



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU MESTRADO EM
BIOCIÊNCIA ANIMAL**

RODRIGO DA SILVA CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Laurus nobilis*, *Illicium verum* e *Origanum vulgare* SOBRE *Rhipicephalus microplus*

Cuiabá
2017

RODRIGO DA SILVA CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Laurus nobilis*, *Illicium verum* e *Origanum vulgare* SOBRE *Rhipicephalus microplus*

Dissertação apresentada à UNIC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréia Lima Tomé Melo

Co-Orientador: Prof. Dr. Wendell M. S. Perinotto

Cuiabá
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nº Cutter Sobrenome do autor, Nome do autor.

Título: Subtítulo (se houver) / Nome completo do autor. – Cidade,
ano de publicação.

85f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em
Bióciência Animal, Universidade de Cuiabá, ano de publicação.

“Orientador: Prof. Dr. Nome do Orientador.”

1. Assunto. 2. Assunto. 3. Assunto. I. Título.

CDD ou CDU

RODRIGO DA SILVA CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Laurus nobilis*, *Illicium verum* e *Origanum vulgare* SOBRE *Rhipicephalus microplus*

Dissertação apresentada à UNIC, no Mestrado em Biociência Animal, área e concentração em Saúde Animal como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Andréia Lima Tomé Melo
UNIC

Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto
UFRB

Prof. Dr. Dirceu Guilherme de Souza Ramos
UFG/UNIFIMES

Cuiabá, 12 de Abril de 2017.

Dedico este trabalho à minha Mãe Mara Sueli da Silva e à minha irmã Michelle Laura da Silva Corrêa por estarem sempre presente em minha vida me apoiando em todas minhas decisões e por fazerem parte de mais essa realização profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela grande oportunidade de cursar este mestrado e pelas tantas coisas boas que me concedeu. Ao prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto, pessoa de grande conhecimento e caráter inigualável: uma rara união de competência profissional, humildade e um coração de ouro, tudo numa única pessoa. À Prof^a. Dr^a. Andréia Lima Tomé Melo, obrigado de coração por toda a orientação e toda a ajuda que só uma verdadeira mestra e amiga poderia me fornecer! Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá meu muito obrigado pelos ensinamentos transmitidos; aos colegas de curso, todos, sem exceção: esquecer de algum deles seria uma enorme injustiça. Muitos me deram grande apoio e ajuda. E, claro, à minha mãe, a quem eu devo muito e nunca poderei pagar o amor infinito que me concede todos os dias.

Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.

Aldo Novak

RESUMO

Rhipicephalus microplus é comumente conhecido como carrapato dos bovinos, sendo um dos principais problemas sanitários na bovinocultura em países de clima tropical e subtropical. As infestações por este ectoparasito são controladas principalmente, através da utilização de acaricidas químicos. Todavia, o uso excessivo destes produtos predispõe a contaminação do meio ambiente, do homem e estimula a seleção de carrapatos resistentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade *in vitro* de diferentes concentrações de óleos essenciais da folha de *Laurus nobilis* (louro), da folha de *Origanum vulgare* L. (orégano) e do fruto de *Illicium verum* L. (anis estrelado) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os óleos foram extraídos por hidrodestilação e a caracterização química foi realizada através de espectrofotometria de massa. Para avaliar a ação acaricida dos óleos sobre *R. microplus* foram realizados o teste sobre larvas através da metodologia de pacote e as concentrações testadas foram: 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20% e para fêmeas foi realizado o teste de imersão nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 mg/mL de cada óleo. Na análise da composição química e identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais, *I. verum* apresentou 18 compostos químicos, sendo 1 composto majoritário: o Trans anetol (88,32%), no óleo de *O. vulgare* foram identificados 28 componentes químicos tendo como composto majoritário o 4 terpineol (24,92%) e no óleo de *L. nobilis* foram identificados 28 componentes químicos, cujo componente majoritário foi o 1,8 cineol (74,23%). Com relação aos testes nos carrapatos, tanto em larvas quanto em fêmeas adultas, somente o óleo essencial de *I. verum* apresentou atividade acaricida, ocasionando 99,8 % de mortalidade de larvas na concentração de 15 mg/mL e percentual de controle de 85,4 % sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, utilizando o óleo na concentração de 80 mg/mL.

