuição da volatilidade, garantindo atividade por maior tempo.

Palavras-chave: carrapaticidas alternativos, malaxagem; monoterpenos

ABSTRACT

ASSUNÇÃO, GABRIELA ROCHA DE. **DEVELOPMENT AND ACARICIDE ACTIVITY OF CARVACROL:HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX ON *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2021, 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias -CCAEE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

Rhipicephalus microplus is responsible for significant damage to cattle farming worldwide and the control of this parasite has encountered barriers, such as resistance to ticks. Carvacrol (CAR) is a potential alternative acaricide, however, due to characteristics such as volatility and low dispersibility in water, its application in the field has been difficult. In order to minimize these characteristics, the objective of this work was to prepare and characterize the effect of the inclusion complex (CI) containing CAR and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β CD) on *R. microplus* tick larvae. The CI CAR:HP- β CD was prepared by the kneading method and its formation was confirmed by thermogravimetric analysis, Infrared spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). By analyzing the DTG graph for the IC, no evidence of the presence of free CAR was observed. This result may be related to the increase in stability of the CAR due to the formation of the CI. From the spectra of free and complexed CAR, obtained by ^1H NMR, a variation in chemical shifts for aromatic hydrogens was observed, suggesting the inclusion of CAR in the HP- β CD cavity. In the ROESY 2D spectrum of the CI, an interaction between the aromatic protons of the CAR and the HP- β CD cavity was also observed, showing that the carvacrol molecule is capable of being incorporated into the HP- β CD cavity. The acaricidal effect of CI was evaluated using the larval pack test, which, when solubilized in 5% (m v⁻¹) of DMSO, showed a larvicidal effect (LC₉₀ 9.6 mg/mL) and increased time of action of carvacrol, with larval mortality of 99.69% after 30h, when compared to free carvacrol, which showed larval mortality of 68.25% after the same period. Thus, the formation of CI CAR:HP- β CD through the kneading technique, provided protection of the active compound, decreased volatility, ensuring activity for a longer time.

Key-words: alternative acaricides; kneading; monoterpenes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	14
2.1.1 Classificação taxonômica	14
2.1.2 Ciclo biológico	15
2.1.3 Controle de <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
2.1.4 Potencial dos óleos essenciais para o controle alternativo	16
2.2 Carvacrol	17
2.3 Ciclodextrinas	18
2.3.1 Estrutura e propriedades da β -ciclodextrina e Hidroxipropil- β -ciclodextrina	19
2.3.2 Caracterização dos complexos de inclusão	21
3 REFERÊNCIAS	23
CAPITULO 1 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE CARRAPATICIDA DE COMPLEXO DE INCLUSÃO CARVACROL:HIDROXIPROPIL-β-CICLODEXTRINA SOBRE <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae)	29
RESUMO	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E METODOS	32
2.1 Químicos e reagentes	32
2.2 Complexo de inclusão (CI) e mistura física (MF)	33
2.3 Espectroscopia no infravermelho	33
2.4 Análises termogravimétricas	33
2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	33
2.6 Ensaio carrapaticidas <i>in vitro</i>	34
2.6.1 Teste de pacote de larvas	34
2.6.2 Teste de eficiência ao longo do tempo	35
3 RESULTADOS	35
3.1 Caracterização química	35

3.1.1 Infravermelho	36
3.1.2 Análises termogravimétrica e térmica diferencia I.....	36
3.1.3 Espectroscopia de RMN	38
3.2 Efeito carrapaticida do carvacrol livre e complexado em HP- β CD	39
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE	50

1. INTRODUÇÃO

As infestações por carrapatos, principalmente em bovinos, têm grande importância veterinária devido aos prejuízos causados à produção animal. Os carrapatos estão incluídos entre os vetores de patógenos mais relevantes, afetando bovinos, animais de companhia e humanos no mundo todo (BIGUEZOTON et al., 2016; QUADROS et al., 2020).

Dentre as inúmeras espécies, *Rhipicephalus microplus*, conhecido vulgarmente como carrapato-do-boi, tem se destacado entre os ectoparasitos bovinos de maior relevância mundial, principalmente em países de clima tropical, por seu papel limitante no aumento da produção pecuária, levando a grandes perdas econômicas. É um ectoparasito hematófago que durante o repasto sanguíneo, além de retirar nutrientes e causar irritação e danos ao couro de seu hospedeiro, também é responsável pela transmissão dos agentes patogênicos do complexo da tristeza parasitária, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* (GUGLIELMONE et al., 2014).

No Brasil, as estimativas apontam que os prejuízos decorrentes do parasitismo por esta espécie de carrapato, através dos gastos com tratamento e controle de infestações, redução da produtividade do rebanho e mortalidade dos animais, são da ordem de \$3,24 bilhões por ano (GRISI et al., 2014).

Problemas no controle desse parasito, como a ocorrência de populações resistentes aos carrapaticidas convencionais pelo uso destes de forma demasiada, além do impacto ambiental causado, apontam para a necessidade de se desenvolver novos ativos ambientalmente seguros e dispor de alternativas para controle do parasito (ADENUBI et al., 2018; QUADROS et al., 2020).

A resistência a produtos químicos pode ser definida como a capacidade de alguns indivíduos de uma população de parasitos de sobreviver a doses de produtos químicos que seriam geralmente letais para uma população normal (DONG et al., 2014). Populações de carrapatos resistentes às principais classes de carrapaticidas já foram relatados, como para amidinas (LI et al., 2003), lactonas macrocíclicas (KLAFKE et al., 2006; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018), organofosforados (BAXTER; BARKER, 1999), fenilpirazois (MILLER et al., 2013) aos piretróides (JAMROZ et al., 2000) e benzoilfeniluréias (RECK et al., 2014).

Assim, a utilização de produtos naturais, como os óleos essenciais e seus componentes majoritários, constitui uma boa alternativa para esse fim (PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020). A busca por compostos carrapaticidas derivados de plantas tem sido alvo em vários estudos (COELHO et al., 2020; MARCHESINI et al., 2020; SALMAN et al., 2020). A utilização de óleos essenciais e seus derivados possuem muitas vantagens, como a rápida degradação ambiental, baixa toxicidade para mamíferos e, devido aos variados mecanismos de ação de seus constituintes, o desenvolvimento lento de populações de carrapatos resistentes (ARAFÁ et al., 2020). Também já foram relatadas eficácia ovicida, ação repelente devido aos componentes voláteis e diminuição da eficiência reprodutiva das fêmeas quando expostas a óleos essenciais (CHAGAS et al., 2016).

Diversos avanços têm sido alcançados nesta área nos últimos anos, incluindo o estudo da combinação de produtos de origem natural e sintéticos no controle de carrapatos (ARAFÁ et al., 2021). Também já se sabe que terpenos e fenilpropanóides são geralmente os componentes responsáveis pela maioria das propriedades biológicas dos óleos essenciais (CHAGAS et al., 2016). Carvacrol e timol por exemplo, terpenos derivados principalmente de plantas da família Lamiaceae, apresentaram potencial carrapaticida quando testados isoladamente e em associação (ARÁÚJO et al., 2016; CONCEPCIÓN et al., 2013; SCORALIK et al., 2012).

Entretanto, a utilização de agentes naturais possui limitações, como a necessidade de identificação dos bioativos e seus mecanismos de ação, a padronização química, controle de qualidade e outros desafios, incluindo estabilidade por longo prazo para comercialização, armazenamento e transporte (CAMILO et al., 2017). Devido a natureza hidrofóbica, instabilidade e volatilidade do monoterpeno carvacrol, que apesar de seu efeito carrapaticida conhecido, necessita de métodos que visem possibilitar sua utilização eficiente, como a formação de complexos de inclusão (CI) com outras substâncias (YILDIZ et al., 2018).

Assim, a ciclodextrina (CD) surge como opção. CDs são oligossacarídeos macrocíclicos atóxicos com uma superfície externa hidrofílica e interior hidrofóbico. Possui capacidade de formar CI com grande variedade de componentes orgânicos, conferindo a capacidade de proteção e solubilização aumentada de princípios ativos pouco solúveis (ARIMA; MOTOYAMA; IRIE, 2011; LOFTSSON et al., 2016). Mas a aplicação de CDs ainda se limita pela solubilidade aquosa reduzida. Assim, CDs modificadas quimicamente vêm sendo desenvolvidas a fim de contornar os limites de

solubilidade. Hidroxilpropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) é uma alternativa as CDs α -, β - e γ , por possuir solubilidade em água muito maior (GOULD; SCOTT, 2005).

Portanto, torna-se pertinente a avaliação do carvacrol em CI com HP- β CD, visando a obtenção de uma formulação eficiente, estável, biodegradável e não tóxica a mamíferos, com potencial para o controle de *R. microplus*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar *in vitro* o potencial carrapaticida de CI contendo carvacrol e HP- β CD sobre larvas de carrapatos da espécie *R. microplus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A espécie de carrapato *R. microplus* é responsável por significativas perdas para a bovinocultura. Tais efeitos negativos são causados por sua ação direta durante a alimentação por ser um parasito hematófago, o que acaba causando danos ao couro do animal e atuando na redução da produção pela retirada de nutrientes do hospedeiro. Além disso, causa prejuízos com ação indireta na transmissão de patógenos (BIGUEZOTON et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2019).

No Brasil, esta espécie está entre os parasitos de maior importância econômica e sanitária para a bovinocultura, e seu impacto negativo pode chegar a perdas anuais de cerca de 3,23 bilhões de dólares (GRISI et al., 2014).

2.1.1 Classificação taxonômica

Carrapatos da espécie *R. microplus* possuem apêndices articulados e exoesqueleto de quitina sendo classificados no filo Arthropoda. Pertencem a classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, família Ixodidae, se diferenciando morfológicamente por possuírem cabeça/tórax fundidos e apresentarem, na região anterior do corpo, peças bucais quitinizadas (gnatossoma), através do qual o carrapato se fixa no hospedeiro (KRANTZ; WALTER, 2009).

Rhipicephalus microplus é o carrapato da família Ixodidae considerado o principal e mais importante ectoparasito que acomete bovinos nos países de clima tropical. O corpo das espécies da família Ixodidae se caracteriza por ser coberto por uma placa dorsal quitinosa, com superfície contendo manchas, depressões e desenhos. A espécie *R. microplus* possui corpo com formato arredondado, aumentando consideravelmente de tamanho em função do repasto sanguíneo em seu hospedeiro (REY, 1973).

