

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

**Ana Carolina Antunes Santos**

**Avaliação da Repelência e Atividade Acaricida de  
Formulações Contendo Alecrim-do-Campo, Hortelã e  
Eucalipto Contra o Carrapato *Amblyomma sculptum***

Belo Horizonte  
2023

**Ana Carolina Antunes Santos**

**Avaliação da Repelência e Atividade Acaricida de  
Formulações Contendo Alecrim-do-Campo, Hortelã e  
Eucalipto Contra o Carrapato *Amblyomma sculptum***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Ricardo Nascimento Araújo

Coorientadora: Dra. Lorena Lopes Ferreira

Belo Horizonte

2023

043

Santos, Ana Carolina Antunes.

Avaliação da repelência e atividade acaricida de formulações contendo alecrim-do-campo, hortelã e eucalipto contra o carrapato *Amblyomma sculptum* [manuscrito] / Ana Carolina Antunes Santos. – 2023.

61 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Ricardo Nascimento Araújo. Coorientadora: Dra. Lorena Lopes Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Amblyomma*. 3. Repelentes de Insetos. 4. Acaricidas. I. Araújo, Ricardo Nascimento. II. Ferreira, Lorena Lopes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO 461/2023/16**

**TÍTULO: "Avaliação da Repelência e Atividade Acaricida de Formulações Contendo Alecrim-do-campo, Hortelã e Eucalipto Contra O Carrapato *Amblyomma Sculptum*"**

**ALUNA: ANA CAROLINA ANTUNES SANTOS**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENTOMOLOGIA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **onze de outubro de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Caio Marcio de Oliveira Monteiro**

UFG

**Viviane de Oliveira Vasconcelos**

CCBS-UNIMONTES

**Lorena Lopes Ferreira- Coorientadora**

UFMG

**Ricardo Nascimento Araújo- Orientador**

UFMG

Belo Horizonte. 11 de outubro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Nascimento Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 16/10/2023, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Lopes Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 16/10/2023, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Viviane de Oliveira Vasconcelos, Usuária Externa**, em 17/10/2023, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Márcio de Oliveira Monteiro, Usuário Externo**, em 18/10/2023, às 01:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2678780** e o código CRC **92E8D53F**.

## **AGRADECIMENTOS**

Finalizo essa dissertação sabendo que tive muito carinho durante todo processo, agradeço muito a Deus, Nossa Senhora Aparecida e a todos que estiveram comigo durante esse período de aprendizado. De início agradeço ao meu orientador Ricardo Araújo, por todo suporte e dedicação para que este projeto pudesse ser possível, por toda paciência, incentivo, ensinamentos, puxões de orelha e conselhos valiosos. Tê-lo como orientador foi um presente. Agradeço também a professora Lorena por todo apoio e dedicação e seus ótimos conselhos.

Aos meus queridos pais Emílio e Jacqueline, e minha excepcional irmã Fernanda, pelo apoio diário e pelo incentivo a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir. Fernanda, obrigada por dedicar seu tempo livre a me ajudar neste mestrado, mesmo sendo domingo de madrugada ou feriado, por aguentar as crises de choro e ansiedade e ser minha companheira de todos os dias. Pai, obrigada por me levar todo dia cedinho para não chegar cansada nas aulas, e mãe obrigada por todas as orações e pelos almoços gostosos que eu levei durante todo esse período, sem a ajuda de vocês esse processo seria muito mais difícil.

Aos meus amigos do mestrado Marcela (meu casamento acadêmico), Aline, Gabi, João, Luiz, que fizeram meus dias milhões de vezes melhor e mais divertidos, obrigada de coração por cada ajuda, carinho e incentivo, vocês são demais!!

Aos meus amigos do laboratório Izabela, Márcia, Giovanna, Adalberto, Hudson e Naylene por tudo que me ensinaram e por toda ajuda durante esse processo.

## RESUMO

Os carrapatos são parasitos de importância médica e veterinária especialmente pela espoliação sanguínea que exercem em seus hospedeiros e por serem vetores de patógenos. Problemas com carrapatos têm se tornado mais frequentes em áreas urbanas e periurbanas da região Sudeste, refletindo um aumento no número de indivíduos picados por esses artrópodes. *Amblyomma sculptum* é um dos carrapatos de maior importância no Brasil, uma vez que é a principal espécie associada a humanos, é o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira, e causa prejuízos consideráveis nas criações de animais. O uso de repelentes e acaricidas consiste em uma das principais alternativas para prevenir problemas associados aos carrapatos. Entretanto, apesar dos notórios benefícios dos produtos disponíveis, estes também apresentam problemas principalmente relacionados à possibilidade de desenvolvimento de reações alérgicas ou intoxicação por parte do hospedeiro, pela contaminação do ambiente e dos produtos de origem animal, e o desenvolvimento de resistência por parte dos carrapatos. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos compostos mais eficientes para o combate aos carrapatos. Produtos à base de extrato de plantas e óleos essenciais têm despertado cada vez mais interesse, uma vez que diversos trabalhos vêm demonstrando seu potencial repelente e acaricida contra carrapatos, além de serem de baixo custo de produção, de fácil acesso e pouco tóxicos para mamíferos. Este trabalho teve como objetivo testar diferentes formulações de infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC) e hortelã (*Mentha spicata*), e de óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em ensaios de repelência e acaricida contra *A. sculptum*. Nos ensaios de repelência, foram avaliadas as infusões de alecrim-do-campo e hortelã nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5%, e soluções de óleo essencial de eucalipto (BioEssência®) nas concentrações de 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625%, durante o período de 10 minutos a cinco horas. Para triagem, as formulações foram testadas utilizando o teste de escalada em papel filtro. As soluções com os melhores resultados de repelência média, durante as 5h de avaliação, foram usadas para preparar novas formulações com combinações binárias ou múltiplas que foram novamente testadas utilizando a mesma metodologia. Em seguida, as formulações com a maior repelência média ao longo do tempo foram submetidas ao teste de escalada em ponta de dedo e ao teste de imersão de larvas. As formulações individuais que apresentaram os melhores resultados de repelência média ao longo de todo o período no teste do papel filtro foram óleo de eucalipto 0,5% (78,9% de repelência) e 0,25% (75,3%), infusão hidroalcoólica de hortelã 12,5% (69,8%) e infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo 12,5% (69,8%). Dentre as combinações binárias, no teste do papel filtro, os resultados mostraram repelência média de 86,4% para a formulação alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5%, seguido de alecrim-do-campo 12,5% + hortelã 12,5% (73%) e eucalipto 0,5% + hortelã 12,5% (64%). Enquanto que as combinações múltiplas apresentaram aproximadamente 80% de repelência. No teste de escalada em ponta de dedo, os efeitos de repelência foram inferiores aos do teste em papel de filtro e ficaram entre 16,9 e 31,1% de repelência, sendo a formulação alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5% a mais eficaz. A mortalidade causada pelas quatro soluções selecionadas variou de 63,5 a 77%, sendo alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5% e eucalipto 0,5% as mais ativas em larvas de *A. sculptum*. Os resultados mostraram que as três plantas possuem efeito repelente e acaricida com potencial e ser explorado para o combate de *A. sculptum*. Porém, mais estudos devem ser conduzidos a fim de encontrar formulações com melhores eficácias, avaliar a estabilidade das formulações dentre outros parâmetros que viabilizem seu uso.

**Palavras-chaves:** carrapato-estrela; repelente natural; acaricida.

## ABSTRACT

Ticks are parasites of medical and veterinary importance, especially due to the blood plunder they exert on their hosts and because they are vectors of pathogens. Problems with ticks have become more frequent in urban and peri-urban areas of the Southeast region, reflecting an increase in the number of individuals bitten by these arthropods. *Amblyomma sculptum* is one of the most important ticks in Brazil, as it is the main species associated with humans, it is the main vector of the bacterium *Rickettsia rickettsii*, which causes Brazilian Spotted Fever, and causes considerable damage to animal husbandry. The use of repellents and acaricides is one of the main alternatives to prevent problems associated with ticks. However, despite the notable benefits of the available products, they also present problems mainly related to the possibility of developing allergic reactions or intoxication on the part of the host, contamination of the environment and products of animal origin, and the development of resistance on the part of ticks. . Therefore, it is necessary to develop new, more efficient compounds to combat ticks. Products based on plant extracts and essential oils have aroused increasing interest, as several studies have demonstrated their repellent and acaricidal potential against ticks, in addition to being low in production cost, easily accessible and low in toxicity for mammals. This work aimed to test different formulations of hydroalcoholic infusions of wild rosemary (*Baccharis dracunculifolia* DC) and mint (*Mentha spicata*), and eucalyptus essential oil (*Eucalyptus globulus*) in repellency and acaricide tests against *A. sculptum*. In the repellency tests, infusions of wild rosemary and mint were evaluated at concentrations of 100, 50, 25, 12.5%, and solutions of eucalyptus essential oil (BioEssência®) at concentrations of 0.5, 0.25, .125 and .0625%, over the period from 10 minutes to five hours. For screening, the formulations were tested using the filter paper climbing test. The solutions with the best average repellency results, during the 5h evaluation, were used to prepare new formulations with binary or multiple combinations that were tested again using the same methodology. Then, the formulations with the highest average repellency over time were subjected to the fingertip climbing test and the larvae immersion test. The individual formulations that presented the best average repellency results over the entire period in the filter paper test were eucalyptus oil 0.5% (78.9% repellency) and 0.25% (75.3%), hydroalcoholic mint infusion 12.5% (69.8%) and hydroalcoholic rosemary infusion 12.5% (69.8%). Among the binary combinations, in the filter paper test, the results showed an average repellency of 86.4% for the formulation rosemary-do-field 12.5% + eucalyptus 0.5%, followed by rosemary-do-field 12.5% + mint 12.5% (73%) and eucalyptus 0.5% + mint 12.5% (64%). While multiple combinations showed approximately 80% repellency. In the fingertip climbing test, the repellency effects were lower than those in the filter paper test and were between 16.9 and 31.1% repellency, with the formulation 12.5% rosemary + eucalyptus 0.5% most effective. Mortality caused by the four selected solutions ranged from 63.5 to 77%, with rosemary 12.5% + eucalyptus 0.5% and eucalyptus 0.5% being the most active in *A. sculptum* larvae. The results showed that the three plants have a repellent and acaricidal effect with potential to be explored to combat *A. sculptum*. However, more studies must be conducted in order to find formulations with better efficacy, evaluate the stability of the formulations, among other parameters that enable their use.

**Keywords:** *Amblyomma sculptum*; natural repellents; acaricidal.

## LISTA TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Comparações entre os compostos e as combinações binárias e múltiplas, utilizando a fórmula de sinergismo de Marking; Dawson (1975). .....	42
--	----

## LISTA FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição geográfica das espécies de carrapatos pertencentes ao complexo *A. cajennense* no Brasil. O mapa mostra a localização dos carrapatos *A. cajennense* sensu stricto e *A. sculptum* além da localização de *A. cajennense* sensu lato identificados nas quatro regiões climáticas brasileiras..... 17
- Figura 2:** Ensaio de escalada em papel filtro impregnado. .... 28
- Figura 3:** Efeito repelente de diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 8,5 - repelente comercial Tchou Mosquito® contendo DEET a 8,5%. .... 32
- Figura 4:** Atividade repelente média das diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 8,5 - repelente comercial Tchou Mosquito® contendo DEET a 8,5%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). .... 33
- Figura 5:** Efeito repelente de diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de hortelã (*Mentha spicata*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65- Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. .... 35
- Figura 6:** Atividade repelente média das diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de hortelã (*Mentha spicata*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65- repelente comercial Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). .... 35
- Figura 7:** Efeito repelente de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65- repelente comercial Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. .... 37
- Figura 8:** Atividade repelente média das diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - repelente comercial Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). .... 38
- Figura 9:** Efeito repelente das combinações binárias entre alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*)

no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. A+H: alecrim-do-campo 12,5% + hortelã 12,5%; E+H: eucalipto 0,5% + hortelã 12,5%, A+E: alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5%; Cont Neg: controle negativo- etanol 70%, DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. ..... 39

**Figura 10:** Atividade repelente média das combinações binárias entre alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. A+H: alecrim-do-campo 12,5% + hortelã 12,5%; E+H: eucalipto 0,5% + hortelã 12,5%, A+E: alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5%; Cont Neg: controle negativo- etanol 70%, DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 40

**Figura 11:** Efeito repelente das formulações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. T1- alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 - alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. ..... 41

**Figura 12:** Atividade repelente média das combinações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. T1: alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%; T2: alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%; Cont Neg: controle negativo, etanol 70%; DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 41

**Figura 13:** Atividade repelente média de todas as melhores soluções contra ninfas de *Amblyomma sculptum* no ensaio de escalada em papel filtro impregnado. A- alecrim-do-campo 12,5%, H- hortelã 12,5%, E- eucalipto 0,5%, T1 alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5% e T2 alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, A+H- alecrim-do-campo e hortelã, E+H- eucalipto e hortelã, A+E- alecrim-do-campo e eucalipto. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 43

**Figura 14:** Efeito repelente das formulações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) contra ninfas de *Amblyomma sculptum* no ensaio de escalada em ponta de dedo durante o período de 10 minutos a 5 horas. A + E - alecrim-do-campo 12,5% e hortelã 12,5%, T1- alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 – alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, E - eucalipto a 0,5%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. O teste foi interrompido em caso de repelência inferior a 50% na hora 3. ..... 44

**Figura 15:** Atividade repelente média das combinações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em ponta de dedo contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 3 horas. A + E - alecrim-do-campo 12,5% e hortelã 12,5%, T1- alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 – alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, E - eucalipto a 0,5%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65% Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 45

**Figura 16:** Mortalidade de larvas de *Amblyomma sculptum* após tratamento com diferentes formulações à base de alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) contra larvas de *Amblyomma sculptum* no teste de imersão de larvas. A + E - alecrim-do-campo 12,5% e hortelã 12,5%, T1- alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 – alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, E - eucalipto a 0,5%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, Cont Posit – controle positivo, cipermetrina 0,030 mg/mL. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). ..... 46

## **ABREVIACÕES E SIGLAS**

A+E – Alecrim-do-campo e eucalipto

A+H – Alecrim-do-campo e hortelã

ANOVA – Análise de Variância

BOD – Demanda Bioquímica de Oxignio

CAPES – Coordenao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC – Centers For Disease Control And Prevention

CEUA – Comissão de tica no Uso de Animais

DEET – O N,N-Diethyl-3-methylbenzamide

E+H – Eucalipto e hortelã

ICB – Instituto de Ciências biológicas

LAH – Laboratório de Artrópodes Hematófagos

T1 – Alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%

T2 – Alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1. <i>Amblyomma sculptum</i> : taxonomia, distribuição geográfica, importância, hospedeiros e ciclo biológico.....	16
2.2. Controle e prevenção de picadas de <i>A. sculptum</i> em animais e seres humanos.....	18
2.3. Bioacaricidas e repelentes à base de plantas contra <i>A. sculptum</i> .....	19
2.4. Atividade do alecrim-do-campo, hortelã e eucalipto contra carrapatos.....	21
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
4.1. Objetivo geral.....	25
4.2. Objetivos específicos .....	25
<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>26</b>
5.1. Delineamento experimental .....	26
5.2. Identificação das plantas, obtenção das soluções hidroalcoólicas à base de alecrim-do-campo, hortelã e do óleo essencial de eucalipto e concentrações testadas .....	26
5.2.1. Alecrim-do-campo e Hortelã.....	26
5.2.2. Eucalipto.....	27
5.3. Carrapatos experimentais.....	27
5.4. Ensaio de repelência.....	28
5.4.1. Teste de escalada em papel filtro impregnado .....	28
5.4.2. Teste de escalada em ponta de dedo.....	29
5.4.3. Teste de Imersão de Larvas .....	30
5.5. Análise estatística dos dados.....	30
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
6.1. Teste de escalada em papel filtro utilizando substâncias testadas isoladamente .....	32
6.1.1. Infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo .....	32
6.1.2. Infusão hidroalcoólica de hortelã .....	34
6.1.3. Óleo essencial de eucalipto .....	36
6.2. Combinações em pares das infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo, hortelã e óleo essencial de eucalipto.....	38
6.3. Combinações múltiplas das infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo e hortelã, e óleo essencial de eucalipto.....	40
6.4. Efeito sinérgico e seleção das melhores formulações para o teste de ponta de dedo e teste de imersão de larvas.....	42

6.5. Teste de escalada em ponta de dedo .....	43
6.6. Teste de imersão de larvas .....	45
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são vetores de inúmeros patógenos e causam problemas relacionados à espoliação sanguínea que exercem em seus hospedeiros tanto animais quanto seres humanos (KAUFMAN, 1989). As espécies do complexo *Amblyomma cajennense* são reconhecidas por possuir distribuição nas Américas, que inclui o Texas, nos Estados Unidos, ao norte da Argentina (Nos estados brasileiros temos duas espécies deste complexo, e *Amblyomma sculptum* é a que mais ocorre. Esta espécie possui uma baixa especificidade parasitária nos estágios imaturos, enquanto adultos parasitam principalmente cavalos, capivaras e antas (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006; BEATI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015). Contudo, pode parasitar humanos de forma acidental, sendo o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii* que é o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira no país, uma doença de alta letalidade (GERARDI et al., 2019).