Palavras-chave: Fitoterápicos. Biocarrapaticidas. Carrapatos.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is commonly known as bovine tick, being one of the main sanitary problems in bovine breeding in tropical and subtropical countries. Infestations by this ectoparasite are mainly controlled through the use of chemical acaricides. However, the excessive use of these products predisposes the contamination of the environment and man and stimulates the selection of resistant ticks. The objective of this study was to evaluate the in vitro pathogenicity of different concentrations of essential oils of *Laurus nobilis* (laurel) leaf, leaf of *Origanum vulgare* L. (oregano) and the fruit of *Illicium verum* L. (star anise) on engorged larvae and *R. microplus* females. The oils were extracted by hydrodistillation and the chemical characterization was performed by mass spectrometry. To evaluate the acaricidal action of the oils on *R. microplus*, the test on larvae was carried out using the package methodology and the concentrations tested were: 2.5%, 5%, 10%, 15% and 20% and for females the Immersion test at the concentrations of 10, 20, 40, 60 and 80 mg / mL of each oil. In the analysis of the chemical composition and identification of the chemical constituents of the essential oils, *I. verum* presented 18 chemical compounds, being 1 major compound: Trans anetol (88.32%), in *O. vulgare* oil were identified 28 chemical components having as (24.92%), and in *L. nobilis* oil, 28 chemical components were identified. The major component was 1.8 cineol (74.23%). With regard to tick tests, in both larvae and adult females, only *I. verum* essential oil showed acaricidal activity, causing 99.8% mortality of larvae at 15 mg / mL and control percentage of 85, 4% on engorged females of *R. microplus*, using the oil at the concentration of 80 mg / ml.

Key words: Herbal medicines. Biocarpathians. Ticks.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Índice de retenção, RI e área relativa do pico (%) de compostos do óleo essencial de <i>Illicium verum</i>	43
Tabela 2 –	Índice de retenção, RI e área relativa do pico (%) de compostos do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	44
Tabela 3 –	Índice de retenção, RI e área relativa do pico (%) de compostos do óleo essencial de <i>Laurus nobilis</i>	46
Tabela 4 –	Percentual de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Origanum vulgare</i> , e <i>Laurus nobilis</i> .	47
Tabela 5 –	Peso das fêmeas ingurgitadas antes da postura (mg), peso da massa de ovos (mg), índice de produção de ovos (IPO%) e percentual de eclosão de larvas (%) de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Illicium verum</i>	48

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 –	Planta <i>Origanum vulgare</i> Linnaeus	24
Figura 2 –	Planta <i>Laurus nobilis</i> L.	24
Figura 3 –	Planta <i>Illicium verum</i>	26

ARTIGO

Figura 1 –	Aparelho de Clevenger utilizado para obtenção de óleo essencial	38
Figura 2 –	Larvas de <i>R. microplus</i> colocadas entre papéis de filtro 6 x 6 cm, fechados com pregadores (<i>binder clips</i>) seguido do teste de imersão de fêmeas e oviposição	41
Figura 3 –	Cromatografia do óleo essencial de <i>Illicium verum</i>	42
Figura 4 –	Cromatografia do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	45
Figura 5 –	Cromatografia do óleo essencial de <i>Laurus nobilis</i>	46

GRÁFICO

Gráfico 1 - Porcentagens de controle obtidas com exposição ao óleo nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80mg/ml.

48

LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Cromatografia gasosa
Cm	Centímetro
EP	Eficácia do produto
EM	Espectrofotometria massa
g	Gramas
H	Hora
IPO	Índice de produção de ovos
IR	Índice de retenção
°C	Graus Celsius
Kg	Quilogramas
KI	Índice de Kovats
KM	Kilômetro
L	Litro
LRI	Índice de retenção linear
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Partes por milhão
PC	Percentual controle
%	Porcento
RE	Reprodução estimada