O carrapato desta espécie era anteriormente classificado no gênero *Boophilus* mas, após avaliações morfológicas e moleculares, passou a ser considerado subgênero do gênero *Rhipicephalus*, sendo agora conhecido como *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus*), e a única espécie desse subgênero encontrado no Brasil (MURRELL; BARKER, 2003).

2.1.2 Ciclo biológico

As fases de vida desses carrapatos consistem em: ovo, larva, ninfa e adulto (ESTRADA-PEÑA, 2015). São parasitas hematófagos de animais vertebrados, preferencialmente bovinos, mas já foram encontrados parasitando outros animais domésticos, animais selvagens e humanos (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2016).

Os indivíduos da espécie *R. microplus* são monoxenos e o carrapato desprende-se do hospedeiro apenas na fase de vida adulta para realizar a oviposição no solo sendo que, em todas as fases de vida, a alimentação destes parasitos acontece sobre um único hospedeiro (ESTRADA-PEÑA, 2015).

O ciclo biológico dessa espécie de carrapato pode ser definido em duas fases distintas: a fase parasitária e a fase de vida livre. A duração da fase não parasitária é diretamente influenciada pela temperatura ambiental podendo durar até 3 meses (BROVINI; FURLONG; CHAGAS, 2003). Já a fase parasitária, com duração aproximada de 18 a 21 dias, é pouco influenciada pelas condições climáticas e ambientais, uma vez que a temperatura corporal do hospedeiro permanece relativamente constante (SONENSHINE; ROE, 2014).

A fase de vida livre se inicia com a descida das fêmeas ingurgitadas do hospedeiro para o solo, para realizar a postura dos ovos, passando pelos períodos de pré postura, postura, eclosão larval e o tempo de sobrevivência das larvas na pastagem. As larvas se dirigem para as extremidades do capim até o contato com o hospedeiro e, após fixarem-se no bovino, inicia-se a fase parasitária do ciclo, desenvolvendo em neolarva, metalarva, após cerca de oito dias, da origem a ninfa, adquirindo nova estrutura, com quatro pares de pernas e que, após se alimentarem e mudarem de cutícula, dão origem ao adulto imaturo, diferenciando-se em macho, denominado neandro ou fêmea, denominada neógina. Após maturação sexual as fêmeas passam a ser classificadas como partenógenas e, após fecundação e ingurgitamento são denominadas teleóginas, quando atingem seu tamanho máximo e se dirigem ao solo para postura dos ovos (SONENSHINE; ROE, 2014; SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011).

2.1.3 Controle de *Rhipicephalus microplus*

O valor estimado do mercado mundial de carrapaticidas em 2019 representou cerca de US \$ 275,1 milhões, em que mais da metade correspondia à indústria da pecuária (QUADROS et al., 2020). As classes de produtos químicos mais largamente utilizados no controle de carrapatos na bovinocultura incluem os organofosforados, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis e benzoilfeniluréia (FURLONG; MARTINS, 2000). Atualmente, dentre os carrapaticidas comumente usados, podem ser citados fipronil e permetrina (MANGIA et al., 2018).

Entretanto, o controle de infestação de *R. microplus* nos rebanhos bovinos, através do uso de carrapaticidas químicos convencionais, vem se mostrando cada vez mais ineficaz pelo aumento de populações de carrapatos resistentes às formulações comercialmente disponíveis (KLAFKE et al., 2017). As aplicações sem a troca adequada de princípios ativos e uso incorreto dos produtos químicos têm contribuído para o aumento da resistência dos carrapatos aos produtos utilizados, intoxicação de animais, resíduos em produtos de origem animal e contaminação de solos e águas. Além disso, há um interesse cada vez maior da população por produtos de origem animal com produção sustentável e ecologicamente correta, que não causem efeitos prejudiciais em animais, humanos e ao meio ambiente (QUADROS et al., 2020).

Tais problemas incentivam novas pesquisas científicas visando o desenvolvimento de métodos alternativos de controle do carrapato (BEYS-DA-SILVA et al., 2020; BIEGELMEYER et al., 2012; CAMPOS et al., 2012; KONIG et al., 2019; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018).

2.1.4 Potencial dos óleos essenciais para o controle alternativo

Os métodos de controle atualmente disponíveis, apresentam limitações, como a resistência adquirida pelas populações de carrapatos, impactos ambientais negativos e a potencial contaminação com resíduos de carrapaticidas químicos em alimentos. Welsh et al. (2019), em estudo recente ao comparar dois diferentes métodos de produção leiteira, convencional e orgânica, detectou resíduos de diversos fármacos, incluindo carrapaticidas, em 26 a 60% das amostras de leite coletadas em

fazendas leiteiras convencionais. Rodrigues-Vivaz et al. (2018) relataram que, além de resíduos em alimentos de origem animal, o uso intensivo das formulações convencionais resultaram em populações de carrapatos que apresentam resistência a praticamente todas as principais classes químicas de carrapaticidas disponíveis.

Devido à magnitude das desvantagens e problemas enfrentados pelo uso excessivo e incorreto dos carrapaticidas convencionais, há a enorme necessidade de métodos alternativos no controle do carrapato. Uma dessas alternativas promissoras são carrapaticidas com base em moléculas orgânicas naturais (BANUMATHI et al., 2017; BEYS-DA-SILVA et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2019; NOVATO et al., 2018; QUADROS et al., 2020).

Experimentos *in vitro* com mais de 200 espécies de plantas com potencial para atuar no controle de carrapatos já foram realizados em todo mundo (ADENUBI et al., 2016), e a utilização de óleos essenciais, extratos e componentes isolados de plantas têm sido considerada uma alternativa promissora no controle de carrapatos (ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Os óleos essenciais são classificados como compostos naturais derivados do metabolismo secundário de plantas, entre elas, as famílias Lamiaceae, Verbenaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Zingiberaceae, Euphorbiaceae e Apiaceae. Caracterizam-se por serem compostos naturais, voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos (BAKKALI et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2009).

Porém, o uso de princípios ativos naturais possuem limitações, como a dificuldade na padronização e regularização das formulações e estabilidade que possibilite o transporte e comércio desses produtos (QUADROS et al., 2020). Além disso, pela característica de alguns ativos serem instáveis, voláteis e apresentarem baixa solubilidade em água, é necessário que tais estratégias alternativas sejam aprimoradas e implementadas em conjunto a novas tecnologias para serem aplicados a campo e produzidos em escala comercial (KISS; CADAR; SPÎNU, 2012; MENG et al., 2016; QUADROS et al., 2020).

2.2 Carvacrol

Dentre as classes dos principais metabólitos secundários encontrados na composição de óleos essenciais de espécies vegetais, podem ser citados os fenóis,

compostos fenólicos (flavonoides e não flavonoides), compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinolatos e piridinas) e terpenos ou terpenoides (CUNHA et al., 2016).

Os terpenos constituem 90% das moléculas contidas nos óleos essenciais em que se destaca o carvacrol, um dos constituintes encontrados em maior quantidade em óleos essenciais de espécies de plantas como *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* (BAKKALI et al., 2008).

O monoterpeno carvacrol, assim como seu isômero timol, são terpenos classificados como fenóis, pois possuem grupo hidroxila ligado a um anel aromático em sua estrutura química (FERREIRA et al., 2011).

O potencial da atividade biológica do carvacrol já tem sido estudado por diversos pesquisadores, em que tem demonstrado atividade antimicrobiana, inseticida e reconhecida atividade carrapaticida. Dentre as espécies de carrapatos já relatadas, em que esse monoterpeno teve ação, podem ser citadas *Amblyomma americanum*, *Dermacentor nitens*, *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus sanguineus* e *R. microplus* (ARAÚJO et al., 2016; JORDAN et al., 2011; NOVATO et al., 2018, 2015; PEREIRA JUNIOR et al., 2020; TABARI et al., 2015).

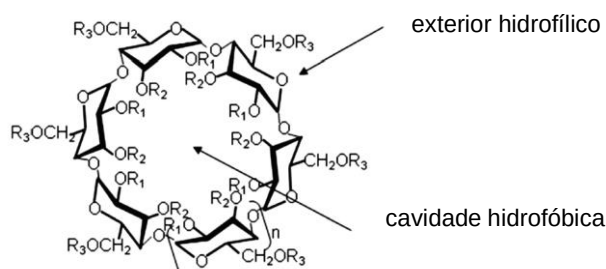
Apesar de seu potencial terapêutico, o carvacrol é uma substância que apresenta alta/elevada volatilidade e baixa dispersibilidade em água, o que dificulta o desenvolvimento de produtos para uso comercial (LIMA et al., 2017). Sendo assim, a utilização de ciclodextrinas representa uma alternativa para formação de CI, visando minimizar tais características não desejáveis (RAKMAI et al., 2018).

Entretanto, são escassos os estudos visando desenvolver formulações carrapaticidas a fim de aprimorar os efeitos desse monoterpeno (DELMONTE et al., 2017; ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Assim, os meios de encapsulamento, proteção e liberação controlada são boas opções para aumentar a estabilidade, reduzir as perdas por evaporação e proteger a molécula do carvacrol contra oxidação e decomposição luminosa ou térmica. A ciclodextrina, um oligossacarídeo cíclico obtido através de hidrólise e conversão enzimática do amido por alguns microrganismos, é um exemplo de substância a ser utilizada nesse sentido (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015; DE ARAÚJO et al., 2003).

2.3. Ciclodextrinas

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos contendo de seis a oito unidades de D-glicopirranose, formando anel com superfície externa hidrofílica e o interior com cavidade central hidrofóbica, podendo acondicionar substâncias de natureza lipofílica (Figura 1) (SALTÃO; VEIGA, 2001; VENTURINI et al., 2008).

Figura 1 - Estrutura e propriedades de ciclodextrinas naturais



Fonte: Arima; Motoyama; Irie, 2011.