Atualmente, o método mais utilizado para o controle desses carrapatos em animais é o uso de acaricidas químicos, porém esses produtos usados de forma indiscriminada leva ao estabelecimento de populações resistentes e podem causar toxicidade ambiental e animal. Para humanos são poucos os estudos com relação a repelência de carrapatos quando comparados a insetos como os mosquitos, havendo uma maior necessidade de maiores pesquisas para controle e repelência (CANÇADO et al., 2008). O N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) é um repelente padrão ouro contra carrapatos (BORGES et al., 2015). Porém, estudos mostram que o uso desse composto pode ocasionar alergias e até efeitos neurológicos adversos, e em grávidas pode causar uma má formação genética no feto (SCHAEFER; PETERS, 1992). Assim, produtos de origem natural como óleos essenciais e outras soluções à base de plantas estão sendo usados como alternativa para a diminuição do uso desses produtos químicos, e para reduzir os impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana (BENELLI; PAVELA, 2018; NWANADE et al., 2020; QUADROS et al., 2020).

Para *A. sculptum* já foram testados diversos compostos com efeito acaricida ou repelente em condição de laboratório e semi campo, como por exemplo, a utilização de terpenos (carvacrol, timol, beta citronelol), fenilpropanoides (cinamaldeído e eugenol) e ácidos graxos derivados do óleo de coco (BARROZO et al., 2021; FERREIRA et al., 2017a; MENDES et al., 2011; NOVATO et al., 2015; SENRA et al., 2013; VALE et al., 2021). Contudo, devido a biodiversidade brasileira, a descoberta de mais substâncias com

ação repelente é desejável. Sendo assim, neste trabalho foram testadas três plantas, *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), *Mentha spicata* (hortelã) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto), contra carrapatos da espécie *Amblyomma sculptum* para verificar seus efeitos repelente e acaricida.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

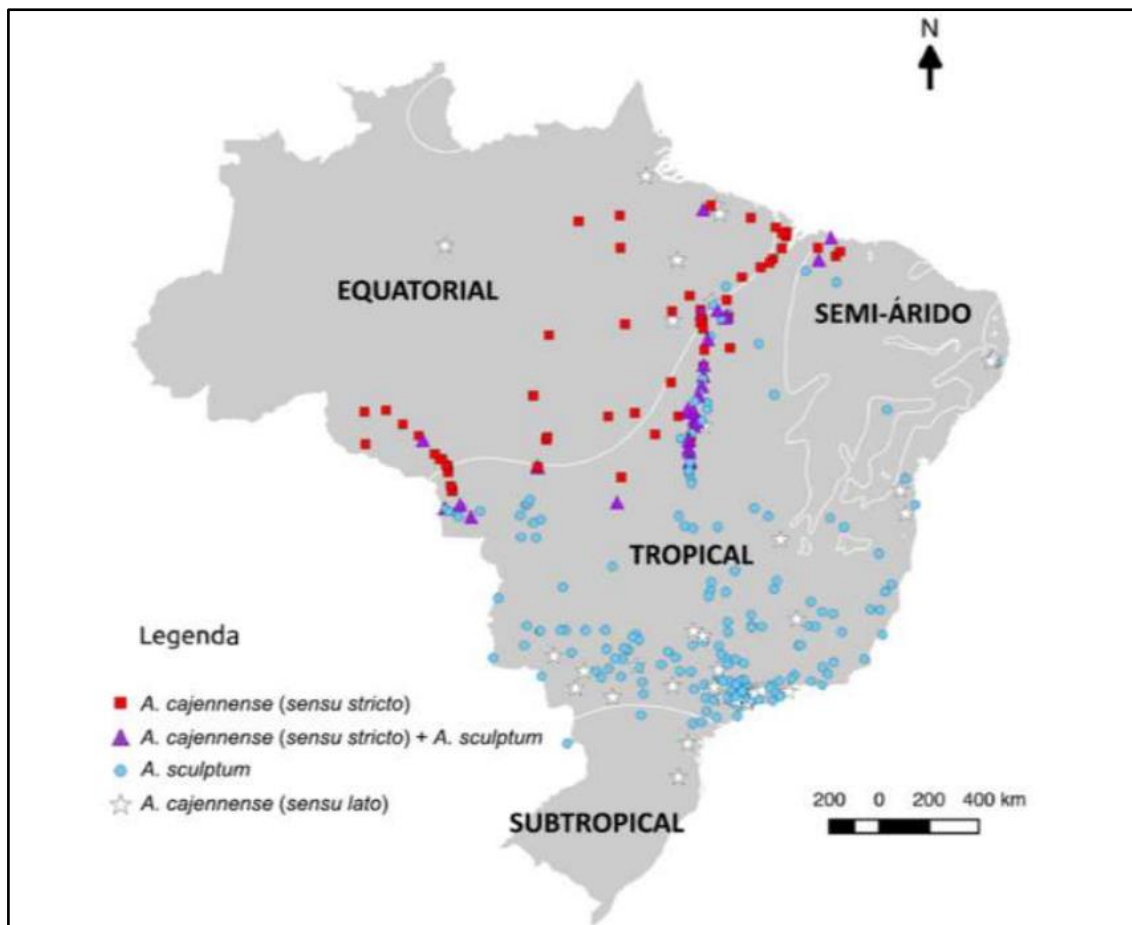
### 2.1. *Amblyomma sculptum*: taxonomia, distribuição geográfica, importância, hospedeiros e ciclo biológico

Os carrapatos são artrópodes da classe Arachnida e pertencem à ordem Ixodida, que possui três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. Esses artrópodes formam um grupo bem-sucedido de hematófagos obrigatórios que parasitam diversos hospedeiros (KEIRANS; DURDEN, 2005). Dentre as espécies com maior importância médica e veterinária no Brasil, destaca-se o ixodídeo *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 que por muitos anos foi denominada *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). Entretanto, análises morfológicas e estudos moleculares e biológicos demonstraram que *A. cajennense* é um complexo de seis espécies redefinida como *A. cajennense* sensu lato, onde foi possível validar as espécies *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma tonelliae*, *Amblyomma interadium*, *Amblyomma patinoi*, *Amblyomma cajennense* sensu stricto, e *Amblyomma sculptum* (NAVA et al., 2014).

Cada uma dessas novas espécies descritas têm distribuições diferentes. Sendo que no Brasil ocorrem duas espécies: *A. cajennense* s. s. que é encontrado somente na região Amazônica e *A. sculptum* que está presente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Pernambuco, e Piauí (Figura 1) (MARTINS et al., 2016; NAVA et al., 2014).

*Amblyomma sculptum* apresenta importância em saúde pública e veterinária no Brasil, sendo considerado o principal vetor da Febre Maculosa Brasileira (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006). A bactéria *Rickettsia rickettsi* é transmitida através da picada do carrapato em qualquer uma de suas fases e é uma bactéria que provoca doença grave em seres humanos com altas taxas de mortalidade (FIOL et al., 2010; GUEDES et al., 2005; HORTA et al., 2004), entretanto os casos da doença ocorrem por maioria no segundo semestre do ano, quando é predominante as formas evolutivas de ninfas, sendo assim é necessário o controle desse estágio por ser de maior risco para os seres humanos (ARAGÃO, 1936). Em análise dos casos de Febre Maculosa Brasileira entre os anos de 2007 a 2020 na região Sudeste foram notificados 71,5% dos casos de Febre Maculosa Brasileira, uma prevalência de 1,97/100.000 hab. Em Minas Gerais foram 16,6% de casos (SENZI et al., 2022).

**Figura 1:** Distribuição geográfica das espécies de carrapatos pertencentes ao complexo *A. cajennense* no Brasil. O mapa mostra a localização dos carrapatos *A. cajennense* sensu stricto e *A. sculptum* além da localização de *A. cajennense* sensu lato identificados nas quatro regiões climáticas brasileiras.



Fonte: Adaptado de Martins et al. (2016).

Esse carrapato possui um ciclo de vida trioxeno, isto é, necessita de três hospedeiros para se completar. Os equinos, antas e capivaras estão entre os hospedeiros preferenciais de *A. sculptum*, porém outras espécies também podem servir como hospedeiros devido a uma baixa especificidade parasitária, principalmente nas fases imaturas deste carrapato. Além disso, parasitam acidentalmente os seres humanos (ARAGÃO, 1936; LABRUNA et al., 2001). Para que essa espécie de carrapato se estabeleça e consiga formar populações estáveis deve-se ter na área pelo menos um dos hospedeiros preferenciais (SOUZA et al., 2006).

O ciclo se inicia com a fêmea totalmente alimentada (ingurgitada), chamada de teleógina, que se desprende do hospedeiro e cai no solo, preferencialmente no início da manhã, final da tarde e início do período noturno. A fêmea busca um local seguro entre a vegetação e ali permanece até o final da postura, após isso ela morre, deixando somente seus ovos para que se inicie uma nova fase do ciclo. Dos ovos eclodem as larvas, estas

após atingirem a maturidade vão subir nas folhas ou capim de plantas mais baixas e permanecem nas pontas em aglomerados até que um hospedeiro em potencial passe e as larvas se fixem nele. Nesse hospedeiro as larvas vão realizar o repasto até ficarem ingurgitadas, se desprenderem e caírem no solo para realização da ecdise. Após a primeira ecdise, as ninfas irão surgir e ficarão também na ponta das folhas à espera de algum hospedeiro. Essas ninfas também podem realizar uma busca ativa por hospedeiros, percorrendo pequenas distâncias. Após o contato com o novo hospedeiro, elas irão se fixar, realizar o repasto e desprenderão, no solo farão a segunda ecdise para se tornarem adultas que repetem o processo até conseguirem se alimentar em um terceiro hospedeiro (RODRIGUES et al., 2015).

## **2.2. Controle e prevenção de picadas de *A. sculptum* em animais e seres humanos**

Os acaricidas químicos têm sido utilizados como controle das infestações por carrapatos há vários anos nos animais domésticos. No último século, diferentes classes de acaricidas foram desenvolvidas para o controle de carrapatos, dentre elas as lactonas macrocíclicas, fenilpirazólicos, amidínicos, organofosforados, piretróides, benzofenilureas e, mais recentemente, as isoxazolininas. Apesar de todo o progresso, as possibilidades de contaminação do meio ambiente ainda são preocupantes, além desses compostos também poderem contaminar produtos de origem animal. Mesmo com os avanços do conhecimento do mecanismo de ação e o desenvolvimento de novas formulações acaricidas, o uso em excesso e sem cautela leva a preocupações com a perda de eficácia desses compostos pela seleção de populações de carrapatos resistentes (FURLONG; PRATA, 2000).

Para hospedeiros preferenciais de *A. sculptum*, o controle com acaricidas é usado nos equinos. Esse controle baseia-se em aplicações estratégicas de carrapaticidas da classe dos piretróides (alfametrina, cipermetrina etc) nos cavalos, que é o mais indicado para esta espécie animal, a cada sete dias durante os períodos em que predominam infestações por larvas e ninfas (abril a outubro) (CUNHA, 2007; LABRUNA et al., 2004; LEITE et al., 1997).

Para seres humanos, o uso de repelentes também é uma opção para evitar a aproximação e fixação dos carrapatos e, conseqüentemente, as reações induzidas pela picada e transmissão de agentes patogênicos (FRADIN, 2001). O N,N-Diethyl-3-methylbenzamide (DEET) é o repelente padrão ouro contra carrapatos e já foi comprovada sua repelência contra o carrapato *A. sculptum* (FERREIRA et al., 2017b;

SOARES et al., 2010a, 2010b). Contudo, existem relatos sobre efeitos adversos causados pelo uso de repelentes à base de DEET como vermelhidão, erupção e inchaço na pele e isso diminuiu a aceitação pública do produto (CDC, 2021).

A maior parte das pesquisas envolvendo repelentes para proteção individual é contra os mosquitos, porém, estudos recentes têm demonstrado um interesse em produtos para proteção também de carrapatos já que são veiculadores de diferentes patógenos (FRADIN, 1998). Assim o desenvolvimento de novos acaricidas e repelentes com baixo custo de produção e menos efeitos adversos é extremamente desejável, como por exemplo, produtos de origem botânica.

### **2.3. Bioacaricidas e repelentes à base de plantas contra *A. sculptum***

Com o objetivo de reduzir impactos negativos à saúde animal e humana e ao meio ambiente, produtos com base botânica como extratos de plantas, óleos essenciais, tem sido uma alternativa aos compostos sintéticos comerciais (BENELLI; PAVELA, 2018; FERREIRA et al., 2019; NWANADE et al., 2020; QUADROS et al., 2020). A prática do uso de plantas para fins medicinais é antiga e seus extratos vêm sendo utilizados em todo o mundo (MARTINS et al., 2002). A ação repelente ou acaricida de plantas se dá pelos metabólitos secundários, que estão envolvidos em mecanismos de defesa contra as condições de estresse do meio, e podem inibir a alimentação, o crescimento, a síntese de quitina, a reprodução e até afetar o comportamento dos carrapatos (SILVA et al., 2011).

Alguns países já comercializam pesticidas à base de óleos essenciais ou moléculas isoladas para o controle de carrapatos e insetos (ADENUBI et al., 2018; BAKKALI et al., 2008). Contudo, mais estudos devem ser realizados a fim de identificar formulações e estabelecer protocolos eficientes de uso (TERRA, 2008). Os ensaios em laboratório de repelência e mortalidade são o primeiro passo para a triagem de candidatos (ADENUBI et al., 2018; BISSINGER; ROE, 2010). Inicialmente, a pesquisa começa com a utilização de extratos brutos e óleos essenciais, posteriormente é realizada a identificação dos componentes presentes nesses extratos e óleos. Geralmente, os compostos majoritários são os que causam algum efeito, repelente ou acaricida, contra carrapatos (BENELLI E PAVELA, 2008). Sendo assim, é importante explicar o conceito de repelência e acaricida.

Os repelentes são substâncias que fazem com que o carrapato se mova ao contrário da fonte de odor. Contudo, eles podem agir na forma de contato ou na forma

olfativa, sendo assim, temos repelência de contato e repelência olfativa. Na repelência de contato, a substância teste causa um efeito “irritante” no carrapato, que ao entrar em contato com a substância demonstra um comportamento de se afastar e cair denominado “hot foot”. Já na repelência olfativa, o carrapato percebe a substância pelas sensilas do órgão de Haller (órgão olfativo do carrapato), realizam movimentos de “questing” seguidos de paradas durante sua caminhada, até a inversão da direção da marcha (BISSINGER; ROE, 2010; DAUTEL, 2004; HALOS et al., 2012).

Para avaliação da repelência de contato em *A. sculptum*, temos na literatura ensaios com e sem a presença de hospedeiros. Nos testes sem a presença de hospedeiros temos o teste de escalada em papel filtro (“*climbing test*”) e teste da placa de Petri e suas modificações (“*choice test*”, “*head-to-head*”), já com a presença do hospedeiro temos o teste da ponta do dedo (“*finger tip assay*”) (BARROZO et al., 2021; FERREIRA et al., 2017b; SOARES et al., 2010a, 2010c). Como testes de repelência olfativa, temos os ensaios de olfatometria utilizando olfatômetros em Y, por exemplo (FERREIRA et al., 2019, 2020).

Quanto aos testes de repelência, já foi verificada ação repelente dos compostos botânicos contra ninfas e adultos de *A. sculptum* por ensaios de repelência de contato. Sendo que, para ninfas, foram testados uma diversidade de compostos botânicos, que incluiu compostos isolados de óleos de *Callicarpa americana* (callicarpenal, intermedeol), *Hyptis suaveolens*, e óleo de coco (laurato de metila, caprato de metila e ácido graxo livre de coco), extratos brutos de *Melia azedarach* (“cinamomo”), *Cymbopogon nardus* (“citronela”), *Spiranthera odoratissima* (“manacá”), *Chenopodium ambrosioides* (“erva de Santa Maria”), *Ageratum conyzoides* (“mentrasto”), *Mentha pulegium* (“poejo”), *Ruta graveolens* (“arruda”), *Memora nodosa* e óleo essencial de *Nepeta cataria* (“erva de gato”) (SOARES et al., 2010; BARROZO et al., 2021).