RI	Índice de retenção
SINDAN	Sindicato nacional da indústria de produtos para saúde animal
TR	Tempo de retenção
UR	Umidade Relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 BIOLOGIA DO CARRAPATO <i>Rhipicephalus microplus</i>	17
2.2 PREJUÍZOS ECONÔMICOS NA PECUÁRIA ASSOCIADOS AO CARRAPATO <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
2.3 CONTROLE DE <i>R. microplus</i> UTILIZANDO EXTRATOS DE ORIGEM VEGETAL.....	18
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS	22
2.5 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESPÉCIE <i>Origanum vulgare</i> L.(Orégano).....	23
2.6 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESPÉCIE <i>Laurus nobilis</i> L. (Folha de Louro)..	24
2.7 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESPÉCIE <i>Illicium verum</i> (Anis-estrelado).....	25
REFERÊNCIAS	27
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 ARTIGO	33
CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO <i>IN</i> VITRO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Laurus nobilis</i>, <i>Illicium verum</i> e <i>Origanum</i> <i>vulgare</i> SOBRE <i>RHIPICEPHALUS MICROPLUS</i>	
RESUMO	33
ABSTRACT	34
4.1 INTRODUÇÃO.....	35
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.4 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A infestação de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* é um dos principais entraves à pecuária no Brasil, onde as características climáticas favorecem o desenvolvimento desses parasitas na maioria dos meses do ano (EVANS, 1992). O carrapato *R. microplus* é hematófago e pode causar anemia, inocular toxinas nos hospedeiros, transmitir agentes infecciosos dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*, reduzir a qualidade do couro animal, além de comprometer o ganho de peso e a produção de leite (GOMES, 1998). Em bovinos leiteiros é comum observar o agravamento destes problemas, pois grande parte dos rebanhos possui animais com maior proporção genética de origem europeia, sendo estes mais sensíveis ao *R. microplus* (ROCHA, 2000).

O controle do carrapato dos bovinos é feito, basicamente, pela utilização de carrapaticidas, muitas vezes de forma indiscriminada, o que tem levado ao desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003). O uso destes produtos pode levar a intoxicações dos animais e ao impacto ambiental, pelo efeito residual deles na natureza (FURLONG, 1993).

Também há um risco vigente relacionado à presença de resíduos de carrapaticidas nos alimentos, visto que muitos produtores não respeitam os prazos de carência e a proibição da utilização de determinados produtos em animais lactantes (CHAGAS et al., 2002). Somado a isso, a pesquisa para produção de novas bases químicas demanda muito tempo e grandes investimentos (CHAGAS et al., 2002). Diante desse contexto, a utilização de fitoterápicos para o controle de parasitas é considerada uma importante alternativa, podendo reduzir os impactos econômicos e causar menos danos ao ecossistema, quando comparada ao uso de pesticidas sintéticos. Além disso, observa-se no Brasil e no mundo um aumento na produção de alimentos orgânicos, modelo este que não permite o uso de pesticidas (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Apesar de o Brasil ser considerado o país com o maior número de espécies vegetais no mundo, estudos sobre possíveis efeitos terapêuticos dessas plantas são limitados (DI STASI, 1996), principalmente no que diz respeito aos animais de produção. Por outro lado, observa-se em campo, em diversas regiões do país, a utilização de extratos vegetais produzidos de forma

empírica, para o tratamento de diversos males do homem e dos animais. Alguns estudos científicos revelam o efeito promissor de fitoterápicos no controle de *R. microplus* (COSTA et al., 2008; FARIAS et al., 2007).

O controle de carrapatos com fitoterápicos eficazes poderá trazer grandes vantagens para o produtor. Porém, se o óleo essencial utilizado não produzir efeito real, existe o risco de intensa infestação do rebanho, com consequências severas, como queda na produção, além de perda de animais. Nesse sentido, é evidente a necessidade de buscar alternativas viáveis e sustentáveis que possam de maneira eficaz, promover o controle de carrapatos, de modo a assegurar o bem-estar animal e garantir mínimos efeitos nocivos ao meio ambiente.

Estudos têm demonstrado que os óleos essenciais de *Illicium verum*, *Origanum vulgare* e *Laurus nobilis* contêm altas concentrações de trans-anetol (TUAN E ILANGANTILEKE 1997), Carvacrol (SOUZA 2006) e 1,8 Cineol (SILVEIRA 2012), respectivamente, o que dão a estes óleos potenciais antioxidantes, antifúngicos e antibacterianos.