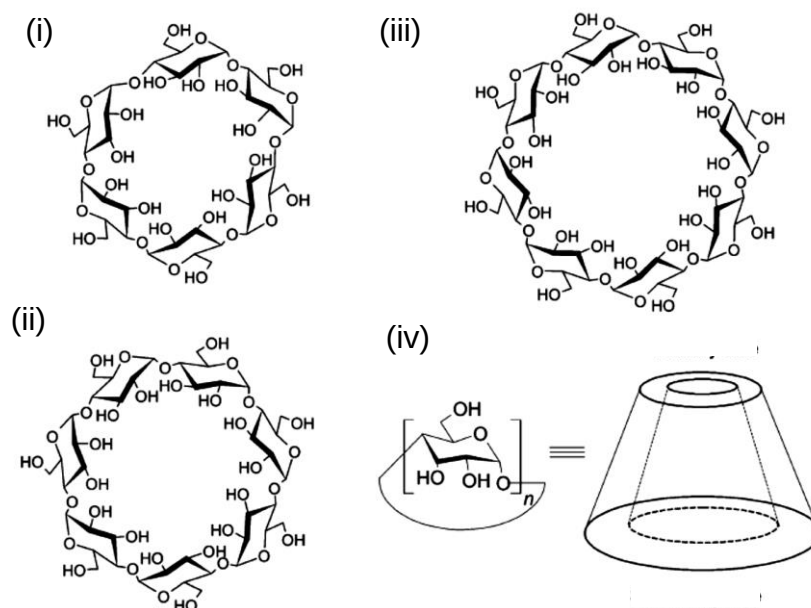
As ciclodextrinas (CDs), são capazes de formar complexos de inclusão (CI) com algumas substâncias, hospedando moléculas do princípio ativo ou alguma parte lipofílica da molécula, na cavidade central (LOFTSSON et al., 2005)

Os CI formados entre as CDs e o agente ativo, como por exemplo entre fitoquímicos, podem melhorar a dispersabilidade, proteger estes compostos bioativos de estresses ambientais e prolongar a taxa de entrega das moléculas (SUVARNA; GUJAR; MURAHARI, 2017).

2.3.1 Estrutura e propriedades da β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina

Devido à formação de cadeias de unidades de glucopirranose, as moléculas de ciclodextrina têm a forma de cones com grupos hidroxila secundários, que se estendem a partir da borda mais larga e os grupos primários da borda mais estreita. As CDs naturais obtidas com maior rendimento são as α -CD; β -CD e γ -CD, com respectivamente 6, 7 e 8 unidades de glicose (Figura 2) (LAI; ROGACH; WONG, 2017). Mas, devido aos altos custos necessários para purificar α - e γ -CDs, mais de 97% das CDs utilizadas são β -CDs (AL-NASIRI et al., 2018).

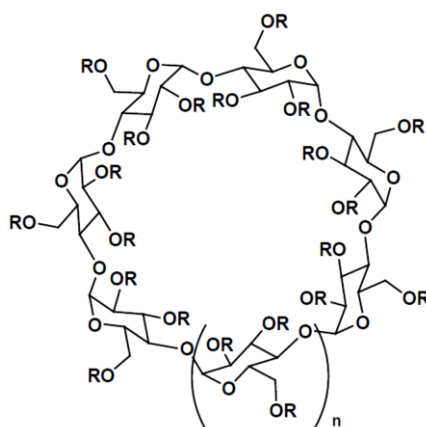
Figura 2 - Estruturas de (i) α -, (ii) β - e (iii) γ -CDs e a morfologia em forma de cone da molécula de CD (iv). Esquema da molécula não desenhado à escala



Fonte: lai; Rogach; Wong, 2017.

Devido as fortes ligações de hidrogênio intramoleculares de β -CD, sua solubilidade em água é reduzida (1,85 g / 100 mL a 25 °C), quando comparada a α - e γ -ciclodextrinas (14,5 g / 100 mL e 23,2 g / 100 mL a 25 ° C, respectivamente) (HISAMATSU; YAMADA, 1989; LIU et al., 2015). Já a hidroxilpropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) (Figura 3), composto derivado de β -CD, possui uma maior solubilidade aquosa (> 500 g / L, 20 ° C), sendo uma das alternativas na formação de complexos de inclusão com outros componentes (SZENTE; SZEJTLI, 1999).

Figura 3 - Estrutura química de hidroxilpropil- β -ciclodextrina.



Fonte: Allouch et al., 2013.

2.3.2 Caracterização dos complexos de inclusão

A caracterização dos complexos constitui uma etapa importante no processo de síntese (BRITTO; NASCIMENTO; DOS SANTOS, 2004). Análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho de Forrier (FTIR) e Ressonância magnética nuclear (RMN) estão entre as técnicas utilizadas atualmente na caracterização de CI (BESERRA-FILHO et al., 2019; KRINGEL et al., 2017; KRINGEL et al. 2020; MARTINS et al., 2020).

No Quadro 1 estão brevemente descritas as principais técnicas empregadas na caracterização de CI (LYRA et al., 2012).

Quadro 1 - Principais técnicas para caracterização de complexos de inclusão.

(continua)

Técnica	Parâmetros pesquisados
Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	Qualitativo. Detecta mudanças significativas na intensidade e região das bandas nos espectros vibracionais dos grupos funcionais das moléculas envolvidas na complexação.
Análise termogravimétrica (TG/DTG)	Quantitativo e qualitativo. Avalia a variação da perda de massa referente aos eventos térmicos, especialmente, desidratação e fusão.
Análise térmica diferencial (DTA)	A diferença na temperatura entre uma amostra e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência ficam sujeitos a um gradiente de temperatura.
Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	Quantitativo e qualitativo. Acompanha a variação de entalpia dos eventos térmicos que ocorrem na amostra em relação a um material de referência termicamente inerte.

Quadro 1 - Principais técnicas para caracterização de complexos de inclusão.
(continuação)

Técnica	Parâmetros pesquisados
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Permite visualizar as interações que ocorrem entre as moléculas hóspedes e as CDs, sendo capaz de diferenciar qual parte da estrutura química do fármaco está sendo complexada.

3. REFERÊNCIAS

- 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.
- ADENUBI, O. T. et al. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 178–193, 2016.
- AL-NASIRI, G. et al. Optimisation of β -cyclodextrin inclusion complexes with natural antimicrobial agents: thymol, carvacrol and linalool. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 1, p. 26–35, 2018.
- ALLOUCH, A. et al. Inclusion Complex of *Thiourea* Substrate with Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Chemical Science Transactions**, v. 2, n. 2, p. 663–669, 2013.
- ARAFA, W. M. et al. Detection of single nucleotide polymorphism in the para-sodium channel gene of *Rhipicephalus annulatus* populations from Egypt resistant to deltamethrin. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 5, p. 101-488, 2020.
- ARAFA, 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.
- ARAÚJO, L. X. et al. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 4, p. 377–382, 2016.
- ARIMA, H.; MOTOYAMA, K.; IRIE, T. Recent Findings on Safety Profiles of Cyclodextrins, Cyclodextrin Conjugates, and Polypseudorotaxanes. **Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications**, p. 91–122, 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BANUMATHI, B. et al. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 102–110, 2017.
- 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.
- BESERRA-FILHO, J. I. A. et al. *Eplingiella fruticosa* leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin produces a superior neuroprotective and behavioral profile in a mice model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 17–29, 2019.

BEYS-DA-SILVA, W. O. et al. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, p. 1–9, 2020.

BIGUEZOTON, A. et al. *Ehrlichia ruminantium* infects *Rhipicephalus microplus* in West Africa. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 4–7, 2016.

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO, C. S.; DOS SANTOS, H. F. Structural analysis of cyclodextrins: A comparative study of classical and quantum mechanical methods. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 882–888, 2004.

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.

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

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.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 284–295, 2015.

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.

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, p. 108–189, 2020.

CONCEPCIÓN, R. L. et al. In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Exp Appl Acarol**, p. 251–257, 2013.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175–181, 2016.

DE ARAÚJO, D. R. et al. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n. 5, p. 663–671, 2003.

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 OLIVEIRA, P. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* in the ovaries

and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) female ticks. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 7, n. 1, p. 28, 2019.

DE OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 771–775, 2009.

DELMONTE, C. et al. Evaluation of the acaricidal activity of thymol incorporated in two formulations for topical use against immature stages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 116, n. 11, p. 2957–2964, 2017.

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

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 2015.

FERREIRA, P. et al. The influence of thymol + DMSO on survival , growth and reproduction of *Bradybaena similaris* (Mollusca : Bradybaenidae). **Zoologia**, v. 28, n. 2, p. 145–150, 2011.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. D. S. Resistências dos carrapatos ao carrapaticidas. **Embrapa Gado de Leite**, p. 25, 2000.

GOULD, S.; SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1451–1459, 2005.

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.

GUGLIELMONE, A. A. et al. The Hard Ticks of the World (Acari, Ixodida, Ixodidae), Springer. **New York, NY, USA**, p. 978-994, 2014.

HISAMATSU, M.; YAMADA, T. Production of Maltosyl β -Cyclodextrin by a Bioreactor System with Pullulanase Immobilized on Partially Deacetylated Chitin. **Starch - Stärke**, v. 41, n. 6, p. 239–242, 1989.

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.

JORDAN, R. A. et al. Suppression of host-seeking ixodes scapularis and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) nymphs after dual applications of plant-derived acaricides in New Jersey. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 659–664, 2011.

KISS, T.; CADAR, D.; SPÎNU, M. Tick prevention at a crossroad: New and renewed solutions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3–4, p. 357–366, 2012.

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.

KONIG, I. F. M. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 766–774, 2019.

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

KRINGEL, D. H. et al. Germinated Wheat Starch as a Substrate to Produce Cyclodextrins: Application in Inclusion Complex to Improve the Thermal Stability of Orange Essential Oil. **Starch/Staerke**, v. 72, n. 1–2, p. 1–7, 2020.

LAI, W. F.; ROGACH, A. L.; WONG, W. T. Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 20, p. 6379–6419, 2017.

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. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 190–194, 2017.

LIU, B. et al. Characterization of the Supramolecular Structure of Polydatin/6-O- α -Maltosyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. C1156–C1161, 2015.

LOFTSSON, T. et al. Cyclodextrins in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1–2, 2005.

LOFTSSON, T. et al. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 544–555, 2016.

LYRA, M. A. M. et al. Study of benzimidazole-cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, n. 1–4, p. 397–404, 2012.

MANGIA, C. et al. Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an *Ixodes ricinus* cell line. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.

MARCHESINI, P. et al. Acaricidal activity of *Acmella oleracea* (Asteraceae) extract

against *Rhipicephalus microplus*: What is the influence of spilanthol? **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109-170, 2020.

MARTINS, L. N. S. B. et al. Inclusion complex of *Callistemon viminalis* essential oil prepared by kneading. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 97, n. 1–2, p. 109–119, 2020.

MENG, H. et al. Evaluation of DEET and eight essential oils for repellency against nymphs of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 68, n. 2, p. 241–249, 2016.