Diante todos estes compostos testados contra ninfas de *A. sculptum*, o óleo essencial de *H. suaveolens* e os extratos de *C. ambrosioides* e *A. conyzoides* apresentaram índices de repelência equiparado ao DEET (SOARES et al., 2010). Destacam-se o ácido graxo livre de óleo de coco o óleo *N. cataria* e o éster metílico de C<sub>10</sub> repeliram a ninfas de *A. sculptum* por sete, quatro e três dias, respectivamente no ensaio da Placa de Petri (BARROZO et al. 2021). Já para adultos, machos e fêmeas, foi testado o β-citronelol, que é o componente majoritário isolado de óleos essenciais de plantas como *Dianthus caryophyllum* (“craveiro”), *Cymbopogon winterianus* (“citronela”) e *Perlagonium*

*graveolens* L. (“gerânio-cheiroso”). Os resultados demonstraram que o  $\beta$ -citronelol foi melhor que o DEET (FERREIRA et al., 2017).

Os testes para avaliação da mortalidade de *A. sculptum* mais utilizados são o Teste de Pacote de Larvas (TPL) e Teste de Imersão de Larvas (TIL). Estes testes avaliam a mortalidade de larvas 24h após tratamento e pode ser adaptado para ninfas, (ADENUBI et al., 2018). Quanto aos ensaios laboratoriais para avaliar o efeito acaricida de compostos botânicos contra *A. sculptum*, os registros incluem a ação acaricida de timol, carvacrol, eugenol e cinamaldeído, isolados e em associações, e óleo essencial de *Lippia sidoides* e *Taeges minuta* (“cravo-de-defunto”) contra larvas e ninfas de *A. sculptum*, com destaque para os três primeiros com maiores percentuais de mortalidade, atingindo 100% (GARCIA et al., 2012; GOMES et al., 2014; MENDES et al., 2011; NOVATO et al., 2015; SENRA et al., 2013). Ação do timol, carvacrol e eugenol isolados e suas combinações binárias tanto em condições de laboratório e semi-campo contra ninfas de *A. sculptum* foram avaliadas, sendo que em laboratório obteve-se taxas de mortalidade > 90% pelo TPL e em semi-campo a eficácia variou de aproximadamente 43 a 63% (MENDES et al., 2011; VALE et al., 2021). E por fim, o ácido graxo livre de óleo de coco, laurato de metila e caprato de metila (derivados do óleo de coco), causou 100% de mortalidade de larvas não alimentadas de *A. sculptum* (BARROZO et al., 2021).

Diante deste cenário, a utilização de produtos de origem botânica como extratos de plantas, óleos essenciais e substâncias isoladas destes extratos e óleos essenciais são promissoras para o desenvolvimento de tecnologias no controle de carrapatos (BENELLI; PAVELA, 2018; NWANADE et al., 2020; QUADROS et al., 2020). Sendo assim, o desenvolvimento de novas formulações ou a identificação de novas bases repelentes mais eficientes, com efeito equiparado ou mais prolongado e de baixo custo comparados ao DEET, poderiam auxiliar na prevenção de picadas e transmissão de patógenos por carrapatos.

#### **2.4. Atividade do alecrim-do-campo, hortelã e eucalipto contra carrapatos**

As plantas selecionadas para esse trabalho, *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo), *Mentha spicata* (hortelã) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto) são plantas já utilizadas pelo homem como plantas medicinais. A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC é uma planta arbustiva nativa do território brasileiro e pode ser encontrada nos biomas de Mata Atlântica, Cerrado e Pampa (HEIDEN, G.,SCHNEIDER, A, 2015). Ela é uma planta muito usada na medicina alternativa para tratar de problemas estomacais e

gástricos (TRINDADE; FACIONI; BORBA, 2007), além disso ela é a principal fonte para as abelhas produzirem o própolis verde (PARK et al., 2004). A espécie *Mentha spicata*, conhecida como hortelã, é uma planta rastejante e é muito usada para fins calmantes, já que é uma planta aromática e muito usada em chás e na indústria de cosméticos (LAWRENCE, 2006). Já o eucalipto (*Eucalyptus globulus*) é usado para tratamento de infecções comuns, tosse, asma e até em feridas (RAY; GOYAL; AGGARWAL, 2015). Essas plantas demonstraram ação repelente ou acaricida em algumas espécies de carrapatos, principalmente efeito acaricida contra *R. microplus* (ADENUBI et al., 2018; DE ASSIS LAGE et al., 2015). Mas, ainda faltam informações na literatura sobre seu efeito em *A. sculptum*.

De Assis Lage et al. (2015) avaliaram a composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia* e atividade acaricida do óleo e de seus constituintes em larvas não ingurgitadas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os constituintes majoritários do óleo essencial de alecrim-do-campo foram o nerolidol (22,3%), germacreno D (7,2%), limoneno (6,9%),  $\beta$ -pineno (6,7) e biciclogermacreno (6,5%). Apenas o óleo essencial de alecrim-do-campo e o nerolidol apresentaram efeito acaricida acima de 90% contra larvas (teste pacote de larvas) nas concentrações de 10 e 15 mg/mL. Quanto às fêmeas ingurgitadas, o óleo essencial e o nerolidol causaram redução na quantidade dos ovos produzidos, com percentual de controle de 96 e 90%, nas concentrações, respectivamente. Cazella et al. (2020) testaram o óleo essencial de alecrim-do-campo em *R. microplus* quando foi avaliada a ação acaricida *in vitro* e *ex situ* das folhas e flores. Os resultados obtidos demonstram que concentrações de até 500 mg/mL são eficazes no controle de eclosão de ovos com uma redução de 65%. Houve uma redução de oviposição de 80% na dosagem de 400 mg/mL e atividade larvicida de 95% com 13,36 mg/mL de óleo essencial. Nos adultos, a mortalidade foi de 80% na dosagem de 400 mg/mL pelo teste de imersão. Os autores mostraram que o principal composto dessa planta é o Nerolidol.

Mkolo et al. (2011) testaram a ação repelente e acaricida do óleo essencial de hortelã nas concentrações de 5, 10 e 20% em adultos de *Amblyomma hebraeum*. A repelência durou cerca de 80 minutos e, em seguida ao experimento, os carrapatos foram morrendo. A mortalidade em todas as concentrações foi de 100% em diferentes intervalos de tempo (80, 60, 40, 30, 20 minutos). As larvas tratadas não aderiram ou ingurgitaram em coelhos. Os compostos mais relevantes encontrados foram o Mentol, Piperitona e  $\gamma$ -Terpeneno e os testes foram feitos por imersão de adultos. No Egito, El-Seedi et al. (2012) observaram efeito repelente de 93% do óleo essencial comercial de folhas de *M. spicata*

contra ninfas de *Ixodes ricinus* em laboratório. Já a campo, utilizando a técnica do arraste de flanela, foi verificada repelência de 59% quando comparada ao controle. Os componentes majoritários foram carvona (55%) e pulegona (14%). Contudo, o trabalho apresentou uma tabela que mostra que em outras regiões do Mediterrâneo, os autores identificaram outros compostos como majoritários.

O óleo de eucalipto é uma mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos e sua composição varia de acordo com a espécie da planta (BOLAND et al., 2006), sendo o composto majoritário o eucaliptol (sinônimos: cineol, 1,8 cineol) (CHAGAS et al., 2002; ADENUBI et al., 2021). No Brasil, Chagas et al. (2002) utilizaram o óleo essencial de eucalipto em larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 30% diluídas em álcool metílico. Os testes foram feitos em papéis filtro impregnados. Na concentração de 15%, foi verificada 100% de mortalidade das larvas e, no caso das fêmeas ingurgitadas na concentração de 10%, obtiveram 100% de mortalidade. Adebubi et al. (2021), na Nigéria, verificaram 97% de mortalidade das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus annulatus* submetidas ao teste de imersão de adultos com óleo essencial de eucalipto a 10%. No Egito, para esta mesma espécie de carrapato, o óleo de eucalipto teve um efeito significativo sobre adultos em concentrações > 5%, e na concentração de 10% apresentou 96,7% de atividade adulticida e interrompeu a eclosão dos ovos (ARAFA et al., 2020).

Visto a ausência de estudos com *A. sculptum* destes compostos e o potencial relatado de alecrim-do-campo, eucalipto e hortelã contra carrapatos de outras espécies, estes produtos de origem botânica têm potencial para serem explorados na triagem de novos repelentes para uso em seres humanos e efeito acaricida para desenvolvimento de formulações para usar no controle de carrapatos em equinos, por exemplo.

### 3. JUSTIFICATIVA

Problemas com carrapatos têm se tornado cada vez mais frequentes em áreas urbanas e periurbanas onde tem-se observado um aumento no número de indivíduos picados por carrapatos e um aumento de casos de Febre Maculosa Brasileira, principalmente nos estados do sudeste brasileiro. A maior parte das áreas onde carrapatos causam problemas em humanos tem o envolvimento da espécie *A. sculptum*.

Uma alternativa para evitar esses problemas seria o uso de acaricidas e repelentes. Apesar dos acaricidas e repelentes a base de DEET disponíveis no mercado apresentarem efeito notórios contra carrapatos, existem relatos de efeitos adversos como contaminação ambiental e populações de carrapatos resistentes em relação aos acaricidas e relatos de alergias e intolerâncias por seres humanos com o uso de repelentes. Assim, o desenvolvimento de novas formulações que possuam efeito de repelência semelhante ou mais intenso que os produtos disponíveis, ou com maior duração e com um menor custo de produção, são de extrema importância.

O uso de plantas com potencial repelente e/ou acaricida seria de grande utilidade, pois estão presentes de forma difusa em áreas do Brasil, poderiam ser de fácil acesso e baixo custo para servir como uma ferramenta para o combate aos problemas causados por carrapatos, e atendem uma demanda do mercado por serem sustentáveis.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia de infusões de alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia* DC) e hortelã (*M. spicata*), e do óleo essencial de eucalipto (*E. globulus*), na repelência e mortalidade de carrapatos da espécie *A. sculptum*.

### 4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia de diferentes concentrações do óleo essencial de *E. globulus*, e infusões alcoólicas de *B. dracunculifolia* DC e *M. spicata*, separadamente, na repelência de ninfas de carrapatos da espécie *A. sculptum*, utilizando o teste de escalada em papel de filtro.
- Avaliar a eficácia do óleo essencial de *E. globulus*, e infusões alcoólicas de *B. dracunculifolia* DC e *M. spicata*, em diferentes combinações binárias e múltiplas na repelência de ninfas de carrapatos da espécie *A. sculptum*, utilizando o teste de escalada em papel de filtro.
- Descrever a sinergia (potencialização ou antagonismo) do efeito repelente sobre ninfas de *A. sculptum* das formulações contendo óleo essencial de *E. globulus*, e infusões alcoólicas de *B. dracunculifolia* DC e *M. spicata*.
- Selecionar as formulações (isoladas ou em combinações) que apresentaram os maiores efeitos repelentes no teste de escalada em papel de filtro contra ninfas de carrapatos *A. sculptum* e avaliar seu efeito repelente no teste de escalada em ponta de dedo.
- Avaliar o efeito acaricida das formulações (isoladas ou em combinações) que apresentaram os maiores efeitos repelentes sobre larvas de *A. sculptum*

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Delineamento experimental

Inicialmente foram produzidas soluções hidroalcoólicas à base de alecrim-do-campo, hortelã e adquirido o óleo essencial de eucalipto. Essas soluções foram testadas isoladamente, em dose-resposta, no teste de escalada (“*Climbing Test*”) em papel filtro impregnado e as leituras foram realizadas em tempos diferentes. As concentrações de cada planta, que apresentaram os maiores médias de repelência durante as horas de teste, foram usadas para produzir diferentes combinações com duas (binárias) ou três (múltiplas) plantas, e estas formulações foram novamente avaliadas no teste de escalada em papel de filtro impregnado. Para os testes de escalada, o N,N-Diethyl-3-methylbenzamide foi utilizado como controle positivo e o álcool etílico 70% usado como controle negativo, e posteriormente foi realizado o cálculo de sinergismo.

Após os testes de triagem utilizando o teste de escalada em papel filtro, as formulações que apresentaram os maiores médias de repelência ao longo do tempo foram avaliadas no teste da ponta de dedo (“*Finger Tip Test*”) e tiveram seu efeito acaricida avaliado pelo teste de imersão de larvas.

### 5.2. Identificação das plantas, obtenção das soluções hidroalcoólicas à base de alecrim-do-campo, hortelã e do óleo essencial de eucalipto e concentrações testadas

#### 5.2.1. Alecrim-do-campo e Hortelã

Galhos com folhas de *B. dracunculifolia* foram colhidos entre 7 e 8 horas da manhã na localização 19°55'42.2"S, 44°01'10.5"W (Contagem - MG). Já as folhas de *M. spicata* foram coletados na localização 19°56'22"S 44°01'09"W (Belo Horizonte – MG) no dia 01 de abril de 2023 às 6 horas da manhã. O material coletado foi transportado para o Laboratório de Artrópodes Hematófagos (LAH) no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). A preparação foi feita imediatamente pela infusão do galho/folhas em um recipiente de vidro contendo o álcool etílico seguido do armazenamento por 10 dias a 4°C na geladeira, após este período o galho com as folhas foi retirado e a infusão pode ser usada por até 6 meses.

Para a produção da infusão de *B. dracunculifolia* foram utilizados 500 mL de álcool etílico 70%, e um galho de 20 g, contendo folhas e caule *in natura* da planta. Na

produção da infusão de *M. spicata* foram utilizados 500 mL de álcool etílico 70% e 16 gramas de folhas *in natura* frescas. As infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo e de hortelã foram diluídas em etanol 70% e testadas nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5%.

Simultaneamente, para identificação das plantas utilizadas neste trabalho, as exsiccatas foram depositadas no Herbário/UFMG e registradas com os seguintes números de registro: *Baccharis dracunculifolia* DC - BHCB 7132, e *Mentha spicata* L - BHCB 7641.

### 5.2.2. Eucalipto

Para o eucalipto foi utilizado o produto comercial Óleo Essencial de Eucalipto Globulus 10 mL (BioEssência®). O laudo cromatográfico da empresa indica o eucaliptol como componente majoritário (<https://www.bioessencia.com.br/oleo-essencial-de-euc-globulus-organico-10-ml.html>). A solução de uso foi preparada a partir da adição de 500 uL do produto em q. s. p. 100 mL de álcool etílico 70%, isto é, 0,5% de concentração final. Outras soluções de menor concentração foram preparadas através da diluição da solução mais concentrada em álcool etílico 70%. O óleo essencial de eucalipto foi testado nas concentrações de 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625%.

### 5.3. Carrapatos experimentais

Foram utilizados carrapatos provenientes da colônia de *A. sculptum* mantida no LAH no ICB-UFMG, coletados originalmente em na fazenda da UFMG em Pedro Leopoldo, MG. Para a manutenção da colônia, os carrapatos foram mantidos em estufa BOD, em condições de umidade e temperatura controladas ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $90 \pm 10\%$  de umidade), e alimentados de acordo com Bouchard & Wikel (2005). Para isso, os carrapatos foram colocados em câmaras de alimentação feitas com tubos de polipropileno de 1,5 mL, cortados e fixados ao dorso dos camundongos, e as tampas perfuradas com agulha para permitir a circulação de ar dentro do recipiente contendo os carrapatos. Larvas, ninfas e adultos foram alimentados em camundongos da linhagem Swiss de oito a doze semanas de idade. Os procedimentos de manutenção da colônia foram aprovados pela CEUA UFMG sob número de protocolo 60/2020. Para todos os experimentos, foram usadas ninfas de *A. sculptum* não alimentadas com 20 a 40 dias pós-ecdise.

## 5.4. Ensaio de repelência

### 5.4.1. Teste de escalada em papel filtro impregnado

O teste de repelência conhecido como teste vertical ou de escalada, explora o comportamento que os carrapatos têm de escalar superfícies verticalmente (geotropismo negativo). Neste trabalho será utilizado um protocolo adaptado do teste de escalada de Carroll et al. (2004).

Para realização do teste foram cortados papéis filtro (JProlab de gramatura 80 g) na medida 10 x 6 cm, em que foram feitas marcações deixando um espaço de 2,5 cm em cada extremidade de forma que a área central tivesse 5 cm. Os papéis filtro cortados foram colocados horizontalmente em placas de petri e tratados com 100 uL da solução teste espalhados uniformemente na área central de 30 cm<sup>2</sup> do papel filtro, utilizando uma pipeta calibrada, de forma que a concentração final foi de 3,3 uL/cm<sup>2</sup>. Após a aplicação, os papéis filtro foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos até que ficassem totalmente secos e, em seguida, fixados com fita adesiva na extremidade superior em uma haste de madeira a 28 cm da mesa, para que ficassem suspensos na vertical. Cada papel filtro ficou a 5 cm de distância dos demais papéis tratados. Abaixo dos papéis foi colocada uma bacia com água para evitar a fuga de espécimes. Álcool etílico 70% foi usado como controle negativo e, como controle positivo, o N,N-Diethyl-3-methylbenzamide (DEET) a 8,5% (repelente Tchou Mosquito®) ou a 6,65% (Repelente Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson), conforme informado na legenda de cada figura.