Desse modo, a realização de pesquisas científicas que abordam sobre o controle de carrapatos a partir de fitoterápicos é de grande relevância para que se possam obter mais informações a respeito do tema. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade *in vitro* de diferentes concentrações de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis* L.), da folha do orégano (*Origanum vulgare* L.), e do fruto do anis estrelado (*Illicium verum* L.) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e determinar a constituição química dos óleos essenciais dessas plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia do Carrapato

O carrapato *R. microplus* pertence ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida Subclasse Acari, Ordem Parasitiformes, Subordem Metastigmata, Família Ixodidae (MONTEIRO, 2011). Após análises moleculares, houve uma reclassificação taxonômica, na qual com o mesmo foi inserido no gênero *Rhipicephalus* e subgênero *Boophilus*, de modo que passou a ser denominado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL; BARKER, 2003).

Pereira e Labruna (2008), baseando-se em descrições de chaves de identificação de alguns autores, estabeleceram as dimensões morfológicas de *R. microplus*. Os machos são pequenos de coloração castanho-amarelada até marrom-avermelhada e podem chegar a 2,5mm de comprimento e 1,4mm de largura.

As fêmeas em geral atingem 2,5mm de comprimento e até 1,6mm de largura antes de ingurgitar. Após o ingurgitamento total podem chegar a 13 mm de comprimento por 8 mm de largura.

Este parasita é de um só hospedeiro e seu ciclo de vida caracteriza-se por duas fases: parasitária (no hospedeiro) e não parasitária (fêmeas, ovos ou larvas no pasto) (PEREIRA; LABRUNA, 2008). A distribuição populacional de *R. microplus* consiste em cerca de 95% dos carrapatos presentes na pastagem e somente 5% nos bovinos em um determinado instante. O período desde que a larva se fixa ao hospedeiro até completar o ingurgitamento e queda, no caso das fêmeas, é de 21 a 22 dias. Os machos permanecem no hospedeiro por 43 dias após a infestação e alguns poucos persistem por prazos mais longos de até 70 dias (PEREIRA; LABRUNA, 2008). A longevidade das larvas no pasto varia de acordo com a temperatura do ambiente e principalmente com a pluviosidade (BRITO 2008).

2.2 Prejuízos econômicos na pecuária associados ao carrapato *Rhipicephalus microplus*

Os prejuízos na pecuária têm sido causados principalmente pela presença dos parasitas devido aos danos de morbidade e mortalidade nos animais, e, conseqüente queda na produção. Entre os ectoparasitos dos bovinos, o carrapato *R. microplus* (Canestrini, 1887) continua sendo uma das principais causas das perdas econômicas na pecuária, os danos causados nos animais estão relacionados com perda de sangue, danos no couro e transmissão de agentes causadores da babesiose e anaplasmose. Em relação ao prejuízos causados por esse carrapato no Brasil (BRITO,2008) estima-se 40% por perdas na produção de leite, 27% por mortalidade de bovinos, 11% por desempenho reprodutivo, 9% em gastos com acaricidas, 5% por redução no ganho de peso, 5% em juros bancários, 3% devido à má qualidade do couro e despesas no controle e prevenção das hemoparasitoses, estimando-se uma perda na ordem de 3,24 bilhões de dólares por ano (GRISI et al. 2014).

2.3 Controle de *R. microplus* utilizando extratos de origem vegetal

Com o intuito de diminuir o uso de carrapaticidas químicos devido às suas ações prejudiciais ao ambiente, à saúde animal, ao aplicador, entre outras, novas pesquisas vêm sendo realizadas para buscar alternativas viáveis ao controle químico através de substituição por produtos naturais de origem vegetal ou associação destes com os acaricidas sintéticos. As plantas com atividade ectoparasiticida podem ser uma alternativa para superar alguns problemas tais como resistência do carrapato aos produtos sintéticos, além de danos ambientais e riscos à saúde (PIRES et al., 2007).

Diversos estudos vêm sendo realizados com variadas estruturas de espécies vegetais para verificação da eficácia contra o carrapato bovino. No Brasil, alguns pesquisadores têm estudado o efeito de óleos essenciais no controle de carrapatos. Prates et al. (1998), em testes com óleo essencial de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.), verificaram 100% de mortalidade em larvas de *R. microplus*, após dez minutos de exposição. Os óleos essenciais das espécies *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus staigeriana* proporcionaram 100% de

eficácia de controle de *R. microplus* em concentrações iguais ou acima de 12,5% (CHAGAS et al., 2002).