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.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169–172, 2003.

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, p. 1–4, 2018.

PEREIRA JUNIOR, A. M. et al. Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction. **Natural Product Research**, v. 34, n. 23, p. 3428–3431, 2020.

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.

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.

RAKMAI, J. et al. Encapsulation of Essential Oils by Cyclodextrins: Characterization and Evaluation. **Cyclodextrin - A Versatile Ingredient**, IntechOpen, p. 236-290, 2018.

RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 633-641, 1973

RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. et al. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 106–113, 2016.

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.

ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66–76, 2017.

SALMAN, M. et al. Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against *Rhipicephalus ticks* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109-178, 2020.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2001.

SCORALIK, M. G. et al. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitol Res**, p. 645–648, 2012.

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.

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

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122–1144, 2017.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 17–28, 1999.

TABARI, M. A. et al. Carvacrol as a potent natural acaricide against *Dermanyssus gallinae*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3801–3806, 2015.

VENTURINI, C. D. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

YILDIZ, Z. I. et al. Fast-dissolving carvacrol/cyclodextrin inclusion complex electrospun fibers with enhanced thermal stability, water solubility, and antioxidant activity. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 23, p. 15837–15849, 2018.

WELSH, Jean A. et al. Production-related contaminants (pesticides, antibiotics and hormones) in organic and conventionally produced milk samples sold in the USA. **Public health nutrition**, v. 22, n. 16, p. 2972-2980, 2019.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE CARRAPATICIDA DE COMPLEXO DE INCLUSÃO CARVACROL:HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA SOBRE *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Artigo a ser submetido à publicação ao periódico Preventive Veterinary Medicine.

RESUMO

Devido as perdas econômicas causadas pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* e sua resistência aos principais carrapaticidas, o desenvolvimento de formulações com bioativos naturais tem ganhado relevância no meio científico. Entretanto, o monoterpene carvacrol, considerado potencial carrapaticida, apresenta volatilidade e baixa dispersibilidade em água, sendo a utilização de tecnologias como a formação de complexos de inclusão (CI) com ciclodextrinas, alternativas para o desenvolvimento de formulações aplicáveis a campo. No intuito de minimizar essas características, objetivou-se, com este trabalho, preparar e caracterizar o efeito do complexo de inclusão (CI) contendo CAR e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) sobre larvas de carrapatos *R. microplus*. O CI CAR:HP- β CD foi preparado pelo método de malaxagem e sua formação foi confirmada por análises termogravimétricas, espectroscopia no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Pela análise do gráfico de DTG para o CI não foi observada evidência da presença de CAR livre. Este resultado pode estar relacionado com o aumento na estabilidade do CAR em função da formação do CI. A partir dos espectros do CAR livre e complexado, obtidos por RMN de ^1H , observou-se variação dos deslocamentos químicos para os hidrogênios aromáticos sugerindo a inclusão do CAR na cavidade da HP- β CD. No espectro de ROESY 2D do CI também foi observada interação entre os prótons aromáticos do CAR e da cavidade HP- β CD, mostrando que a molécula de carvacrol é capaz de ser incorporada na cavidade HP- β CD. O efeito carrapaticida do CI foi avaliado através do teste de pacote larval, que, solubilizado em 5% (m v⁻¹) de DMSO, apresentou efeito larvicida (LC₉₀ 9,6 mg/mL) e aumento do tempo de ação do carvacrol, com mortalidade larval de 99,69% após 30h, quando comparados ao carvacrol livre, que apresentou mortalidade larval de 68,25% após mesmo período. Assim, a formação do CI CAR:HP- β CD através da técnica de malaxagem, conferiu proteção do composto ativo, diminuição da volatilidade, garantindo atividade por maior tempo.

Palavras-chave: acaricidas alternativos, malaxagem; monoterpenos; larvicida

1. INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus é um dos mais importantes ectoparasitas que afetam o gado bovino em regiões tropicais e subtropicais no mundo todo, sendo responsável por grandes perdas econômicas na pecuária (BANUMATHI et al., 2017; KUMAR; SHARMA; GHOSH, 2020; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Aliado a isso, o controle desses carrapatos é feito principalmente por meio da aplicação de carrapaticidas sintéticos, cujo uso exaustivo e indiscriminado acelerou a seleção de cepas de carrapatos resistentes, demonstrando a necessidade do estudo e desenvolvimento de alternativas que visem diminuir os problemas causados pela infestação por carrapatos (ARAFAT et al., 2020; KLAFKE et al., 2017; VILLAR et al., 2020).

Nesse cenário, pesquisas avaliando produtos naturais como novos ingredientes ativos se tornam cada vez mais relevantes, pois são alternativas mais seguras e sustentáveis, com lento desenvolvimento de resistência por possuírem diversos mecanismos de ação e com mercado consumidor promissor devido a estas características (ADENUBI et al., 2018; ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Entretanto, para a utilização de óleos essenciais (OEs) e seus constituintes como métodos alternativos de controle é preciso contornar as limitações destes, como a instabilidade dos óleos essenciais e seus componentes majoritários, volatilidade e baixa solubilidade em água, o que dificulta a aplicação à campo (BEYS-DA-SILVA et al., 2020; NOVATO et al., 2018).

Nas últimas décadas, diversas tecnologias e sistemas de administração de ingredientes ativos têm sido estudados visando aprimorar a cinética de liberação e absorção e aumentar a estabilidade destas substâncias (CUNHA et al., 2016; BREWSTER; LOFTSSON, 2007). O desenvolvimento destas tecnologias trariam benefícios se aplicadas no controle do carrapato, que necessita cada vez mais de métodos alternativos devido a ineficácia dos métodos de controle disponíveis atualmente (QUADROS et al., 2020). Nesse sentido, a utilização de ciclodextrinas (CDs), tem surgido como alternativa promissora para melhoria de propriedades físico-químicas de ingredientes ativos, como a biodisponibilidade e incrementar sua estabilidade, além de proteger estes compostos bioativos de estresses ambientais

(CHEIRSILP; RAKMAI, 2016; RAKMAI et al., 2018; SUVARNA; GUJAR; MURAHARI, 2017).

CDs são oligossacarídeos cíclicos capazes de formarem complexos de inclusão (CI) com inúmeros fármacos. São constituídas por unidades de glicopirranose unidas por ligações α (1-4), possuindo uma estrutura em forma de cone (CHALLA et al., 2005; CHEIRSILP; RAKMAI, 2016).

Dentre os diferentes tipos de ciclodextrinas (α -CD, β -CD e γ -CD), a β -CD é a mais utilizada devido a facilidade de produção e maior estabilidade, além de custo reduzido; entretanto, essa possui solubilidade limitada (RAKMAI et al. 2018; KRINGEL et al., 2017). Já a hidroxilpropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) é um tipo de CD modificada quimicamente, desenvolvida como alternativa a β -CD por possuir uma maior solubilidade em água (GOULD; SCOTT, 2005).

Existem diversos métodos de preparo de CI, que podem interferir em sua eficiência e aplicabilidade à campo (LIMA et al., 2016). Dentre estes, destaca-se a malaxagem, que consiste em um método de preparo relativamente simples, rápido e de baixo custo, comparado por exemplo à liofilização, que demanda equipamentos específicos e maior tempo para de preparo (CHEIRSILP, RAKMAI, 2016; RUNGSARDTHONG et al., 2011).

Assim, o objetivo do estudo foi preparar, caracterizar e avaliar o efeito do CI contendo carvacrol (CAR) e HP- β CD sobre larvas de carrapatos da espécie *R. microplus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Químicos e reagentes

Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD; M = 1460 g/mol; PubChem SID 24895425, Sigma-Aldrich), Carvacrol (CAR; PubChem SID 24857025, Sigma-Aldrich), Dimetilsulfoxido (DMSO PA 99,9%, Cromoline Química Fina LTDA); etanol (95% PA – Dinâmica) foram adquiridos comercialmente.

2.2. Complexo de inclusão (CI) e mistura física (MF)

O CI foi preparado pelo método de malaxagem com os reagentes CAR e HB- β CD na razão molar 1:1, adaptado de Carvalho et al. (2020). O etanol foi adicionado lentamente sobre a mistura contendo CAR e HP- β CD. Durante a adição do etanol foi realizada a malaxagem manual com auxílio de pistilo por 45 minutos. O composto sólido (CI) foi obtido após secagem por 48h em dessecador à vácuo, em temperatura ambiente. A mistura física foi preparada de modo semelhante, na ausência do etanol.

2.3. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier FT-IR Varian 660. Os valores foram expressos em números de onda (cm^{-1}) no intervalo de 4000-500 cm^{-1} .

2.4. Análises termogravimétricas

As análises termogravimétricas foram realizadas em termoanalisador STA409EP (Netzsch) usando cadinhos de alumina (Al_2O_3) com 2,00 mg de amostra sob uma atmosfera de N_2 (100,0 mL min^{-1}) a uma taxa de aquecimento de 10,0 $^\circ\text{C min}^{-1}$ na temperatura faixa de 30,0 a 525,0 $^\circ\text{C}$.

2.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN (1D e 2D) foram obtidos pelo equipamento Varian 400 MHz (Palo Alto, USA) usando água deuterada (D_2O) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os espectros para análises bidimensionais homonucleares ^1H , 2D ROESY, foram gerados para obter informações da geometria supramolecular dos CI (ROESY spinlock pulse = 1,00 s). A diferença nos desvios

químicos foi calculada para todos os sinais usando a equação: $\Delta\delta = \delta$ (Complexado - Livre) (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2019; SANTANA et al., 2021).

2.6. Ensaios carrapaticidas *in vitro*

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas de bovinos artificialmente infestados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (número de protocolo de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais: n° 4667181218/2019). No Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da UFRRJ, as fêmeas foram mantidas em placas de Petri em câmara climatizada regulada à temperatura de 27 ± 1 °C e $80 \pm 10\%$ de UR para oviposição; após 21 dias, os ovos foram acondicionados em seringas plásticas descartáveis de 5 mL e mantidas em câmara climatizada, também nas condições anteriormente citadas, até a realização dos testes. Foram utilizadas, no ensaio, larvas entre 14 a 21 dias de idade.