Para o ensaio, cinco ninfas de *A. sculptum* foram colocados na extremidade inferior não tratada do papel filtro com auxílio de pincéis de cerdas macias (Figura 2) e o comportamento das ninfas foi avaliado em diferentes tempos (10 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas). Para saber se houve ou não repelência, em cada tempo, os carrapatos foram observados de forma que, os que passaram pela parte tratada foram considerados não repelidos, já aqueles que caíram durante a migração ou que tocaram na área tratada do papel, mas voltaram para a área não tratada foram considerados repelidos. Carrapatos diferentes da mesma espécie foram utilizados para fazer o teste em cada replicata. Foram utilizados cinco papéis filtro, com cinco ninfas cada em três replicatas realizadas em três dias diferentes, para cada controle e concentração das soluções testadas.

**Figura 2:** Ensaio de escalada em papel filtro impregnado.



#### 5.4.2. Teste de escalada em ponta de dedo

Para este teste, três voluntárias participaram (três mulheres, de idade entre 22 a 28 anos). Um termo de consentimento livre e esclarecido foi passado a elas para ciência das preparações pré-teste e com informações sobre o ensaio. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 51607321.7.0000.5149). A metodologia utilizada foi a de Soares et al. (2010) na qual a falange proximal dos dedos indicadores esquerdo dos voluntários foi tratada com  $2,75 \text{ uL/cm}^2$  das formulações, do controle positivo ou do controle negativo. A área tratada foi calculada a partir do dedo esquerdo de cada voluntário com a fórmula  $dh$  (diâmetro e altura). Uma vez tratados, as voluntárias evitaram o contato com outras superfícies, para reduzir interferências externas. Cada voluntária repetiu o teste três vezes, com cada concentração, em dias diferentes.

Ninfas de *A. sculptum* não alimentadas de 20 a 40 dias pós-ecdise foram usadas nos tempos de 10 min e 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento. Se a repelência mantivesse inferior a 50% na hora 3, o teste seria interrompido. Cada voluntário utilizou 10 ninfas por tempo testado, colocadas individualmente. As ninfas usadas foram testadas inicialmente no dedo não tratado para posteriormente serem usadas no dedo tratado. Apenas ninfas que atravessaram a falange proximal do dedo não tratado em direção à mão

foram utilizadas no dedo tratado. O dedo foi posicionado na vertical, com a ponta apoiada formando um ângulo de aproximadamente 90° com a bancada teste. As ninfas não foram reutilizadas e foram observadas por no máximo 1min e 30s. Repelência foi considerada quando: (i) carrapatos que após o término do intervalo de tempo permaneceram nas falanges medial ou proximal; (ii) carrapatos que caíram após entrar em contato com a área tratada; (iii) carrapatos que inverteram a direção ao entrar em contato com a área tratada. Carrapatos que atravessaram a área tratada foram considerados não repelidos.

#### **5.4.3. Teste de Imersão de Larvas**

O teste de imersão de larvas foi realizado seguindo o método descrito por Klafke et al. (2006). As soluções que apresentaram maior taxa de repelência pelo teste de triagem em papel de filtro impregnado foram usadas para a realização do teste de imersão de larvas de *A. sculptum*. Todas as diluições foram preparadas em álcool etílico 70%, e foram realizados cinco ensaios independentes, com duas repetições cada (dois tubos do tipo eppendorf para cada diluição), sendo 10 ensaios por solução. Para o grupo controle foi usado álcool etílico 70%.

Para os testes, aproximadamente 100 larvas não alimentadas de *A. sculptum* foram imersas em cada solução por 10 minutos. Os tubos de plástico foram fechados após a imersão e passado o tempo de 10 minutos, as larvas foram transferidas para o papel filtro (JProlab de gramatura 80 g) seco, para retirar o excesso da solução antes de transferi-las para um pacote também de papel filtro limpo e seco (8,5 x 7,5 cm), selados com cliques plásticos. As embalagens foram levadas a estufa BOD à temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa (UR)  $\geq 80\%$  por 24 horas. Após a incubação, as larvas vivas e mortas foram contadas usando uma bomba de sucção a vácuo. As larvas de carrapatos que não possuíam movimento após a estimulação com CO<sub>2</sub> foram consideradas mortas.

#### **5.5. Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos foram transferidos para planilhas do Excel e do GraphPad Prism versão 5.1. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, sendo  $p > 0,05$  considerado para dados com distribuição normal. Os dados com distribuição normal, no caso de mais de dois grupos, foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como limite para o nível e significância.

Quando as substâncias foram testadas em associação, foi verificado o efeito sinérgico de acordo com a metodologia descrita por Marking e Dawson (1975). Nesse método, o efeito das associações de compostos foi comparado com o efeito das formulações contendo as plantas isoladamente. Resultados acima de 1 indicam efeito potencializador, enquanto os resultados abaixo de 1 indicam efeito antagônico, e igual a 1 indica semelhança.

A mortalidade das larvas de *A. sculptum* foi avaliada através da contagem das mesmas no teste de imersão. Foi usado como parâmetro o controle positivo, a fim de, avaliar quais combinações/substâncias obtiveram os melhores resultados.

## 6. RESULTADOS

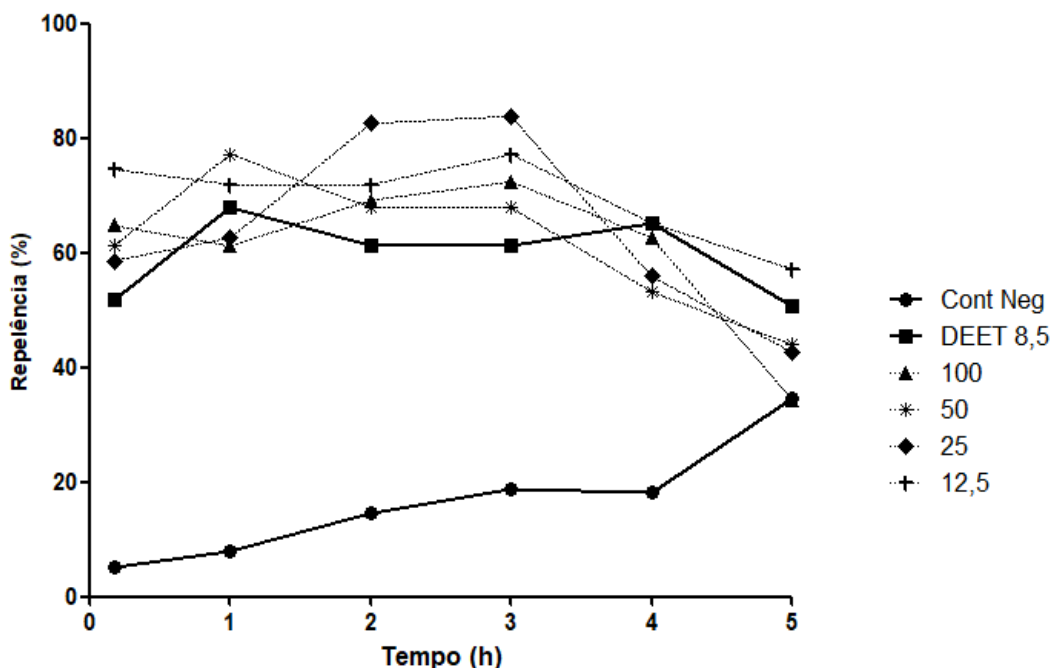
### 6.1. Teste de escalada em papel filtro utilizando soluções com cada planta isoladamente

#### 6.1.1. Infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo

Os testes com a infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo mostraram variações percentuais na repelência entre as concentrações testadas (100, 50, 25 e 12,5%, controle negativo, e DEET 8,5%) ao longo do tempo (10 minutos, 1, 2, 3, 4 e 5 horas). Todas as concentrações apresentaram um perfil relativamente semelhante, com efeito repelente levemente crescente de 10 minutos até 2 ou 3 horas, e repelência decrescente a partir de 3 horas (Figura 3). A porcentagem de repelência variou de 34,4% a 84% e vale destacar que todas as concentrações apresentaram repelência acima de 55% até a quarta hora de teste. No tempo de 5 horas, apenas a concentração de 12,5% teve repelência acima de 50%.

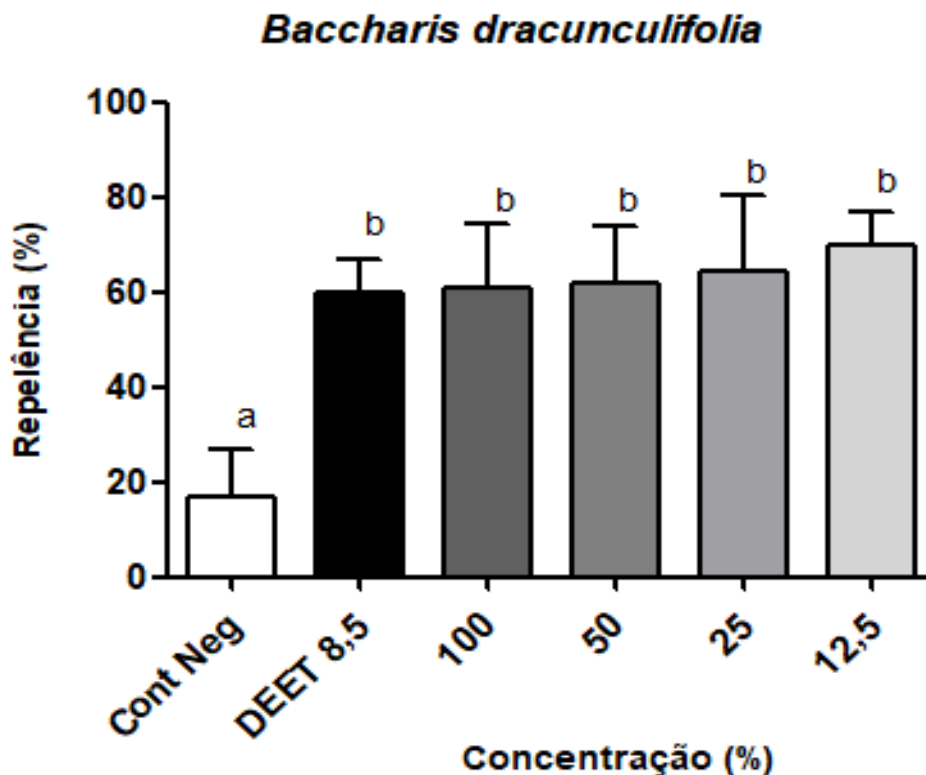
A concentração de 12,5% foi a que se mostrou mais eficaz. Essa concentração obteve a maior ação repelente durante quatro horas analisadas (74,7% em 10 minutos, 72% em 1 hora e 2 horas, 77,3% em 3 horas, e 65,3% em 4 horas), com leve queda após a quinta hora (57,3%). Já a concentração de 25% da infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo se mostrou eficaz no tempo de 2 horas (82,7%) e 3 horas (85%), entretanto, após este período é observada uma queda acentuada na hora 4 (56%) e hora 5 (42,7%). Destaca-se também, que todos os testes realizados se mostraram menos consistentes na hora 5, incluindo o controle negativo.

**Figura 3:** Efeito repelente de diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 8,5 - repelente comercial Tchou Mosquito® contendo DEET a 8,5%.



Na tentativa de identificar a concentração que apresentou maior efeito repelente, foi calculada a média de repelência de cada concentração entre todos os tempos testados, ou seja, a média geral de 10 minutos a 5 horas. A concentração de 12,5% foi a que obteve a maior ação repelente durante todo o período analisado com uma média de 69,8%, enquanto a que obteve o menor efeito médio foi a concentração de 100%, com 60,8% de repelência (Figura 4). Todas as concentrações testadas tiveram efeito repelente significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao controle negativo, porém não houve diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ) entre os efeitos repelentes médios de todas as concentrações testadas nem entre estas e o DEET 8,5%. Como a concentração de 12,5% é a que utiliza menor quantidade de alecrim-do-campo e apresentou o efeito repelente absoluto maior, ela foi selecionada para avançar para os experimentos seguintes. Vale ressaltar que o DEET utilizado neste ensaio foi da marca Tchou Mosquito® (DEET 8,5%) e sua repelência média ao longo do tempo testado foi de apenas 59,8% (Figura 4).

**Figura 4:** Atividade repelente média das diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 8,5 - repelente comercial Tchou Mosquito® contendo DEET a 8,5%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



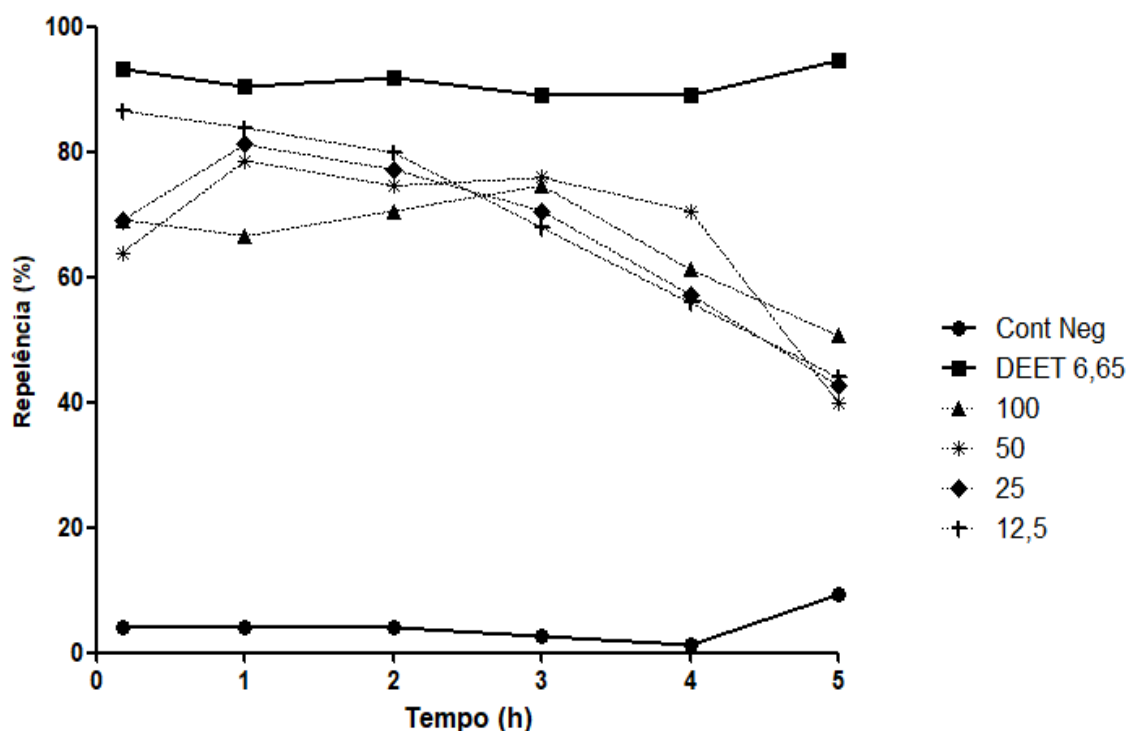
### 6.1.2. Infusão hidroalcoólica de hortelã

Os testes com infusão hidroalcoólica de hortelã também mostraram variações percentuais no efeito repelente entre as concentrações testadas ao longo do tempo. A porcentagem de repelência variou de 40 a 86,7%, destacando que todas as concentrações apresentaram uma repelência acima de 60% até a terceira hora e acima de 56% até a quarta hora do teste. Após esse período, isto é, na quinta hora, todas as concentrações tiveram repelência inferior a 51% (Figura 5).

A concentração de 12,5%, dentre as testadas, se mostrou com repelência acima de 80% contra ninfas de *A. sculptum* desde os 10 primeiros minutos (86,7%), assim como na primeira hora (84%) e na terceira hora (80%). Entretanto, após este período, é observada uma queda no efeito (68% em 3 horas, 56% em 4 horas e 44% em 5 horas) (Figura 5).

O controle positivo utilizado neste ensaio foi o DEET 6,65% (repelente comercial Off® Spray Longa Duração, S C Johnson) que apresentou efeito repelente superior a 90% ao longo de todo o tempo avaliado (Figura 5), um resultado consideravelmente superior ao controle positivo usado no teste com alecrim-do-campo (Figura 3). Assim, esse controle positivo foi mantido para os testes subsequentes.