2.6.1 Teste de pacote de larvas

Para avaliar o efeito das formulações em estudo sobre os carrapatos, foi utilizado o teste de pacote de larvas (STONE; HAYDOCK, 1962) modificado por (MONTEIRO et al., 2012), em que aproximadamente 100 larvas foram colocadas no centro de um papel de filtro, com dimensões de 6x6 cm, na sequência, esses papéis foram dobrados ao meio e as bordas vedadas por cliques tipo buldog. Em seguida, cada lado externo do papel filtro foi umedecido homogeneamente com 90 µL das soluções a serem testadas, com seis repetições para cada tratamento. As unidades experimentais foram então acondicionadas em câmara climatizada (27°C e UR>80%), e a avaliação da mortalidade foi feita após 24h, quando foi observado o percentual de larvas vivas e mortas.

Como os dados apresentaram distribuição não paramétrica de acordo com o teste de normalidade (D'Agostino-Pearson), as médias dos valores de mortalidade foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram conduzidas usando o software BioEstat 5.0.

Para cálculo das concentrações letais (LC_{50} e LC_{90}) o carvacrol livre foi testado nas concentrações de 0,62, 1,25, 2,50, 3,75, 5, 7,50 e 10 mg/mL. O CI CAR:HP- β CD foi testado em valores de concentração correspondentes ao carvacrol a 5, 7, 8, 9 e 10 mg/mL. Os valores de LC_{50} e LC_{90} e seus respectivos limites de confiança (IC 95 %), foram calculadas por meio do modelo de Probit, realizado pelo software RStudio (v. 1.3.1093).

2.6.2 Teste de eficiência ao longo do tempo

Para avaliação do efeito ao longo do tempo do CI entre carvacrol e hidroxipropil- β -ciclodextrina, preparado pelo método de malaxagem ou mistura física, sobre larvas de *R. microplus*, 2 mL da solução de carvacrol complexado (10 mg/mL) foi transferido para microtubos que permaneceram abertos a 30°C e UR $\geq 40\%$ e fechados em intervalos de 6h até 30h. O teste de pacote larval foi realizado conforme descrito acima com todas as amostras. Como controle negativo utilizou-se água destilada e DMSO.

Os dados gerados foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel, e a análise estatística dos dados foi executada por meio do software GraphPad Prism 9.20 (332), versão Free Trial. O teste de Shapiro Wilk foi realizado para avaliar a distribuição normal dos dados. Os dados paramétricos foram analisados por meio da análise de variância (two-way ANOVA) seguido de Tukey, que avaliou possíveis diferenças estatísticas entre os grupos. Os dados foram considerados diferentes estatisticamente quando ($p < 0,05$).

3.RESULTADOS

3.1 Caracterização química

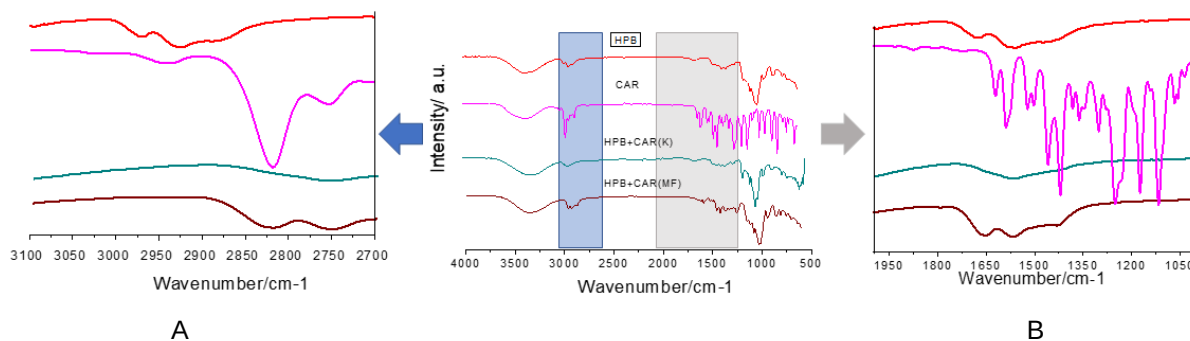
3.1.1 Infravermelho

Em todos os espectros de carvacrol livre (CAR) e da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD), do complexo de inclusão (CI) e da mistura física apareceu uma banda de

absorção larga entre 3300–3500 cm^{-1} , característica do grupo –OH de moléculas de água (Figura 1).

No espectro do HP- β CD observou-se bandas de vibrações de estiramento C–H em 2929 cm^{-1} , vibrações de flexão H–OH em 1649 cm^{-1} , vibrações de dobramento metil em 1375 cm^{-1} , vibrações C–O em 1155 cm^{-1} , vibrações de estiramento C–O–C em 1012 cm^{-1} , vibrações de estiramento C–C em 1083 cm^{-1} , vibrações antissimétrica de grupos metil em 2967 cm^{-1} e ligação glicosídica tipo α em 850 cm^{-1} .

Figura 1 - Espectro de infravermelho (ao centro) das substâncias HP- β CD (vermelho) e carvacrol livre (rosa), do complexo de inclusão CAR:HP- β CD (verde) e da mistura física (marrom). Ampliação do espectro nas regiões 3100 – 2700 cm^{-1} (A) e 1950 – 1050 cm^{-1} (B).

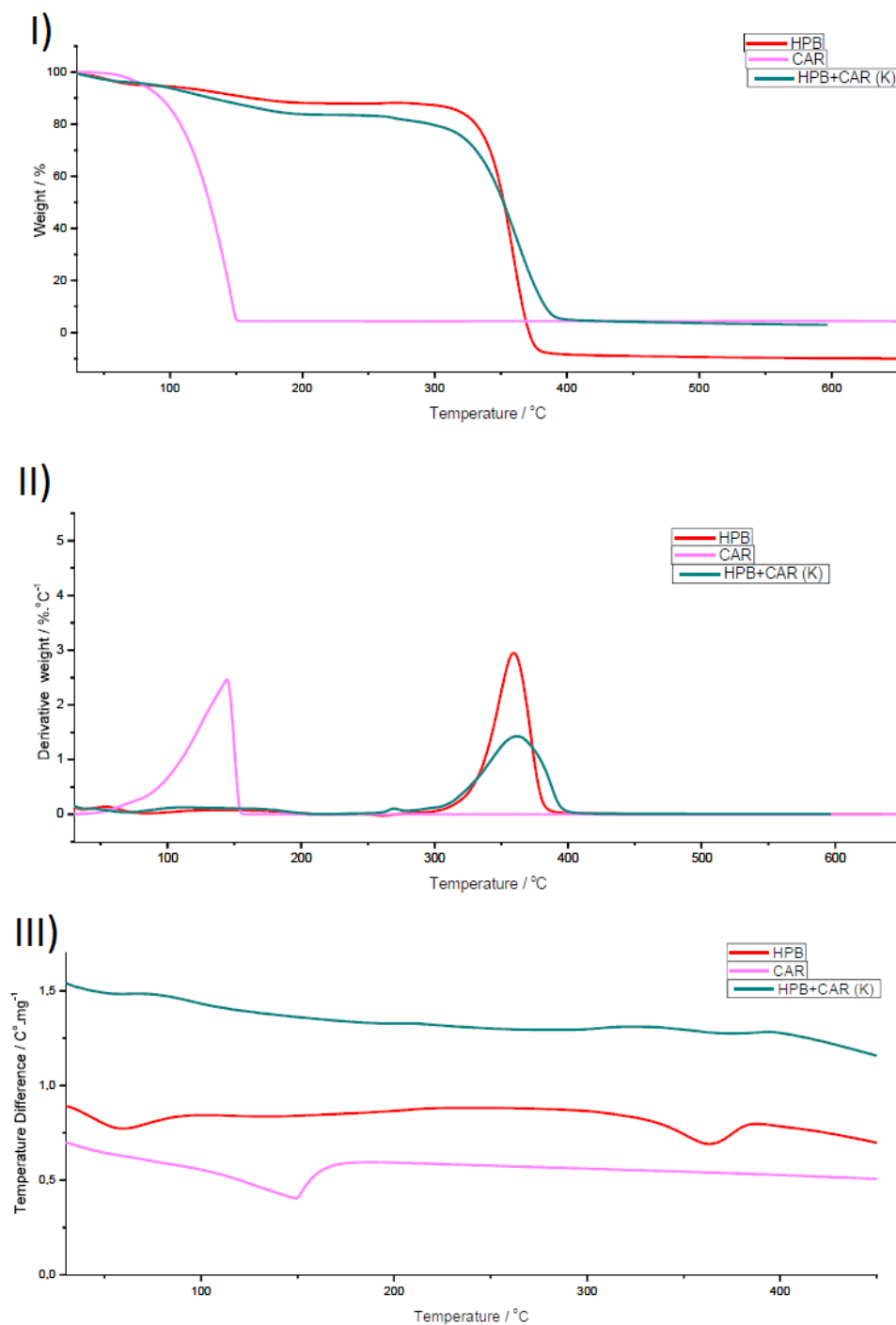


Fonte: arquivo pessoal

3.1.2 Análises termogravimétrica e térmica diferencial

Na Figura 2 estão representados os resultados de termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA) do CAR, da HP- β CD e do CI CAR:HP- β CD.

Figura 2 - Análises térmicas da HP- β CD (vermelho), carvacrol livre (rosa) e o complexo CAR:HP- β CD (verde): (I) perda de massa, (II) DTG e (III) DTA.



Fonte: arquivo pessoal

A partir dos resultados obtidos pelas análises de TG/DTG foi calculada a perda de massa para o CAR, HP- β CD e do CI CAR:HP- β CD (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de perda de massa (%) para o carvacrol (CAR), hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) e do complexo de inclusão carvacrol e hidroxipropil- β -ciclodextrina (CAR:HP- β CD) obtidos por análise termogravimétrica em diferentes intervalos.

Substância	25-180°C	180-294°C	294-425°C	425-700°C
CAR	95,60	0,03	0,00	0,29
HP- β CD	12,60	0,00	73,10	2,80
CAR:HP- β CD	14,55	4,51	75,89	1,44

3.1.3 Espectroscopia de RMN

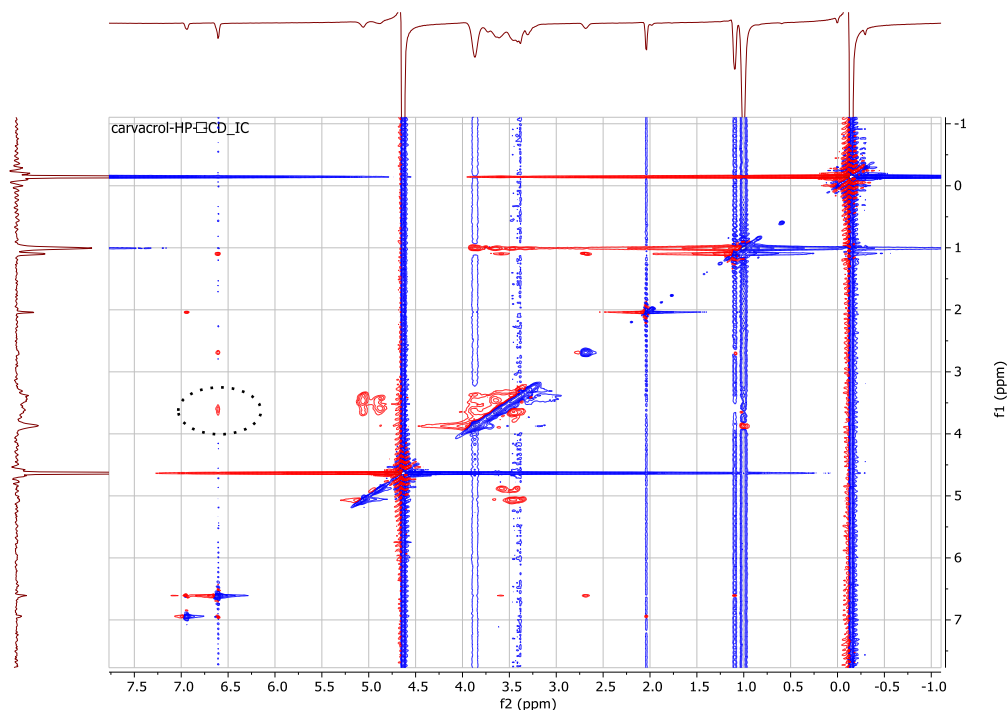
A fim de explorar a possível inclusão de carvacrol na cavidade da HP- β CD, foram realizadas análises de RMN 1D e 2D para ajudar nesta interpretação. As análises de RMN de ^1H foram realizadas para amostras de carvacrol livre (P) e complexo de inclusão (CI). Os resultados dos desvios químicos (δ) de RMN de ^1H do carvacrol, nas formas complexada e livre, em D_2O se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 - Desvios químicos (δ) de RMN de ^1H do carvacrol, nas formas complexada e livre, em D_2O .

Átomo de H	δ (ppm) Livre	δ (ppm) Complexado	$\Delta\delta$ (Complexado – Livre) (ppm)
carvacrol 3	7,16	7,08	-0,08
4	6,85	6,77	-0,08
6	6,82	6,75	-0,07
7	2,90 – 2,80	2,86 – 2,78	(-0,04) – (-0,02)
10	2,18	2,19	-0,01
8 e 9	1,19	1,24	-0,05

Na Figura 3 pode ser observado o espectro de ROESY 2D para o CI CAR:HP- β CD.

Figura 3 - Espectro ROESY 2D do complexo de inclusão carvacrol:hidroxipropil- β -ciclodextrina em D_2O .



Fonte: arquivo pessoal

3.2 Efeito carrapaticida do carvacrol livre e complexado em HP-βCD

Na Tabela 3 são apresentados os valores de LC₅₀ e LC₉₀ do carvacrol livre e complexado em HP-βCD sobre larvas de *R. microplus*.

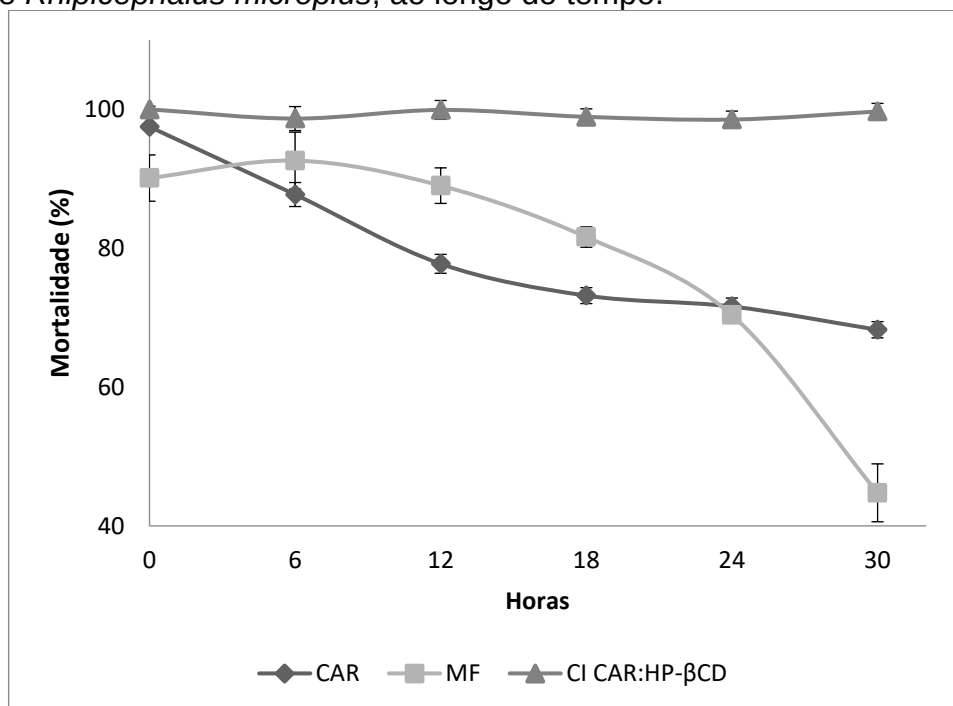
Tabela 3 - Valores de concentração letal (mg/mL) do carvacrol livre e complexado em hidroxipropil-β-ciclodextrina para larvas de *Rhipicephalus microplus*

Tratamentos	LC50 (IC ^a)	LC90 (IC ^a)	Slope	R ²
CAR ²	4,54 (4,23-4,85)	9,11 (8,34-10,1)	3,40	0.96
CI ³ CAR ² :HP-BCD ¹	7,4 (7,2-7,5)	9,6 (9,3-10,0)	11,19	0.85

Legenda – ^aintervalo de confiança a 95%. ¹Hidroxipropil-β-ciclodextrina; ²Carvacrol; ³Complexo de inclusão preparado por malaxagem. P-valor <0,05.

Os valores de mortalidade larval ao longo do tempo para as soluções contendo carvacrol livre e do CI CAR:HP-βCD preparados por mistura física e malaxagem controle estão representados na Figura 4.

Figura 4 - Efeito carrapaticida do carvacrol livre (CAR), do complexo de inclusão carvacrol e hidroxipropil- β -ciclodextrina (CAR:HP- β CD) e da mistura física (MF) em larvas de *Rhipicephalus microplus*, ao longo do tempo.



Fonte: arquivo pessoal

Na Tabela 4 se encontram os valores de mortalidade após a exposição das larvas de *R. microplus* ao carvacrol livre, CI CAR:HP- β CD ao longo do tempo.

Tabela 4 - Efeito do carvacrol livre e complexado em hidroxipropil- β -ciclodextrina, ao longo do tempo, sobre a mortalidade (%) de larvas de *Rhipicephalus microplus*.

Grupos	Horas					
	0	6	12	18	24	30
CI ³ CAR ² : HP-BCD ¹	⁵ 100,00±0a	98,67±0,49a	99,92±0,13a	98,92±0,33a	98,53±0,56a	99,69±0,16a
CAR ²	97,49±0,45a	87,73±1,73a	77,75±1,36b	73,17±1,15b	71,60±1,22b	68,25±1,17b
DMSO ⁴ a 5% (m/v)	1,08±0,43b	1,80±0,59b	0,63±0,40c	0,87±0,33c	1,99±0,69c	1,03±0,57c

Legenda – ¹hidroxipropil- β -ciclodextrina; ²Carvacrol a 10mg/mL; ³Complexo de inclusão preparado por malaxagem. ⁴Dimetilsulfóxido. ⁵Valor médio $\pm$ EP. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Após a análise do espectro de infravermelho de HP- β CD (Figura 1), observa-se que os resultados estão de acordo com os resultados apresentados em outros trabalhos para esta substância (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2019; WEI et al., 2017; YILDIZ et al., 2018). Os espectros de infravermelho do carvacrol (CAR) (Figura 1A) mostraram, além da banda de estiramento O—H, vibrações de estiramento das ligações C—H entre 2800 e 3000 cm^{-1} , bandas entre 1400 e 1650 cm^{-1} de estiramento aromático C=C, vibrações de estiramento aromático O—H em torno de 1250 cm^{-1} e dobramento aromático C—H entre 800 e 900 cm^{-1} (Figura 1B) (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2019; YILDIZ et al., 2018).

Os espectros de infravermelho obtidos para o CI comparado com o da mistura física (MF) mostraram picos semelhantes, mas com diferentes intensidades. Foram observadas as bandas características do anel aromático (C=C) do CAR, em torno de 1590 cm^{-1} , e as vibrações de seus respectivos grupos metil ($-\text{CH}_3$) em 1430 cm^{-1} (assimétrico) e 1360 cm^{-1} (simétrico), assim como também intensidades diferentes em 1622 e 1286 cm^{-1} (Figura 1B).

A banda em 2923 cm^{-1} das vibrações de estiramento C—H, apresentou um deslocamento com variação da intensidade quando comparado HP- β CD livre com o CI e a MF. Igual comportamento foi observado na vibração antissimétrica dos grupos metil em 2967 cm^{-1} (Figura 1A). A banda em torno de 1590 cm^{-1} apresenta um padrão diferente no CI quando comparada a MF, indicando uma mudança em relação ao CAR livre e sugerindo a formação do CI. Estes resultados corroboram os relatados por Yildiz et al. (2018) e Rodriguez-Lopez et al. (2019) usando HP- β CD e Celebioglu; Yildiz; Uyar, (2018) e Torres et al., (2018) com β CD.

Por meio da análise dos gráficos de termogravimetria (TG), observa-se redução de massa (maior que 95%, Tabela 1) para o carvacrol, atribuída à evaporação, começando em torno de 50 °C e terminando em torno de 150 °C (Figura 2-I). Já a curva para HP- β CD (Figura 2-I) é caracterizada por duas perdas de peso separadas: a primeira aparece abaixo de 100 °C devido à perda de água, e a segunda, ocorre em temperaturas superiores a 300 °C, podendo ser atribuídas à decomposição de macrociclos (MURA, 2015). Perfil semelhante ao obtido para a curva da HP- β CD é observado para o CI CAR:HP- β CD (Figura 2-I) sugerindo aumento na estabilidade do CAR em função da possível formação do CI.