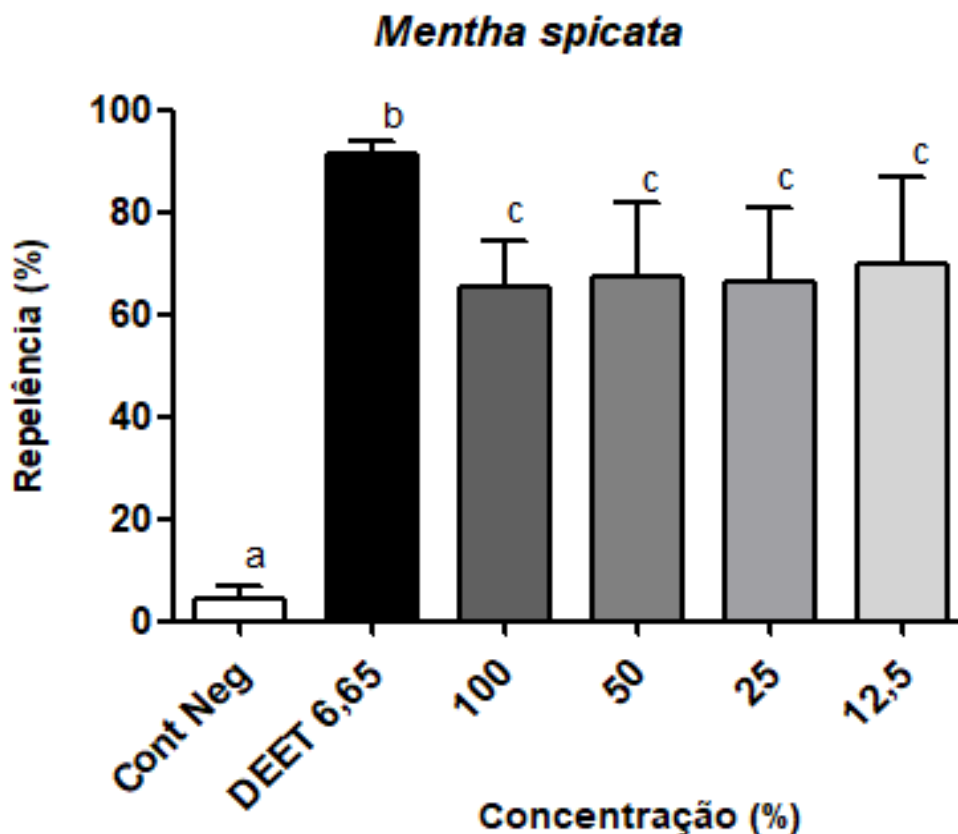
**Figura 5:** Efeito repelente de diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de hortelã (*Mentha spicata*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65- Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%.



Com o intuito de identificar a concentração que apresentou maior ação repelente, foi calculada a média geral de repelência de cada concentração entre todos os tempos testados, ou seja, a média de 10 minutos a 5 horas. A concentração de hortelã 12,5% foi a que obteve a maior ação repelente durante todo o período analisado com a média de 69,8%, enquanto a que obteve menor efeito médio foi a concentração de 100% com 65,6% de repelência (Figura 6), entretanto, não houve diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ) entre as concentrações testadas. O controle positivo teve um efeito repelente significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a todas as concentrações testadas, enquanto o efeito do controle negativo foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) (Figura 6).

As concentrações de 12,5% e 25% foram selecionadas para avançar para os experimentos seguintes: combinação binária e combinação múltipla.

**Figura 6:** Atividade repelente média das diferentes concentrações da infusão hidroalcoólica de hortelã (*Mentha spicata*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65- repelente comercial Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



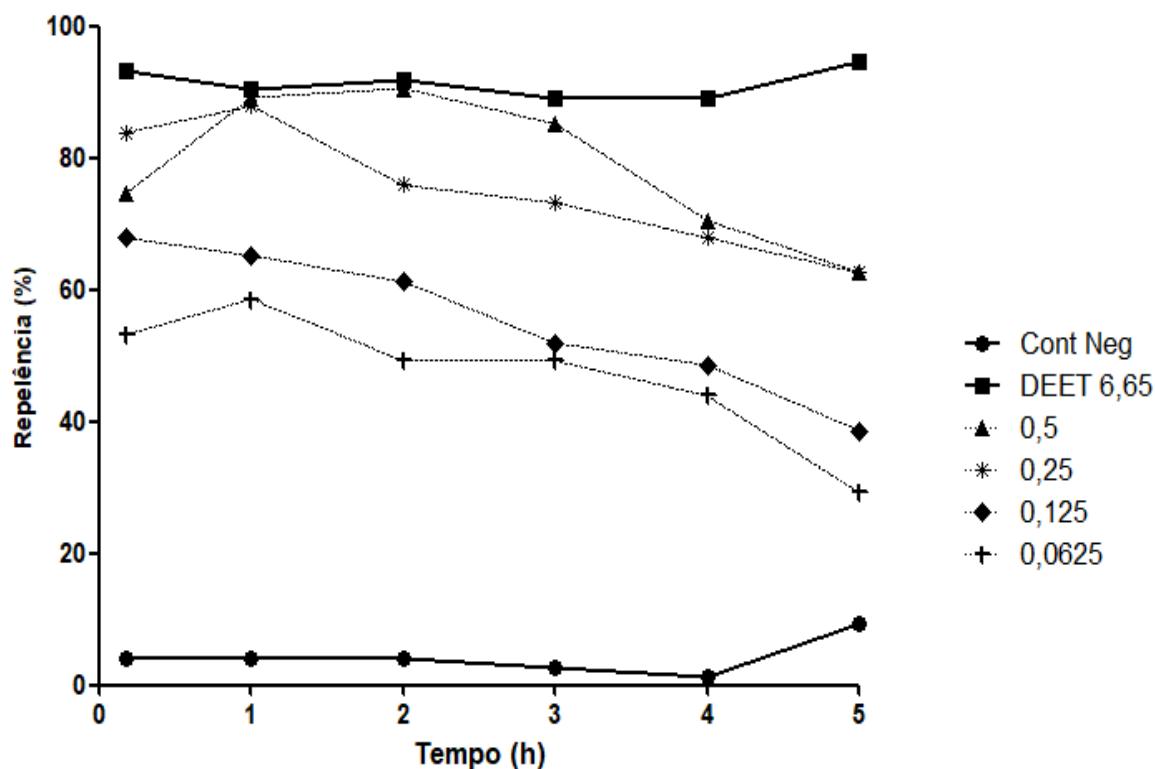
### 6.1.3. Óleo essencial de eucalipto

Os testes com óleo essencial de eucalipto também mostraram variações percentuais entre as concentrações testadas ao longo do tempo. Foram observados três perfis distintos. As concentrações de 0,0625 e 0,25% apresentaram efeito repelente crescente de 10 minutos para a hora 1, e em seguida foram decrescentes até a hora 5 (Figura 7). A concentração de 0,125% obteve maior efeito repente aos 10 minutos com efeito decrescente até a hora 5, enquanto a concentração de 0,5% apresentou aumento de 10 minutos para 1 hora, ficou relativamente alto e estável de 1 a 3 horas, e, em seguida, apresentou redução na repelência até a hora 5 (Figura 7).

A concentração de 0,5% se mostrou a mais eficaz na repelência das ninfas de *A. sculptum*. A repelência foi acima de 70% em 10 minutos (74,7%), hora 1 (89,3%), hora 2 (90,7%), hora 3 (85,3%) e hora 4 (70,7%), e apenas na hora 5 observa-se um valor abaixo de 70% (62,7%). Já a concentração de 0,25% também se mostrou bastante eficaz com repelência acima de 80% na primeira hora (84,0%) e na segunda hora (88,0%), acima de 70% na terceira (76,0%) e quarta hora (73,3%), abaixo de 70% apenas na quinta hora

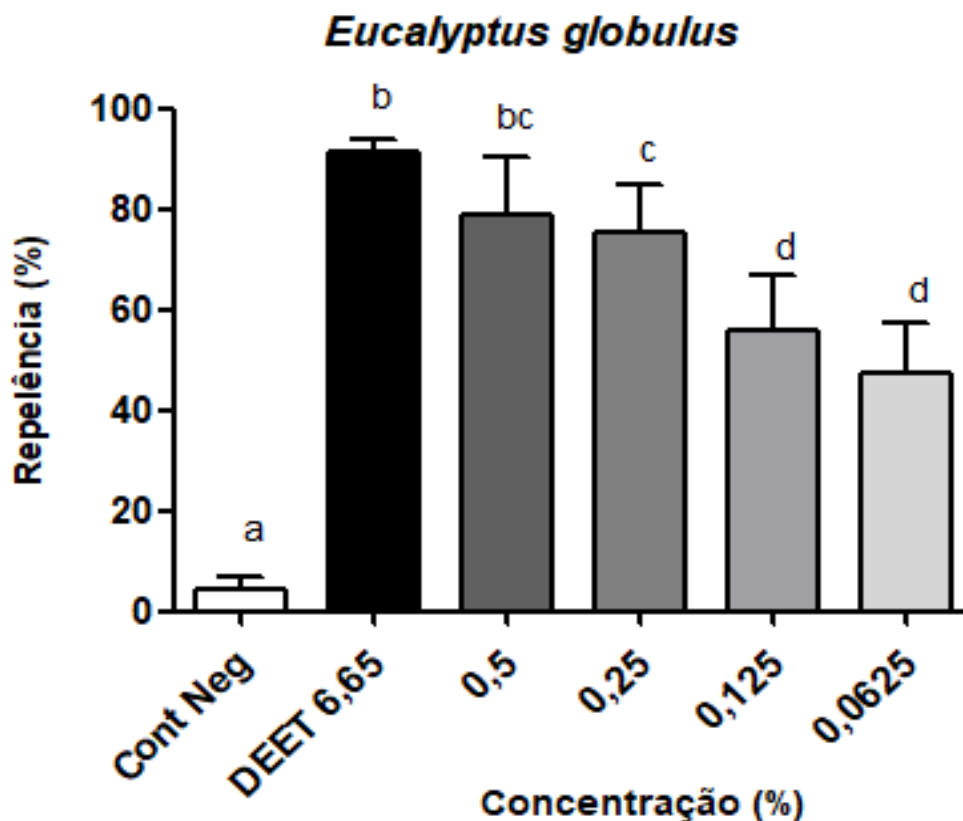
(62,7%). As outras concentrações apresentaram efeito abaixo de 70% em todos os tempos avaliados (Figura 7).

**Figura 7:** Efeito repelente de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65- repelente comercial Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%.



As melhores concentrações foram obtidas através da média geral de repelência de cada concentração entre os tempos. A concentração de eucalipto 0,5% foi a que obteve os melhores resultados com ação repelente com média de 78,9% e efeito significativamente semelhante ( $p > 0,05$ ) ao controle positivo. Também chamou a atenção o efeito repelente da concentração de 0,25% que, apesar de estatisticamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao controle positivo, foi estatisticamente semelhante ( $p > 0,05$ ) à concentração de 0,5% (Figura 8). Dessa forma, essas duas concentrações 0,5 e 0,25% foram selecionadas para os ensaios subsequentes com combinações binárias e múltiplas. Ressalta-se que houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle negativo e todas as concentrações testadas.

**Figura 8:** Atividade repelente média das diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - repelente comercial Off® Spray Longa Duração spray, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



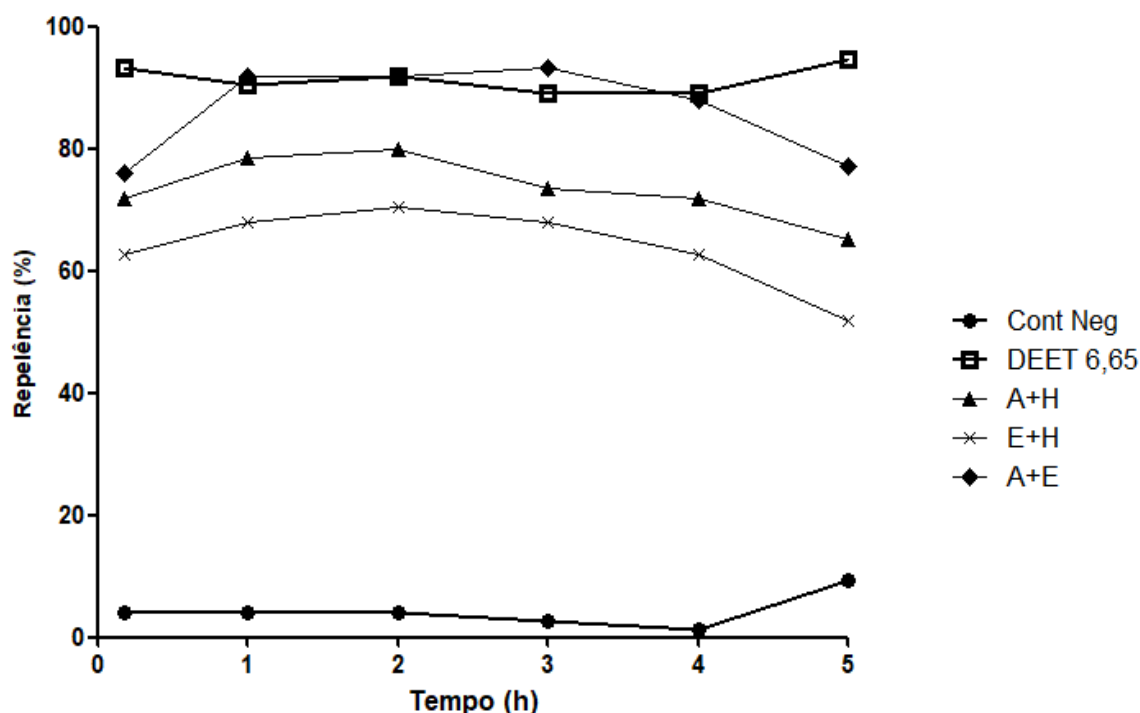
## 6.2. Combinações binárias das infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo, hortelã e óleo essencial de eucalipto

Os testes com as combinações binárias das infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo, de hortelã e do óleo essencial de eucalipto foram testadas com as concentrações selecionadas a partir dos testes anteriores. As combinações (v:v) feitas foram da seguinte forma: a) alecrim-do-campo e hortelã (12,5% e 12,5%); b) eucalipto e hortelã (0,5% e 12,5%); c) alecrim-do-campo e eucalipto (12,5% e 0,5%); sendo que as porcentagens indicam a concentração final de cada composto na formulação. Novamente foram usados dois controles: controle negativo (etanol 70%) e DEET 6,65 (Off® Spray contendo DEET a 6,65%).

Os pares apresentaram perfil do efeito repelente relativamente semelhante, sendo crescente do minuto 10 para a hora 1, alcançaram a melhor repelência entre a hora 1 e a hora 3, e após esse período observa-se uma queda gradual na repelência (Figura 9). A

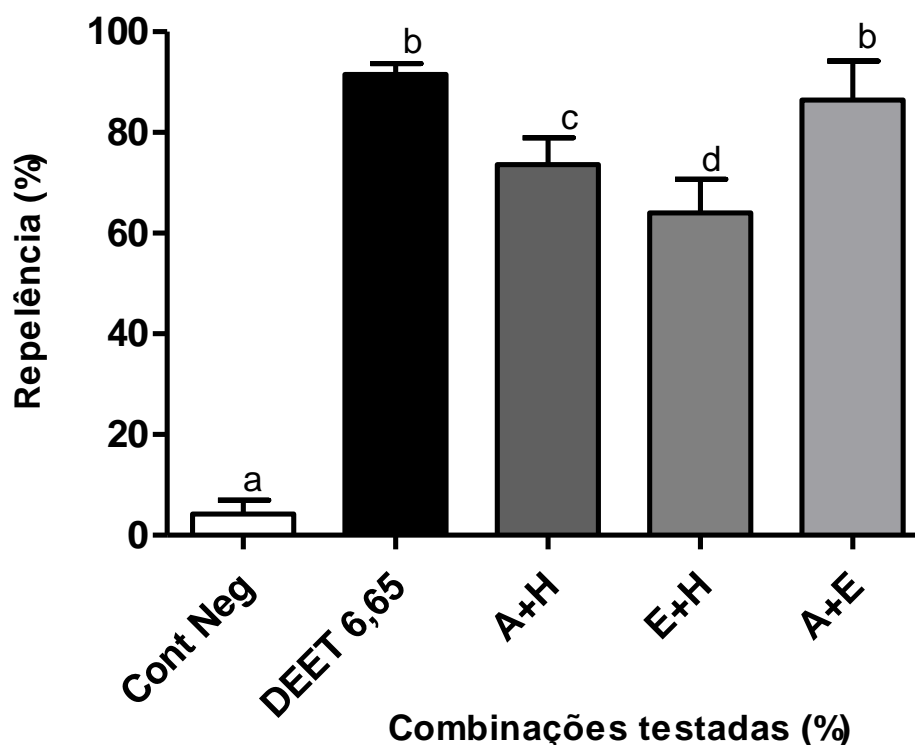
combinação com melhores percentuais de repelência das ninfas de *A. sculptum* foi de alecrim-do-campo 12,5% e eucalipto 0,5%, com ação repelente acima de 76% em todas as horas observadas e equivalente ao controle positivo nos tempos de 1 a 4 horas (Figura 9). A combinação de alecrim-do-campo 12,5% e hortelã 12,5% se mostrou eficaz com repelência acima de 72% até a hora 4, na hora 5 a repelência foi de 65,3% das ninfas *A. sculptum*. O par de eucalipto 0,5% e hortelã 12,5% foi o que apresentou a menor eficácia com repelência entre 60 e 70% de 10 min a 4 horas e 52% na hora 5 (Figura 9).