Pela análise do gráfico de DTG para o CI CAR:HP- β CD (Figura 2-II) observam-se três estágios de perda de peso correspondentes à: evaporação da água (abaixo de 100 °C), evaporação do CAR (entre 260-280 °C) e degradação do HP- β CD (acima 300 °C). Além disso não foi observada evidência da presença de CAR livre nos gráficos de DTG para o CI. A estabilidade térmica do CAR pode ter sido aumentada em função da interação deste com a HP- β CD, sugerindo a formação do CI (DIAS; NIKOLAOU; DE GIOVANI, 2008; LU et al., 2014).

Na curva de DTA para a HP- β CD observa-se um amplo efeito endotérmico (máximo 50 °C) correspondente ao processo de desidratação e, em torno de 360 °C, um processo de degradação (Figura 2-III). Para a curva do CI CAR:HP- β CD quase não se observa a presença de picos endotérmicos e pode ser observada uma diferença de temperatura exotérmica, em aproximadamente 70 °C, sugerindo um processo de exclusão de água quando é formado o complexo (Figura 2-III). Resultados semelhantes foram relatados para o processo de inclusão de outras substâncias em HP- β CD, como Marreto et al., (2008) ao avaliarem um CI contendo óleo essencial de *Lippia gracilis*. Esses resultados também corroboram os resultados encontrados por Santana et al. (2021) e Celebioglu; Yildiz; Uyar, (2018) para CIs preparados a partir de borneol, carvacrol ou timol complexados em outras ciclodextrinas.

A partir dos espectros do CAR livre e complexado foi realizada a comparação para avaliar os desvios químicos (δ) obtidos por RMN de ^1H (Apêndice, Figuras S2 e S3). Os resultados obtidos revelaram uma variação significativa de deslocamentos químicos para os hidrogênios aromáticos, sugerindo a inclusão do CAR na cavidade da HP- β CD (Tabela 2). Na análise do espectro de ROESY 2D do CI CAR:HP- β CD (Figura 3) observou-se uma fraca interação entre os prótons aromáticos do CAR e da cavidade HP- β CD, mostrando que a molécula de carvacrol é capaz de ser incorporada na cavidade HP- β CD.

O CAR apresentou baixos valores de LC_{50} e LC_{90} (Tabela 3). Novato et al. (2018), ao avaliar o efeito acaricida de monoterpenos e seus derivados acetilados, incluindo carvacrol, sobre larvas de *R. microplus*, encontrou valores de LC_{50} e LC_{90} de 0,83 e 2,02 mg/mL, utilizando 100% de etanol como solvente. Os dados obtidos no presente estudo diferem dos relatados por tais autores, pois apresentaram valores maiores de LC_{50} (2,06 mg/mL) e LC_{90} (4,89mg/mL). Provavelmente esta diferença se deve a utilização de solventes diferentes nos dois estudos. O etanol utilizado como

solvente por Novato et al. (2018), pode agir na superfície corporal dos carrapatos podendo levar a desidratação e morte, o que demonstra a importância em se determinar a toxicidade dos solventes a serem utilizados em bioensaios (GONÇALVES et al., 2007).

Os resultados do efeito do carvacrol livre e complexado em HP- β CD ao longo do tempo apontam que as soluções expostas na primeira hora (0) contendo carvacrol livre, apresentaram valores maiores de mortalidade larval comparado ao carvacrol e HP- β CD preparados por mistura física (97,49 e 90,10% de mortalidade larval respectivamente), mas menor que o valor de mortalidade apresentada pelo CI CAR:HP-BCD, preparado por malaxagem (100%). Isso demonstra que, assim como relatado por Lima et al. (2016), os processos de preparo dos CI podem interferir em sua eficiência.

O método de preparo por mistura física é simples e não inclui solventes. Já o preparo por malaxagem, por ser mais demorado e de se utilizar etanol como solvente, proporcionaria uma interação entre as substâncias por maior tempo. Além disso, métodos que utilizam fricção, como a malaxagem, são capazes de causar mudanças estruturais e, até mesmo reações, através do aumento da interação molecular e formação de complexos (BRAGAGNI; MAESTRELLI; MURA, 2010) levando a inclusão de carvacrol na cavidade de HP- β CD, como demonstrado através da caracterização química.

A partir de 6h de exposição das soluções ao ambiente, a mortalidade larval para carvacrol livre apresentou queda até chegar a 68,25% após 30h. Tais resultados sugerem que ao longo do tempo, provavelmente devido a sua volatilidade, quando a solução contendo carvacrol livre é exposta ao ambiente, sua atividade carrapaticida é reduzida drasticamente, assim como observado no estudo realizado por Lima et al. (2017) que observaram menos de 20% de mortalidade após 30h. No mesmo estudo, os autores notaram que no grupo exposto a solução contendo carvacrol complexado, a taxa de mortalidade se manteve, mesmo após horas de exposição ambiental, sugerindo que a estabilidade do monoterpeno foi influenciada pela complexação do mesmo. Resultados semelhantes para CI CAR:HP- β CD foram observados no presente estudo, com mortalidade larval elevada mesmo após 30h de exposição. A partir de 12 horas (Tabela 4), o grupo teste CI CAR:HP- β CD demonstrou valores de mortalidade larval significativamente superior aos demais tratamentos.

O objetivo de se utilizar CI contendo ingredientes ativos é de proporcionar liberação lenta, de aumentar a estabilidade e otimizar a atividade terapêutica de bioativos (ARANTES et al., 2009; NASEER; AHMED; HAMEED, 2017; QIU et al., 2016), o que foi observado para o CI entre CAR:HP- β CD preparado e analisado neste estudo. Esses efeitos corroboram descobertas anteriores de que os CDs podem formar CI com terpenos contornando suas limitações, como volatilidade e instabilidade (LIMA et al., 2016; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016;).

Outras substâncias, como a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, também podem ser utilizadas na formação de CI com bioativos (LIMA et al., 2017), entretanto, na indústria farmacêutica, as CDs são mais visadas para a complexação de fármacos, devido ao seu baixo preço e altas taxas de produção (TSAI et al., 2010). Além disso, estudos relatam que CDs tem demonstrado baixa toxicidade e baixa imunogenicidade, tornando sua aplicação atrativa e criando uma ampla possibilidade de complexação com diferentes fármacos (LIMA et al., 2016; ZHANG; MA, 2013).

É importante ressaltar que dentre as etapas do desenvolvimento de formulações carrapaticidas de origem natural, existem atualmente muito desafios, como a padronização química, a aprovação regulatória e a disponibilidade de recursos para produção em grande escala (QUADROS et al., 2020). Assim, os resultados do presente estudo representam avanços na área, mas ainda estudos devem ser realizados a fim de se desenvolver um produto que atenda a demanda do mercado.

5 . CONCLUSÕES

Por meio da caracterização química (Espectroscopia no Infravermelho, Análises Termogravimétricas e Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear RMN), foi possível confirmar a formação do CI CAR:HP- β CD. De acordo com os dados obtidos no ensaio biológico *in vitro* (LPT), é possível inferir que o CI CAR:HP- β CD mostrou-se útil devido à proteção do composto ativo, garantindo a atividade, diminuindo a volatilidade e, conseqüentemente, aumentando o tempo de ação do carvacrol, com potencial para o desenvolvimento de formulação com ação carrapaticida.

6. REFERÊNCIAS

- 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.
- ARAFI, W. M. et al. Detection of single nucleotide polymorphism in the para-sodium channel gene of *Rhipicephalus annulatus* populations from Egypt resistant to deltamethrin. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 5, p. 101488, 2020.
- ARANTES, L. M. et al. Proparacaine complexation with β -cyclodextrin and p-sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied $^1\text{H-NMR}$ approaches. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 757–763, 2009.
- BANUMATHI, B. et al. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 102–110, 2017.
- BEYS-DA-SILVA, W. O. et al. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, p. 1–9, 2020.
- BIEGELMEYER, P. et al. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 237, p. 1–11, 2012.
- BRAGAGNI, M.; MAESTRELLI, F.; MURA, P.. Physical chemical characterization of binary systems of prilocaine hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 68, n. 3-4, p. 437-445, 2010.
- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.
- CARVALHO, S. G. et al. Physicochemical characterization and in vitro biological evaluation of solid compounds from furazolidone-based cyclodextrins for use as leishmanicidal agents. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1788-1809, 2020.
- CELEBIOGLU, A.; YILDIZ, Z. I.; UYAR, T. Thymol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs: Enhanced water solubility, high thermal stability and antioxidant property of thymol. **Food Research International**, v. 106, p. 280–290, 2018.
- CHALLA, Rajeswari et al. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **Aaps Pharmscitech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.
- CHEIRSILP, B., RAKMAI, J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. **Biology, Engineering and Medicine**, v.2, n.1, p.1-6, 2016.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo desenvolve-se somente em espécies naturais . O metabolismo secundário é resultante de. **Diversitas Journal ISSN**, v. 1, p. 175–181, 2016.

DIAS, K.; NIKOLAOU, S.; DE GIOVANI, W. F. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, n. 1, p. 154–161, 2008.

DOMAŃSKA, U.; PELCZARSKA, A.; POBUDKOWSKA, A. Effect of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin on solubility of sparingly soluble drug derivatives of anthranilic acid. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2383–2394, 2011.

GONÇALVES, K. et al. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v. 100, n. 6, p. 1267–1270, 2007.

GOULD, S.; SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1451–1459, 2005.

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.

KRINGEL, D. H. et al. Production, Characterization, and Stability of Orange or *Eucalyptus* Essential Oil/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 11, p. 2598–2605, 2017.

KRINGEL, D. H. et al. Germinated Wheat Starch as a Substrate to Produce Cyclodextrins: Application in Inclusion Complex to Improve the Thermal Stability of Orange Essential Oil. **Starch/Staerke**, v. 72, n. 1–2, p. 1–7, 2020.

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.

LIMA, P. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965–987, 2016.

LIMA, A. S. et al. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 190–194, 2017.

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, Y. et al. Complexation of Z-ligustilide with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve stability and oral bioavailability. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 2, p. 211–222, 2014.

MARRETO, R. N. et al. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, n. 1–2, p. 53–58, 2008.

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.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226–238, 2015.

NASEER, M. M.; AHMED, M.; HAMEED, S. Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 89, n. 2, p. 243–256, 2017.