**Figura 9:** Efeito repelente das combinações binárias entre alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. A+H: alecrim-do-campo 12,5% + hortelã 12,5%; E+H: eucalipto 0,5% + hortelã 12,5%, A+E: alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5%; Cont Neg: controle negativo- etanol 70%, DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%.



Com a finalidade de melhor visualizar os efeitos dessas combinações binárias, foi calculada a média geral de repelência de cada par ao longo do tempo. A combinação de alecrim-do-campo 12,5% e eucalipto 0,5% foi a que obteve os melhores resultados com ação repelente com média de 86,4%, resultado que foi estatisticamente similar ao controle positivo ( $P > 0,05$ ) e significativamente superior às outras combinações ( $p < 0,05$ ). O DEET foi estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) às formulações alecrim-do-campo 12,5% + hortelã 12,5% e eucalipto 0,5% + hortelã 12,5% e houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle negativo para as demais combinações.

**Figura 10:** Atividade repelente média das combinações binárias entre alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. A+H: alecrim-do-campo 12,5% + hortelã 12,5%; E+H: eucalipto 0,5% + hortelã 12,5%, A+E: alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5%; Cont Neg: controle negativo- etanol 70%, DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



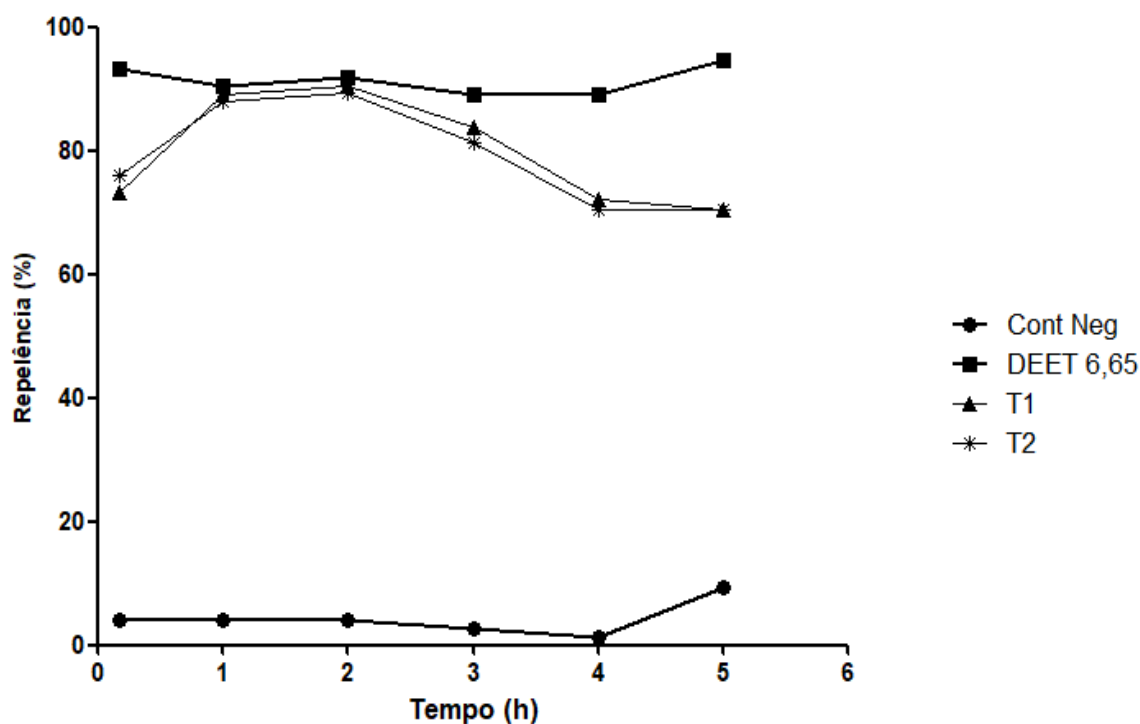
### 6.3. Combinações múltiplas das infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo e hortelã, e óleo essencial de eucalipto

Neste ensaio, as melhores concentrações individuais foram unidas para compor uma solução com todas as plantas (alecrim-do-campo, hortelã e eucalipto) com a finalidade de verificar a eficácia delas conjuntamente, ao longo do tempo. A solução chamada de T1 foi composta por alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, com as melhores concentrações de todos os testes realizados. A solução chamada T2 foi composta por alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, com as segundas melhores concentrações observadas ao longo dos testes (Figura 11).

As combinações apresentaram efeito repelente semelhante, com aumento crescente até a hora 2, quando atingiram a melhor taxa de repeleência, e depois uma moderada queda na repeleência. Tanto para T1 quanto para T2 observa-se repeleência acima de 70% em todas os tempos analisados. Tanto a combinação T1 quanto T2 obtiveram

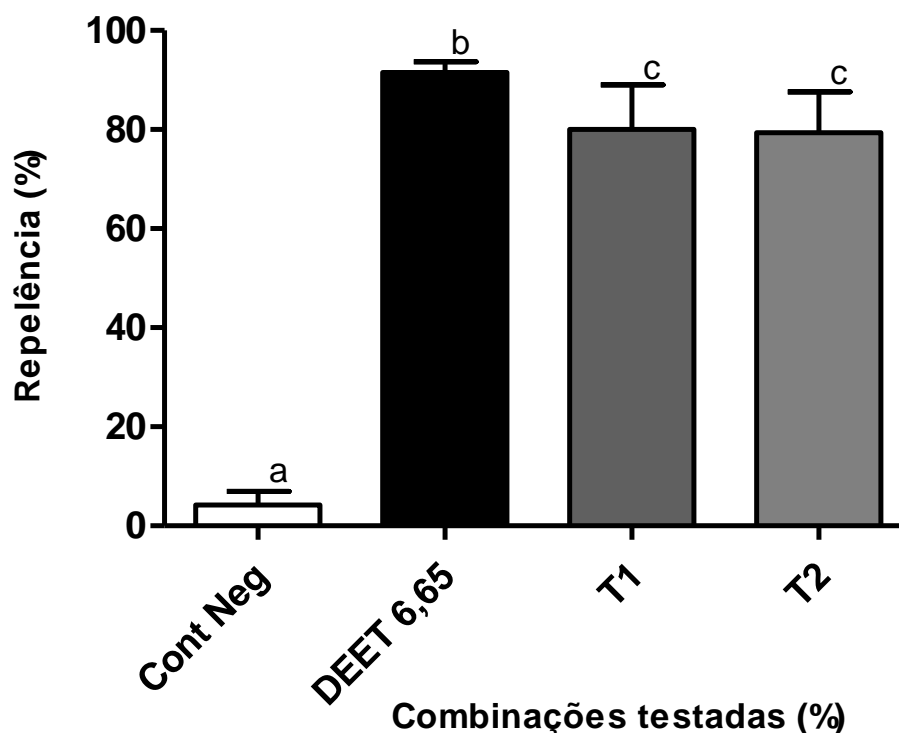
repelência semelhante ao controle positivo DEET, quando observamos a hora de maior eficácia de repelência, ou seja, hora 2, sendo T1 90,7%, T2 89,5% e o DEET 92,0%.

**Figura 11:** Efeito repelente das formulações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. T1- alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 - alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%.



Para identificar qual das combinações obteve melhor efeito repelente, foi calculada a média geral entre os tempos, ou seja, a média de 10 minutos a 5 horas (Figura 12). Os resultados entre as combinações T1 e T2 foram muito parecidos, sendo 80 e 79,4%, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os efeitos repelentes médios de T1 e T2 ( $p > 0,05$ ), porém ambos tiveram repelências significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que o controle positivo.

**Figura 12:** Atividade repelente média das combinações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em papel filtro impregnado contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 5 horas. T1: alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%; T2: alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%; Cont Neg: controle negativo, etanol 70%; DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



#### 6.4. Efeito sinérgico e seleção das melhores formulações para o teste de ponta de dedo e teste de imersão de larvas

A maior parte das formulações com combinações de plantas apresentaram efeito repelente superior às formulações com plantas individuais, indicando sinergismo. As exceções foram a combinação de E+H e T1 que foram inferiores e semelhantes ao óleo essencial de eucalipto isoladamente, respectivamente, e a combinação de A+H que foi semelhante à hortelã 12,5% isoladamente (Tabela 1).

**Tabela 1:** Comparações entre as soluções contendo plantas individualmente e as combinações binárias e múltiplas, utilizando a fórmula de sinergismo de Marking; Dawson (1975).

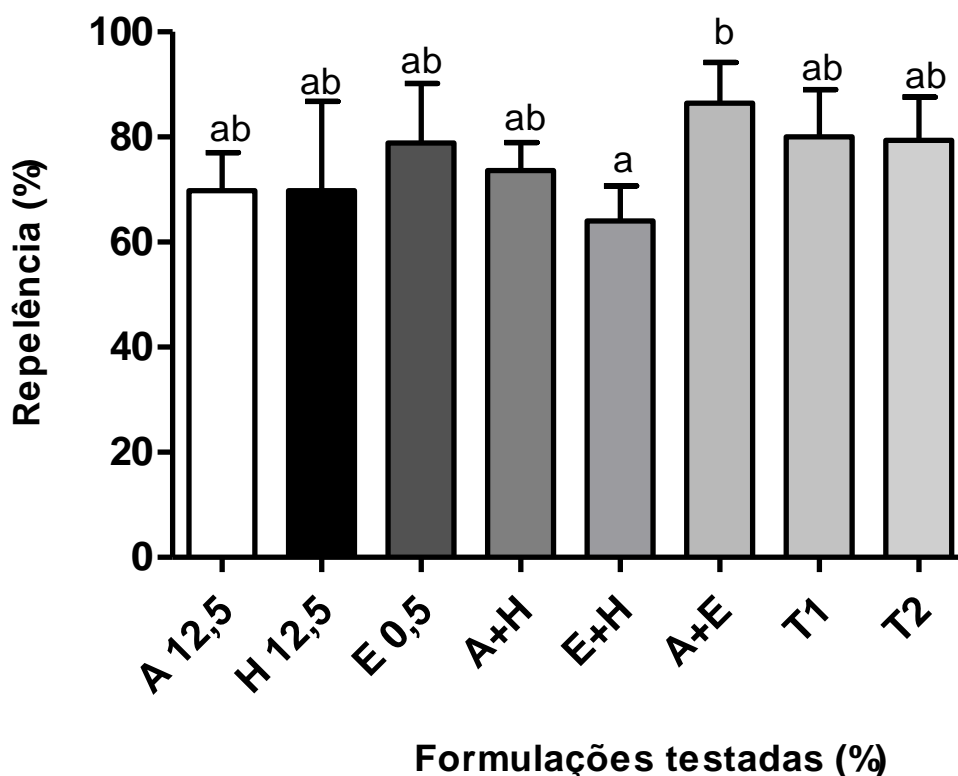
Plantas/misturas	A+H	A+E	E+H	T1	T2*
A 12,5%	1,1	1,3	-	1,1	1,1
E 0,5%	-	1,1	0,8	1,0	1,1
H 12,5%	1,0	-	1,1	1,1	1,1

\* Em T2, a comparação foi feita com a formulação contendo 25% das infusões de Alecrim-do-campo e Hostelã, e 0,25% do óleo essencial de eucalipto. Interpretação: >1: sinergismo; <1: antagonismo; =1: semelhante.

Para a seleção das melhores formulações a serem usadas nos ensaios subsequentes (escalada em ponta de dedo e efeito acaricida), foram usados os valores médios das repelências ao longo do período avaliado de cada formulação. A figura 13 mostra todos

os dados com maior repelência das formulações com os compostos isolados e todas as combinações. Foi observado que as formulações com os maiores efeitos repelentes foram aquelas contendo apenas eucalipto a 0,5%, a mistura de alecrim-do-campo e eucalipto 12,5:12,5%, e as duas misturas contendo as três plantas (T1 e T2). Entretanto, apesar dos maiores valores médios de repelência, nota-se que há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre os grupos alecrim-do-campo+ eucalipto e eucalipto+hortelã (Figura 13). Assim, as formulações de alecrim-do-campo 12,5%+ eucalipto 12,5%, e alecrim-do-campo 12,5% + hortelã 12,5% + eucalipto 0,5% e alecrim-do-campo 25% + hortelã 25% + eucalipto 0,25% foram selecionadas para os ensaios subsequentes.

**Figura 13:** Atividade repelente média de todas as melhores soluções contra ninfas de *Amblyomma sculptum* no ensaio de escalada em papel filtro impregnado. A- alecrim-do-campo 12,5%, H- hortelã 12,5%, E- eucalipto 0,5%, T1 alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5% e T2 alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, A+H- alecrim-do-campo e hortelã, E+H- eucalipto e hortelã, A+E- alecrim-do-campo e eucalipto. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

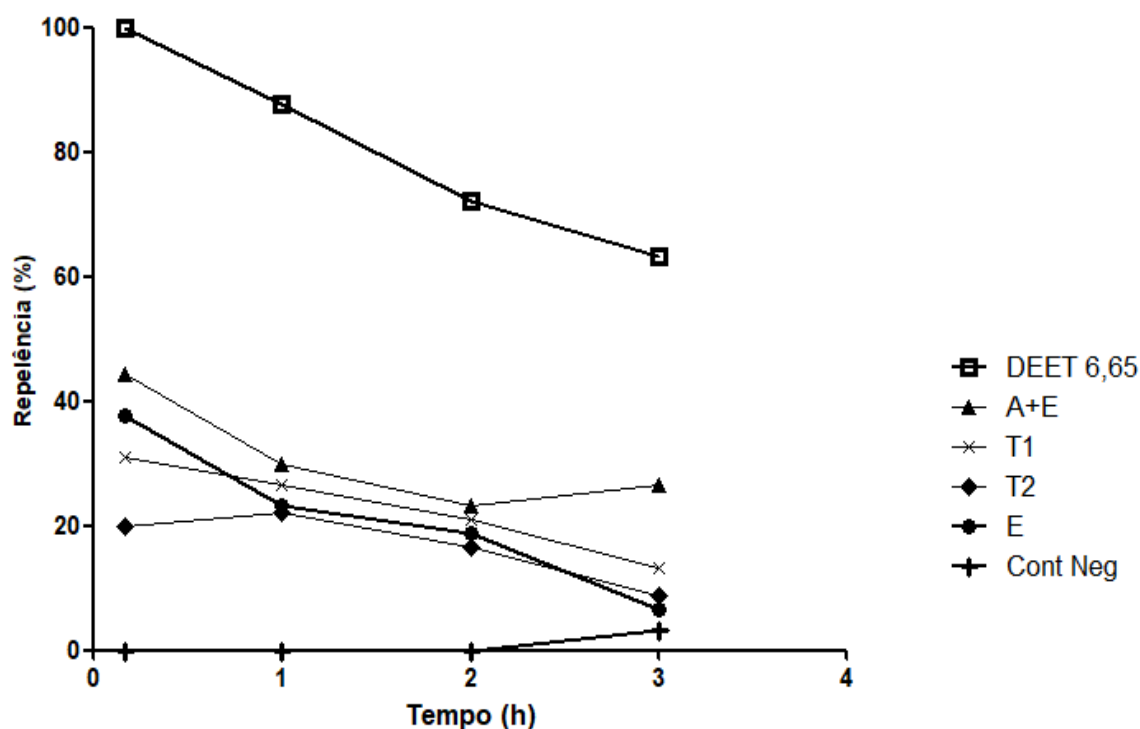


### 6.5. Teste de escalada em ponta de dedo

Para o teste de escalada em ponta de dedo, foram utilizadas as formulações selecionadas nos testes de escalada em papel de filtro. Os ensaios mostraram variações

percentuais entre as concentrações testadas ao longo do teste (10 min a 3 horas) (Figura 14). Todas as formulações apresentaram um perfil relativamente semelhante, iniciando aos 10 minutos com uma repelência entre 20% a 44,4%, decaindo ao longo do ensaio. Entretanto, todas as formulações tiveram repelência abaixo de 50% em todos os tempos testados. Dessa forma, os ensaios foram interrompidos antes do término, uma vez que o protocolo estabelecido previa a interrupção quando a repelência se mantivesse inferior a 50% na hora 3.

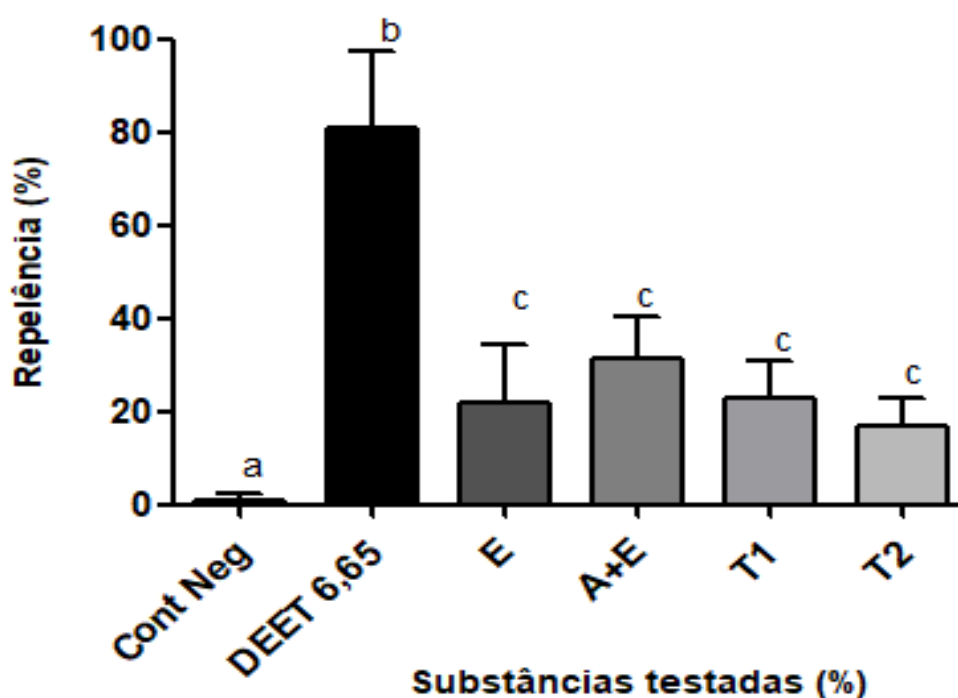
**Figura 14:** Efeito repelente das formulações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) contra ninfas de *Amblyomma sculptum* no ensaio de escalada em ponta de dedo durante o período de 10 minutos a 5 horas. A + E - alecrim-do-campo 12,5% e hortelã 12,5%, T1- alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 – alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, E - eucalipto a 0,5%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. O teste foi interrompido em caso de repelência inferior a 50% na hora 3.



Com a finalidade de melhor analisar os efeitos, foi calculado a média da repelência ao longo do tempo para todas as formulações e controles (Figura 15). A repelência das formulações não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre elas. As principais observações foram que o efeito repelente médio em pele humana foi consideravelmente inferior ao efeito em papel de filtro para todas as formulações (Figuras 13 e 15). Enquanto no papel de filtro as médias ao longo do tempo ficaram entre 78,9 e 86,4% (Figura 13), em pele humana os valores caíram para entre 16,9 e 31,1% (Figura 15). Além disso, apesar

de todas as formulações apresentarem repelência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o controle negativo, esta foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao controle positivo (Figura 15).

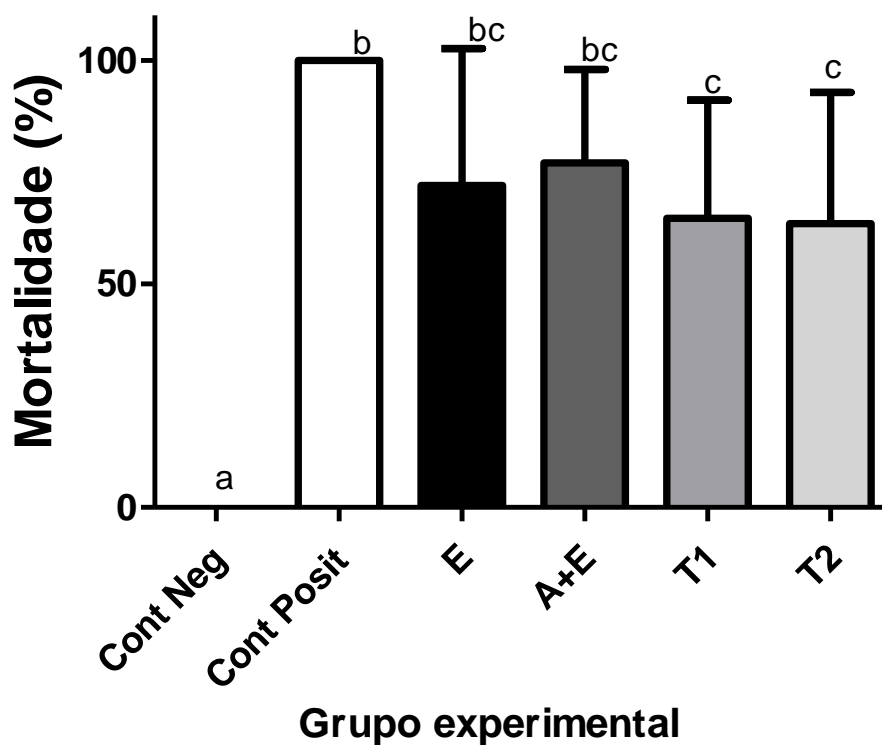
**Figura 15:** Atividade repelente média das combinações contendo alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no ensaio de escalada em ponta de dedo contra ninfas de *Amblyomma sculptum* durante o período de 10 minutos a 3 horas. A + E - alecrim-do-campo 12,5% e hortelã 12,5%, T1 - alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 - alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, E - eucalipto a 0,5%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, DEET 6,65 - DEET 6,65 - controle positivo, Off® Spray Longa Duração, S C Johnson, contendo DEET a 6,65%. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



### 6.6. Teste de imersão de larvas

Para avaliar o possível efeito acaricida das formulações, foi utilizado o teste de imersão de larvas. Observa-se que todas as formulações induziram mortalidade de larvas de *A. sculptum* significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) ao controle negativo. O controle positivo utilizado foi a cipermetrina 0,030 mg/mL que obteve 100% de mortalidade assim como o esperado, tanto a combinação de alecrim e eucalipto e eucalipto 0,5% foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo. O efeito acaricida variou de 63,5 a 77%, mas foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) entre todas as formulações testadas (Figura 16).

**Figura 16:** Mortalidade de larvas de *Amblyomma sculptum* após tratamento com diferentes formulações à base de alecrim-do-campo (*Braccharis dracunculifolia*), hortelã (*Mentha spicata*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) contra larvas de *Amblyomma sculptum* no teste de imersão de larvas. A + E - alecrim-do-campo 12,5% e hortelã 12,5%, T1- alecrim-do-campo 12,5%, hortelã 12,5% e eucalipto 0,5%, T2 – alecrim-do-campo 25%, hortelã 25% e eucalipto 0,25%, E - eucalipto a 0,5%. Cont Neg - controle negativo, etanol 70%, Cont Posit – controle positivo, cipermetrina 0,030 mg/mL. Análise estatística - ANOVA / Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



## 7. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram observados efeitos repelente e acaricida das infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo e hortelã e do óleo essencial de eucalipto, e suas associações, em larvas e ninfas não alimentadas de *A. sculptum*. Nos ensaios de repelência no teste de escalada em papel filtro, as infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo e de hortelã apresentaram média de repelência superior a 60% e atingindo mais de 80% de repelência em alguns períodos do ensaio. Contudo, as médias de repelência não diferiram estatisticamente entre as concentrações testadas. Já o óleo essencial de eucalipto equiparou-se ao DEET na maior concentração testada. Sinergismo foi observado em associações binárias ou múltiplas, com destaque para a combinação alecrim-do-campo 12,5% + eucalipto 0,5%. Porém, houve diferença da repelência obtida no teste de escalada em papel filtro e no teste da ponta do dedo. Nos ensaios de mortalidade, as quatro substâncias testadas apresentaram resultados semelhantes.

O perfil de repelência apresentado pelas infusões hidroalcoólicas testadas isoladamente e em diferentes concentrações durante o tempo avaliado foi relativamente semelhante. De forma geral, as formulações apresentaram maior efeito de repelência nos primeiros tempos testados e uma redução gradual a partir da segunda ou terceira hora do ensaio. Este perfil pode variar de acordo com a planta usada. Soares et al. (2010), que avaliou o efeito repelente de compostos de plantas como *Cymbopogon nardus*, *Mentha pulegium*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ageratum conyzoides* em ninfas de *A. cajennense* (devido a região geográfica do estudo, pode ser considerado *A. sculptum*) foi observado um perfil com efeitos repelentes iniciais baixos com um aumento gradativo ao longo do tempo. Porém, no trabalho de Pickett et al. (2023), em um ensaio semelhante ao de papel filtro impregnado, foi utilizado óleo essencial de *Achillea millefolium* em ninfas de *Ixodes scapularis* e o perfil de repelência já foi semelhante ao deste estudo, já que inicialmente apresentou um aumento e ao longo do ensaio a repelência decaiu independente da dose. Chagas et al. (2012) observaram esse perfil de variância entre plantas (as mesmas não foram citadas, somente através de códigos) em seu trabalho, já que algumas plantas apresentaram um aumento na repelência durante o ensaio e outras apresentaram uma queda na repelência de larvas de *R. microplus*. Uma hipótese para explicar a queda de repelência ao longo do ensaio é a evaporação dos compostos da infusão, fazendo com que a repelência seja maior no início e, ao longo do tempo, devido a evaporação, a eficácia vá caindo. De acordo com Adamo et al. (2022) e Wong et al. (2021) a ação do óleo essencial

causa uma redução da sua atividade residual devido à alta volatilidade dos compostos presentes nos óleos, ou seja, da mesma forma que ocorre com a infusão.

Algo que chamou atenção foi que não houve diferença estatística entre as concentrações testadas (100, 50, 25 e 12,5%) das infusões hidroalcoólicas enquanto, para o óleo essencial de eucalipto, foi observado o contrário, isto é, a concentração mais alta apresentou os melhores resultados. A queda de efeito observada para o óleo essencial à medida que ele foi sendo diluído é esperada, pois concentrações menores tem menores quantidades dos compostos repelentes. Entretanto, não foi possível identificar o motivo das diferentes concentrações das infusões terem o mesmo efeito. Uma explicação seria que até mesmo as concentrações mais diluídas teriam a quantidade de compostos que induzem a repelência máxima. Provavelmente, redução no efeito repelente poderia ter sido observado se fossem testadas concentrações mais diluídas para as infusões.

Outra observação interessante foi que, de forma geral, as formulações contendo óleo essencial puro ou em combinações foram as que apresentaram os maiores efeitos repelentes, se equivalendo ao DEET em alguns tempos nos testes de escalada em papel de filtro. Os óleos essenciais são produtos aromáticos obtidos por diferentes vegetais, e são compostos de substâncias voláteis lipofílicas e líquidas. São compostos complexos de misturas que podem conter de 2 a 60 compostos em concentrações diferentes e geralmente são esses compostos principais que determinam as propriedades biológicas dos óleos (BAKKALI et al., 2008). Já a infusão é o processo utilizado pela extração de compostos químicos através da imersão da planta em um solvente, e o líquido resultante dessa imersão é a infusão (CELOTTO et al., 2003). Diante disso, uma possível explicação pela melhor performance do óleo essencial em comparação a infusão hidroalcoólica seria que o óleo é mais concentrado e apresenta maior quantidade de compostos que possam atuar como repelentes. Forline et al. (1992) sugerem que a purificação dos ingredientes ativos dos extratos brutos é necessário para torná-los mais ativos.

A infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo apresentou repelência de 60-69% nas quatro concentrações testadas, sendo semelhantes entre si. Na literatura não há trabalhos que demonstrem a ação repelente da infusão hidroalcoólica de alecrim-do-campo em carrapatos. Porém, Rodrigues et al. (2019) realizaram um estudo da ação repelente do óleo essencial de alecrim-do-campo em *Sitophilus zeamais*, que são insetos pragas de grão de milho, e observaram através do teste de arena que, nas concentrações de 168,7 uL/mL e 311,9 uL/mL, o óleo apresentou ação repelente (VEDOVATTO et al.,

2015), ou seja, o alecrim-do-campo possui ação repelente que também possui efeito em outros artrópodes além dos carrapatos.

Na infusão hidroalcoólica de hortelã, a média de repelência também não diferiu entre as concentrações testadas, porém todas apresentaram repelência acima de 60%. Dentre os trabalhos que avaliaram a repelência da hortelã contra artrópodes, apenas um trabalho avaliou a ação em carrapatos. El-Seedi et al. (2012) demonstraram através de ensaios em laboratório utilizando um teste de escalada em tecido que o óleo essencial de hortelã se mostrou repelente contra ninfas de carrapatos da espécie *Ixodes ricinus*, e que na concentração de 15 ug/cm<sup>2</sup> apresentou uma repelência de 59,4%. Em conjunto, os dados do presente trabalho e do trabalho mencionado acima comprovam a ação repelente da hortelã e demonstram seu efeito em diferentes espécies de carrapatos.

O óleo essencial de eucalipto apresentou o melhor resultado de repelência na concentração de 0,5% com média acima de 78%, equiparando ao DEET. Os compostos majoritários deste óleo são 1,8-cineol, e o limoneno, compostos estes presentes em outros óleos essenciais como de *Eugenia pyriformis*, *Hyptis martiusii*, *Lippia alba*, entre outras plantas (BARROS et al., 2009; CALDAS et al., 2020; STEFANELLO et al., 2009). Em um ensaio similar ao que foi utilizado no presente trabalho, Arafa et al. (2020) demonstrou a ação do óleo de eucalipto com efeitos repelentes em larvas da espécie *Rhiphicephalus annulatus*, em que a concentração de 10% apresentou 62,5% de repelência. Em comparação com o presente estudo pode-se observar que uma menor concentração (0,5%) obteve uma média de repelência superior à concentração maior (10%). Uma possível explicação seria que, para um bioativo funcionar e ser absorvido pelos artrópodes, ele precisa ser hidrofílico e lipofílico (ODHIAMBO, 1982). Quando um óleo essencial está muito concentrado ocorre uma apassivação, ou seja, quando ele é absorvido a penetração é mais lenta, então concentrações menores e mais diluídas agem de forma mais efetiva (CHAGAS et al., 2002).

Quando as soluções foram testadas em associações binárias e múltiplas observou-se um sinergismo para a maior parte delas. Entretanto, os valores de sinergismo foram relativamente baixos e foram, para a maioria das combinações, de 1,1 de acordo com a equação de Marking e Dawson (1975). A solução que apresentou o maior efeito sinérgico foi a de A+E cujo resultado foi de 1,3. Marking e Dawson (1975) consideram que valores inferiores a 1,0 indicam efeito supressor, e que maiores que 1,0 indicam efeito aditivo. Bakkali et al. (2008) demonstraram que os óleos essenciais por serem uma mistura complexa apresentam sinergismo entre todas as moléculas ou entre as que apresentam

maiores níveis, o que poderia explicar por que no presente estudo as formulações que continham óleo essencial apresentaram maior sinergismo que as que só possuíram infusões, pois essas combinações potencializavam os efeitos repelentes e acaricidas. Entretanto, é importante mencionar que uma única combinação, aquela contendo eucalipto e hortelã, apresentou efeitos supressores, sendo a repelência da associação inferior à repelência o eucalipto isoladamente.

As formulações que obtiveram as maiores atividades de repelência também foram avaliadas no teste de escalada de ponta de dedo. Entretanto, foi observado diferenças consideráveis nos resultados de repelência entre os testes pois, enquanto o primeiro obteve efeitos médios superiores a 75% para as quatro formulações testadas, no teste de ponta de dedo as repelências foram inferiores a 35%. Alguns trabalhos da literatura encontraram resultados semelhantes e apresentaram algumas justificativas. Soares et al. (2010) em um estudo da ação do DEET em ninfas de *A. cajennense* explicaram que os resultados entre os ensaios de papel filtro impregnado e o da ponta do dedo foram divergentes devido a ação atraente da pele humana, e que neste ensaio existem características que interferem na duração e atividade do repelente, como transpiração, temperatura, substâncias que pode não combinar com as moléculas do produto, e já no teste em papel filtro não há essa atração da pele humana. Assim como citado por Dautel (2004), no teste da ponta do dedo, além de um estímulo repelente, tem-se também um estímulo de atração, que é a presença do hospedeiro. Ou seja, devido aos carrapatos já estarem na pele não tratada (falange distal) o incentivo para que eles subissem para a área tratada (falange proximal) poderia não acontecer, diferentemente do teste em papel filtro impregnado, que por não haver uma atração, devido ao geotropismo negativo eles iriam escalar e ir de encontro com a área tratada, e assim entrar em contato com o produto. Em estudo de Jensenius et al. (2005) foi necessária a utilização de concentrações 10 vezes superiores às testadas contra *A. sculptum* para alcançar uma taxa de repelência satisfatória em *Amblyomma hebraeum*.