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, p. 1–4, 2018.

QIU, C. et al. A promising antitumor activity of evodiamine incorporated in hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Pro-apoptotic activity in human hepatoma HepG2 cells. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 1, 2016.

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.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life sciences**, v. 149, p. 34–41, 2016.

RAKMAI, J. et al. Encapsulation of Essential Oils by Cyclodextrins: Characterization and Evaluation. **Cyclodextrin - A Versatile Ingredient**, 2018.

REN, X. et al. Inclusion complexes of eucalyptus essential oil with β -cyclodextrin: preparation, characterization and controlled release. **Journal of Porous Materials**, v. 25, n. 6, p. 1577–1586, 2018.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. I. et al. Thorough characterization and stability of HP- β -cyclodextrin thymol inclusion complexes prepared by microwave technology: A required approach to a successful application in food industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1322–1333, 2019.

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.

ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66–76, 2017.

RUNGSARDTHONG R. U. et al. Encapsulation of citral isomers in extracted lemongrass oil with cyclodextrins: molecular modeling and physicochemical characterizations. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 12, p. 2340-2345, 2011.

SANTANA, D. V. S. et al. Analytical techniques to recognize inclusion complexes formation involving monoterpenes and cyclodextrins: A study case with (–) borneol, a food ingredient. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127791, 2021.

SINGH, R., BHARTI, N., MADAN, J., HIREMATH, N. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.2, n.3, p.171-183, 2010.

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.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122–1144, 2017.

TABARI, M. A. et al. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 245, p. 86–91, 2017.

TORRES, L. H. et al. Characterization and cytotoxicity of a benzocaine inclusion complex. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 91, n. 1–2, p. 9–15, 2018.

TSAI, Y. et al. Preparation, characterisation and activity of the inclusion complex of paeonol with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 837-841, 2010.

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.

WEI, Y. et al. Molecular model and in vitro antioxidant activity of a water-soluble and stable phloretin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Liquids**, v. 236, p. 68–75, 2017.

YILDIZ, Z. I. et al. Fast-dissolving carvacrol/cyclodextrin inclusion complex electrospun fibers with enhanced thermal stability, water solubility, and antioxidant activity. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 23, p. 15837–15849, 2018.

ZHANG, J.; MA, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 9, p. 1215-1233, 2013.

APÊNDICE: Comparação entre os desvios químicos (δ)
obtidos por RMN de ^1H com base nos espectros de Cl e
MF, para carvacrol

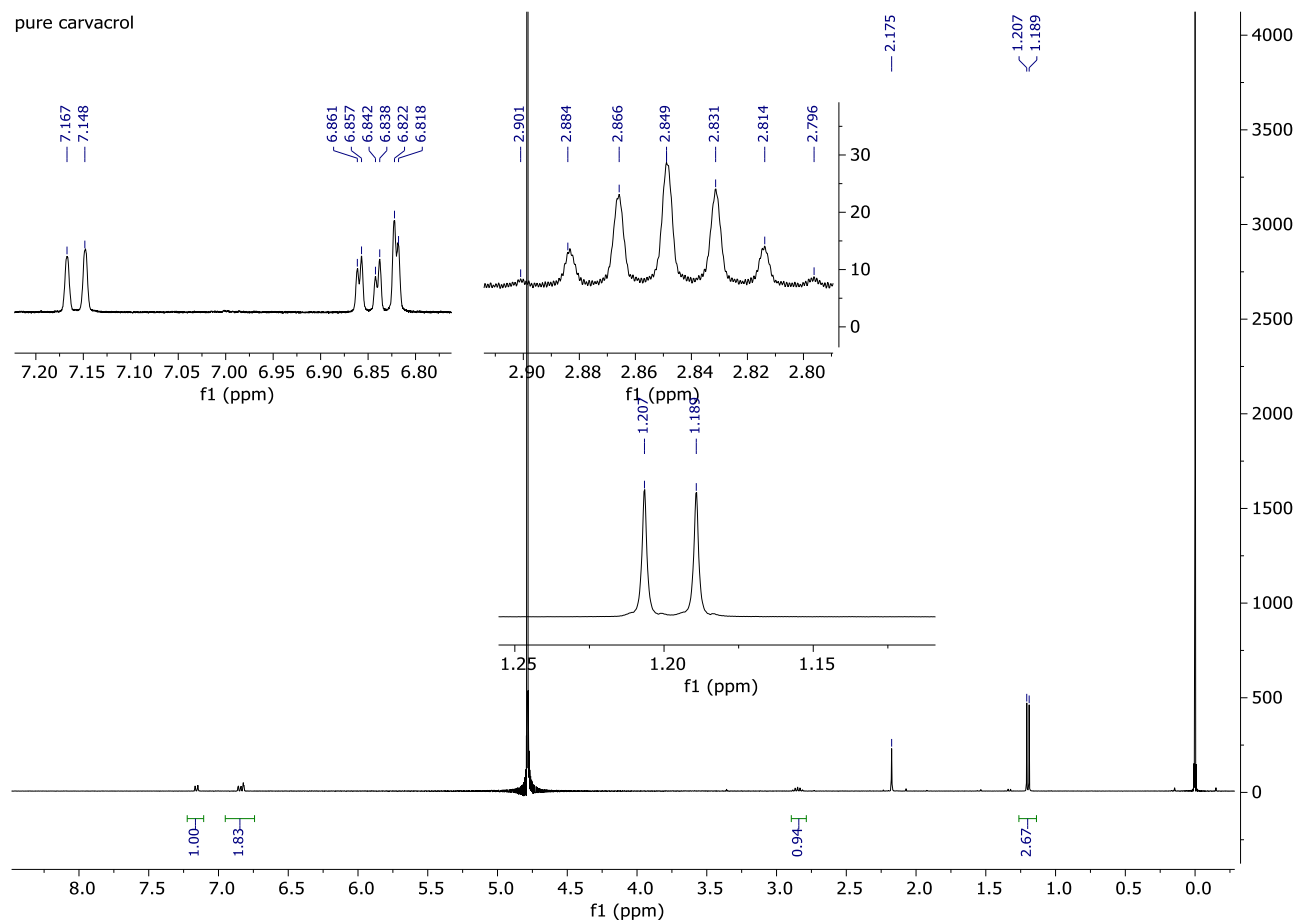
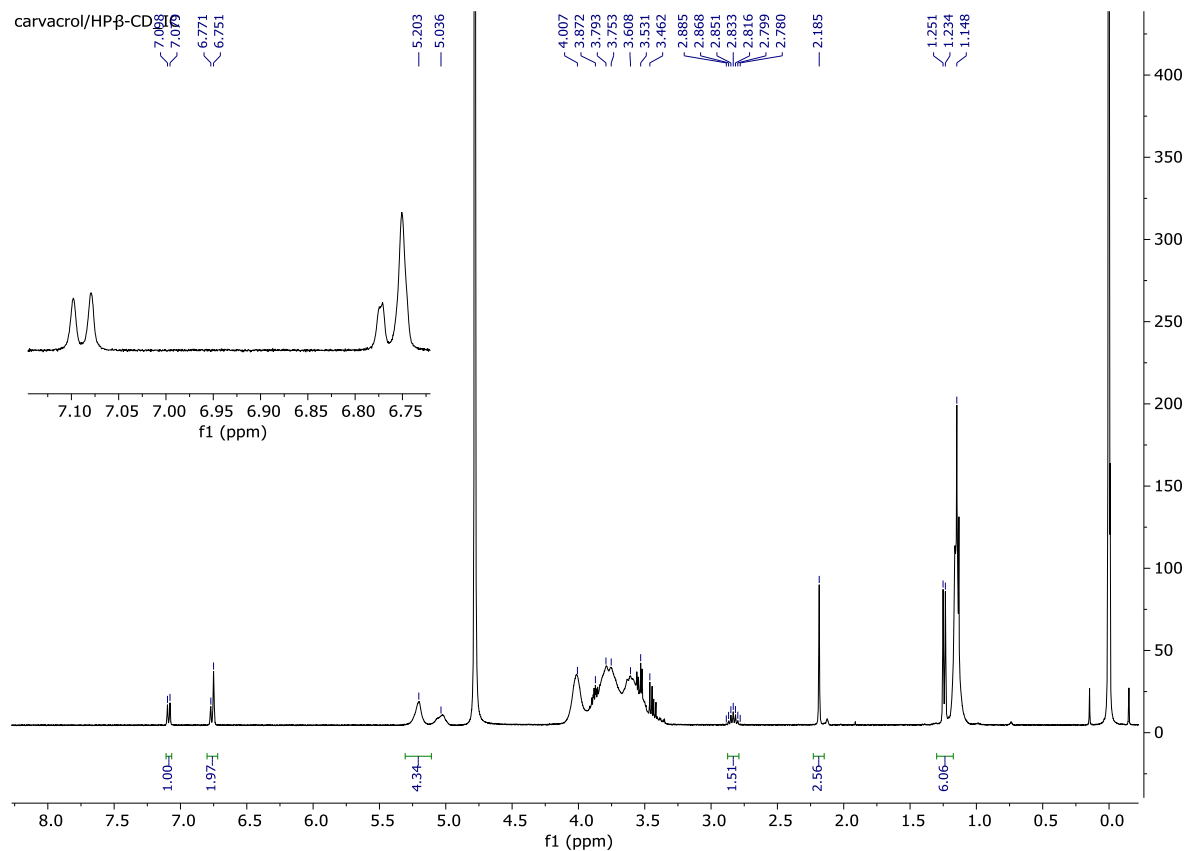


Figura S1. Espectro de RMN de ^1H do carvacrol em D_2O .

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): δ 7,16 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-3); 6,85 (1H, dd, $J = 7,6$ e 1,6 Hz, H-4); 6,82 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-6); 2,90 – 2,80 (1H, m, H-7); 2,18 (3H, s, CH_3 -10); 1,19 (6H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3 -8 e CH_3 -9).



RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): δ 7,08 (H-3); 6,77 (H-4); 6,75 (H-6); 5,20 (H-8'); 5,07 (H-1'); 4,01 (H-3'); 3,88 (H-7'); 3,79 (H-6'); 3,76 (H-5'); 3,61 (H-2'); 3,46 (H-4'); 2,86 – 2,78 (H-7); 2,19 (H-10); 1,24 (H-8 e H-9); 1,15 (H-9').

Figura S2. Espectro de RMN de ^1H do complexo de inclusão do CAR:HP- β CD em D_2O .