As quatro formulações com os maiores efeitos repelentes também foram avaliadas quanto ao efeito acaricida pelo teste de imersão de larvas. Foi observado que a mortalidade de larvas de *A. sculptum* induzida pelas formulações variou de 63,5 a 77%, constatando que essas plantas também possuem compostos acaricidas. Alguns trabalhos anteriores da literatura haviam demonstrado tais efeitos em carrapatos usando outras formulações produzidas a partir das plantas testadas. Trabalhos como o de De Assis Lage et al. (2015) demonstraram que o óleo essencial de alecrim-do-campo e o nerolidol, seu

constituente majoritário, apresentaram eficácia acaricida de 90% em larvas não alimentadas de *R. microplus* em concentrações de 15,0 e 10,0 mg/mL. Em outro estudo, Cazella (2020) utilizou o óleo essencial de alecrim-do-campo também para avaliar a mortalidade de larvas de *R. microplus* e constatou que a concentração de 500 mg/mL foi eficaz no controle de eclodibilidade de ovos e redução da capacidade de postura de ovos e na sua mortalidade, com 95% de eficácia no tratamento *ex situ*. Em outro trabalho, o óleo de alecrim-do-campo na concentração de 10% também apresentou efeito acaricida de 100% em larvas de *R. annulatus* (ADENUBI et al., 2021). Uma possível explicação para esse efeito acaricida é a presença dos sesquiterpenos nerolidol e espatulenol em alecrim-do-campo (KENNEDY; SCHMIDT, 2016). O nerolidol, além de ter atividade acaricida, também atua em insetos e protozoários devido à inibição de enzima acetilcolinesterase que é um dos mecanismos envolvidos na atividade inseticida (ABOULAILA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012; DI CAMPLI et al., 2012; KANG et al., 2013). De Assis Lage et al. (2015) observaram que o óleo essencial de alecrim-do-campo apresenta atividade em diversas fases de desenvolvimento de *R. microplus*, e que a taxa de mortalidade só depende da dosagem utilizada, obtendo 7,8% de atividade acaricida de eclodibilidade e redução da quantidade de ovos produzidos. O trabalho de Castro et al. (2018) demonstrou que o 1,8-cineol, presente no óleo essencial de eucalipto, apresentou efeito máximo (100%) de mortalidade em larvas de *R. microplus*, reforçando que há um efeito acaricida dentre as plantas deste estudo.

Um dado que chamou a atenção foi o efeito repelente observado entre os dois produtos usados como controle positivo. No ensaio inicial, foi utilizado o DEET 8,5% da marca Tchou Mosquito® e o efeito repelente médio foi de 60%. Frente a esses resultados, optou-se por substituir este controle positivo pelo DEET 6,65% da marca Off® Spray Longa Duração (S C Johnson) que apresentou efeito repelente superior, sendo sempre acima de 90%, mesmo no tempo de 5 horas. Este último produto foi usado ao longo dos experimentos restantes. Foi curioso essa observação, uma vez que o primeiro tinha maior concentração de DEET que o segundo. Esse efeito pode ser explicado por diferenças na formulação entre as duas marcas que possuem, segundo informações do rótulo, outros componentes além do DEET, como glicerina, nonoxynol-9, rietanolamina, triglicerídeo cáprico, ciclopentasiloxano, álcool cetosteárilico, cetareth-20, BHT, extrato de folha de aloe barbadensis, dietiltoluamida, metilparabeno, fenoxietanol, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isobutylparabeno e limoneno na marca Tchou Mosquito. Já no Off spray, os compostos são: extrato da folha de aloe barbadensis, álcool, salicilato

de benzila, cumarina, hidroxicitronelal, limoneno, linalol, butilfenil metilpropional, e diethyl toluamide 6,65%. Uma possível explicação para a divergência de resultados pode ser devido a presença de outros compostos com ação repelente. Observa-se que os dois produtos possuem limoneno (não especificado a concentração) em sua composição, e que trabalhos como o de Ferreira (2020) demonstram que esse composto tem ação repelente em carrapatos da espécie *A. sculptum*, sendo assim a associação dos compostos pode ter gerado um efeito sinérgico melhor que o outro.

As plantas emanam voláteis que podem causar comportamentos distintos em diferentes espécies de artrópodes. O salicilato de metila, por exemplo, é um volátil emitido por flores e plantas sob estresse e que parece influenciar na fixação de carrapatos *Amblyomma* (NORVAL et al., 1992). Então, possivelmente, a concentração em que uma substância é usada pode ser responsável pelas mudanças de comportamento de artrópodes. Esses voláteis em algumas ocasiões podem atuar inibindo a atração do hospedeiro não repelindo os artrópodes (JAENSON; PÅLSSON; BORG-KARLSON, 2006). Ferreira et al. (2020) verificaram que ninfas de *A. sculptum* foram atraídas, em ensaio de olfatometria, por salicilato de metila.

Para a conclusão do presente trabalho, ainda serão avaliados os compostos majoritários das soluções de cada planta através de cromatografia líquida e gasosa. Uma parceria com o Prof Fernão Braga (Escola de Farmácia - UFMG) já foi estabelecida e estas avaliações serão realizadas em breve. Após a identificação dos compostos majoritários, estudaremos a possibilidade de produzir formulações com estes e também avaliar seu efeito repelente em ninfas e em outros estágios.

Na tentativa de melhorar os resultados de repelência em ponta de dedo, novos testes serão realizados avaliando se formulações com maiores concentrações podem elevar o efeito repelente das infusões e do óleo. Espera-se que maiores concentrações tenham maiores quantidades dos compostos ativos e venham a coibir os efeitos atrativos proporcionados pela pele humana. Outra possibilidade seria tentar produzir uma formulação que tenha efeito em tecidos, assim a indicação seria de uso em tecidos em vez de pele diretamente. Assim poderiam ser avaliados os efeitos em tecidos comuns como jeans, brim, algodão etc.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho demonstram que todas as três plantas possuem efeito repelente e acaricida. Como informado acima, todos os próximos esforços serão concentrados na tentativa de produzir formulações como melhores efeitos, sejam para serem usadas em pele ou em vestimentas. Uma vez que as melhores

formulações forem identificadas, também serão feitos testes a campo na tentativa de obter um produto que possa constituir uma nova ferramenta para prevenir picadas pelo carrapato-estrela e, possivelmente, outras espécies de carrapatos de importância veterinária.

## 8. CONCLUSÃO

- Todas as três plantas, *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), *Mentha spicata* (hortelã) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto), apresentam atividade repelente e acaricida contra *A. sculptum*.
- As infusões hidroalcoólicas de alecrim-do-campo e hortelã apresentam atividade repelente média acima de 60% nas concentrações de 12,5 a 100% no teste de escalada em papel filtro.
- O óleo essencial de eucalipto apresentou atividade repelente acima de 45% nas concentrações de 0,0625 a 0,125% no teste de escalada em papel filtro, e seu melhor resultado foi na concentração de 0,5% que ficou acima de 78% de repelência.
- A combinação binária com maior efeito repelente médio foi a contendo alecrim-do-campo e eucalipto que apresentou efeitos acima de 85%.
- As duas combinações múltiplas testadas apresentaram repelência acima de 79% no teste de escalada em papel filtro impregnado.
- Todas as formulações testadas no ensaio de escalada em ponta de dedo apresentaram repelência média inferior a 25%, com exceção da combinação binárias de alecrim-do-campo e eucalipto que repeliu 31,1% das ninfas.
- O composto individual de eucalipto 0,5% e as combinações binárias e múltiplas apresentam efeito acaricida e, no teste de pacote de larvas, induziram mortalidade acima de 60%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOULAILA, M. et al. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 278–282, 1 jun. 2010.
- ADENUBI, O. T. et al. In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 160–171, 30 abr. 2018.
- ARAFÁ, W. M. et al. Toxicity, repellency and anti-cholinesterase activities of thymol-eucalyptus combinations against phenotypically resistant *Rhipicephalus annulatus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, n. 2, p. 265–277, 1 jun. 2020.
- ARAGÃO, H. DE B. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759–843, 1936.
- ARAÚJO, M. J. C. et al. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 2, p. 139–155, 1 jun. 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils--a review. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev. 2008.
- BARROS, F. M. C. DE et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 861–867, 2009.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Em: **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. [s.l.: s.n.].
- BARROZO, M. M. et al. Repellent and acaricidal activity of coconut oil fatty acids and their derivative compounds and catnip oil against *Amblyomma sculptum*. **Veterinary Parasitology**, v. 300, p. 109591, dez. 2021.
- BEATI, L. et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 9 dez. 2013.
- BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks-A systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47–54, mar. 2018.
- BISSINGER, B. W.; ROE, R. M. Tick repellents: Past, present, and future. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 2, p. 63–79, 1 fev. 2010.
- BOLAND, D. J. et al. **Forest Trees of Australia**. [s.l.] Csiro Publishing, 2006.
- BORGES, L. M. F. et al. Identification of non-host semiochemicals for the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae), from tick-resistant beagles,

*Canis lupus familiaris*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 5, p. 676–682, 1 jul. 2015.

CALDAS, G. F. R. et al. Propriedades farmacológicas e toxicologia do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth.(cidreira-brava) e de seu composto majoritário 1, 8-cineol: uma revisão. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 461–471, 2020.

CANÇADO, P. H. D. et al. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO<sub>2</sub> tick trap. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 371–377, 1 jul. 2008.

CDC. **Insect Repellent Use and Safety**. , 2021.

CELOTTO, C. A. et al. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. XVIII. Ação da infusão de *Morus nigra* L. no rato. **Anais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, v. 5, p. 53 res. PAT.06, 2003.

CHAGAS, A. C. DE S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp* em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 247–253, 2002.

CUNHA, A. P. D. CONTROLE ESTRATÉGICO DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) EM EQUÍNOS, MINAS GERAIS, BRASIL - PARTE I. 2007.

DAUTEL, H. Test systems for tick repellents. **International Journal of Medical Microbiology Supplements**, v. 293, p. 182–188, 1 abr. 2004.

DE ASSIS LAGE, T. C. et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 24–29, 1 jan. 2015.

DI CAMPLI, E. et al. Activity of tea tree oil and nerolidol alone or in combination against *Pediculus capitis* (head lice) and its eggs. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1985–1992, 1 nov. 2012.

EL-SEEDI, H. R. et al. Chemical Composition and Repellency of Essential Oils From Four Medicinal Plants Against *Ixodes ricinus* Nymphs (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 5, p. 1067–1075, 1 set. 2012.

FERREIRA, L. L. et al. In vitro repellency of DEET and  $\beta$ -citronellol against the ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and *Amblyomma sculptum*. **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 42–45, 30 maio 2017a.

FERREIRA, L. L. et al. In vitro repellency of DEET and  $\beta$ -citronellol against the ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and *Amblyomma sculptum*. **Veterinary Parasitology**, v. 239, p. 42–45, 30 maio 2017b.

FERREIRA, L. L. et al. Identification of a non-host semiochemical from tick-resistant donkeys (*Equus asinus*) against *Amblyomma sculptum* ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 3, p. 621–627, 1 abr. 2019.

- FERREIRA, L. L. et al. Attract or repel *Amblyomma sculptum* ticks: Screening of semiochemicals. **Veterinary Parasitology**, v. 278, p. 109036, 1 fev. 2020.
- FIOL, F. D. S. D. et al. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 461–466, jun. 2010.
- FRADIN, M. S. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, n. 11, p. 931–940, 1 jun. 1998.
- FRADIN, M. S. Protection from blood-feeding arthropods. **Wilderness medicine**, n. Ed.4, p. 754–768, 2001.
- FURLONG, J.; PRATA, M. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**, v. 1, n. 1, p. 1 p., 2000.
- GARCIA, M. V. et al. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 405–411, dez. 2012.
- GERARDI, M. et al. Comparative Susceptibility of Different Populations of *Amblyomma sculptum* to *Rickettsia rickettsii*. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 2019.
- 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, p. 41–45, 1 fev. 2014.
- GUEDES, E. et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841–845, dez. 2005.
- HALOS, L. et al. Defining the concept of 'tick repellency' in veterinary medicine. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 419–423, abr. 2012.
- HEIDEN, G., SCHNEIDER, A. , 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB126179>>
- HORTA, M. C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93–97, jul. 2004.
- JAENSON, T. G. T.; PÅLSSON, K.; BORG-KARLSON, A.-K. Evaluation of Extracts and Oils of Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellent Plants from Sweden and Guinea-Bissau. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 1, p. 113–119, 1 jan. 2006.
- KANG, J. S. et al. Inhibition of acetylcholinesterases of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, by phytochemicals from plant essential oils. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 1, p. 50–56, 1 jan. 2013.

KAUFMAN. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, v. 5, n. 2, p. 47–56, 1 fev. 1989.

KEIRANS, J. E.; DURDEN, L. A. Tick Systematics and Identification. Em: **Tick-Borne Diseases of Humans**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p. 123–140.

KENNEDY, K.; SCHMIDT, J. **Lice control composition and method**. Google Patents, , 4 fev. 2016.

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, p. 386–390, 20 dez. 2006.

LABRUNA, M. B. et al. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1–14, 9 maio 2001.

LABRUNA, M. B. et al. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, v. 34, p. 195–200, fev. 2004.

LAWRENCE, B. M. **Mint: The Genus Mentha**. [s.l.] CRC Press, 2006.

LEITE, R. C. et al. Alguns aspectos epidemiológicos das infestações por *Amblyomma cajennense*: uma proposta de controle estratégico. **SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE DE PARASITOS**, v. 2, p. 9–14, 1997.

MARTINS, P. M. et al. influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. **Acta Horticulturae**, n. 569, p. 155–160, fev. 2002.

MARTINS, T. F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 186, 31 mar. 2016.

MENDES, A. DA S. et al. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1–2, p. 136–139, 29 dez. 2011.

MKOLO et al. Repellency and toxicity of essential oils of *Mentha piperita* and *Mentha spicata* on larvae and adult of *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). 10 set. 2023.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 1 abr. 2014.

NORVAL, R. A. et al. Responses of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* to known or potential components of the aggregation-attachment pheromone. III. Aggregation. **Experimental & Applied Acarology**, v. 16, n. 3, p. 237–245, 1 dez. 1992.

- NOVATO, T. P. L. et al. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3–4, p. 331–335, 15 set. 2015.
- NWANADE, C. F. et al. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental & Applied Acarology**, v. 81, n. 1, p. 1–35, maio 2020.
- ODHIAMBO, T. R. Current themes in tropical science: physiology of ticks. **Oxford: Pergamon**, v. 1, p. 508, 1982.
- PARK, Y. K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100–1103, 10 mar. 2004.
- PICKETT, L. J. et al. Common yarrow (*Achillea millefolium*) essential oil and main components as potential repellents and acaricides against *Ixodes scapularis* and *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 89, n. 2, p. 287–303, 1 fev. 2023.
- 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. 490, 1 ago. 2020.
- RAY, J.; GOYAL, P.; AGGARWAL, B. K. Approach of *Eucalyptus globulus* plant parts for Human Health Safety and Toxicological Aspects. **Open Access**, v. 1, n. 1, 2015.
- RODRIGUES ET AL. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância. **Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância.**, (Ambrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 132). n. 2015, p. 10 p., 2015.
- SCHAEFER, C.; PETERS, P. W. J. Intrauterine diethyltoluamide exposure and fetal outcome. **Reproductive Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 175–176, 1 jan. 1992.
- SENRA, T. O. S. et al. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 10, p. 3471–3476, out. 2013.
- SENZI, C. G. DE et al. Febre maculosa: Uma análise epidemiológica no Brasil. **Saúde Coletiva (Barueri)**, v. 12, n. 79, p. 11073–11084, 12 ago. 2022.
- SILVA, W. C. et al. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1–3, p. 189–194, 30 jun. 2011.
- SOARES, S. F. et al. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 67–73, 20 jan. 2010a.

SOARES, S. F. et al. Repellent activity of DEET against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs submitted to different laboratory bioassays. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 12–16, mar. 2010b.

SOARES, S. F. et al. Repellent activity of DEET against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs submitted to different laboratory bioassays. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 12–16, mar. 2010c.

SOUZA, S. S. A. L. D. et al. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887–891, jun. 2006.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Composição Química e Variação Sazonal dos Óleos Essenciais de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, 2009.

TERRA, ANDRÉIA LOUREIRO MUSSO. **Avaliação in vitro dos efeitos do agente etiológico *Nomuraea rileyi* no controle biológico do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***, 2008. Disponível em: <<https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/tede/769/1/2008%20-%20Andr%3%a9ia%20Loureiro%20Musso%20Terra.pdf>>

TRINDADE, J. P. P.; FACIONI, G.; BORBA, M. F. S. Espécies Vegetais de Ocorrência em Pastagens Naturais dos Assentamentos da Reforma Agrária na Região de Bagé, RS. 2007.

VALE, L. et al. Binary combinations of thymol, carvacrol and eugenol for *Amblyomma sculptum* control: Evaluation of in vitro synergism and effectiveness under semi-field conditions. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 12, n. 6, p. 101816, nov. 2021.

VEDOVATTO, F. et al. Essential oil of *Cinnamodendron dinisii* Schwanke for the control of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1055–1060, 2015.