Castro et al. (2009) analisaram a eficácia *in vitro* do extrato etanólico do pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) em fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino nas concentrações 30% e 15%. A maior concentração teve eficácia de 50% quanto à eclodibilidade dos ovos e o extrato na concentração 15% foi considerado ineficaz. Segundo estes autores, a legislação brasileira relativa prevê a eficácia de no mínimo 95% para os produtos antiparasitários.

Na pesquisa feita por Pires et al. (2007), estudou-se o efeito de *Simarouba versicolor*, popularmente chamada de Pau-Paraíba, sobre a oviposição do carrapato bovino. O extrato aquoso da casca dessa árvore foi preparado na concentração de 20% (m/v). A maior concentração testada (17,2 mg/ml) inibiu 100% da postura dos ovos de fêmeas ingurgitadas. Nas concentrações menores houve postura, porém os ovos foram inviáveis, não ocorrendo eclosão. Outra espécie vegetal testada contra fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino foi *Carapa guianensis*, conhecida popularmente como Andiroba. Utilizou-se extrato hexânico de suas sementes para a obtenção do óleo da planta. Este óleo foi diluído em solução de água destilada e Tween[®] 80 (dispersante). Houve 100% de mortalidade das teleóginas em todas as diluições testadas (100, 50, 30, 25 e 10%). Apenas o tratamento a 10% apresentou postura de ovos sendo estes inférteis. Nesta diluição menos concentrada, a mortalidade das fêmeas ocorreu no quarto dia após o tratamento e nas demais concentrações ocorreram morte de todas as fêmeas entre o segundo e o terceiro dia após o tratamento (FARIAS et al., 2007).

Extratos de *Calea serrata* (Asteraceae), conhecida como erva-de-cobra, chá-amargo ou quebra-tudo, foi estudada por Ribeiro et al. (2008). Observaram-se os efeitos em carrapatos de cão, *Rhipicephalus sanguineus*, e de boi, *R. microplus*. O extrato hexânico das partes aéreas da planta (folhas e caules) apresentou efeito sobre ovos e larvas de *R. microplus*. Quanto aos ovos, a maior concentração testada (50 mg/ml) inibiu 100% da eclodibilidade. Concentrações menores de 25 mg/ml e 12,5 mg/ml inibiram a eclosão em 90% e 70%, respectivamente, sendo que as larvas eclodidas morreram em seguida. Em teste com larvas, a concentração de 3,12 mg/ml foi letal para 80% delas. Em concentrações maiores testadas (50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml) obteve-se 100% de mortalidade das larvas em 48h após o tratamento. Fernandes e Freitas (2007) testaram extrato da resina oleosa do

tronco de copaíba (*Copaifera reticulata*) em solvente dimetilssulfóxido e encontraram resultados promissores para o controle de larvas do carrapato do boi. Os valores das concentrações letais de 50% e 99% das larvas foram de 1,58mg/ml (1,579 ppm) e 3,49mg/ml (3,491 ppm), respectivamente.

Extratos foliares e óleo essencial de *Piper aduncum* (pimenta-de-macaco) provenientes da região amazônica foram estudados quanto aos efeitos em larvas do carrapato bovino. Esta planta está amplamente distribuída na América Central, sudeste da Ásia e norte e nordeste do Brasil. O extrato hexânico das folhas na concentração 20 mg/ml causou 70,42% de mortalidade. Já o óleo essencial na concentração 0,1 mg/ml resultou em 100% de mortalidade larval. Uma das vantagens do uso de extratos de *Piper aduncum* para o controle acaricida se deve à presença de diferentes constituintes da planta que podem agir em conjunto, potencializando a ação acaricida e dificultando a capacidade dos carrapatos tornarem-se resistentes ao extrato. Isto se aplica aos extratos vegetais de um modo geral, pois os constituintes presentes nas plantas podem variar conforme as condições do ambiente, como o clima, tipo de solo e manejo (SILVA et al., 2009).

Hypericum polyanthemum foi estudada por Ribeiro et al. (2007) no Rio Grande do Sul. Fêmeas adultas e larvas de *R. microplus* foram submetidas a testes de imersão. Extratos metanólicos de partes aéreas não tiveram efeito sobre a oviposição das fêmeas. Já as larvas, imersas na concentração 25mg/ml, apresentaram mortalidade de 96% em 48 horas após o tratamento. No México, Rosado-Aguilar et al. (2010) estudaram o efeito de *Petiveria alliaceae* ou Erva-de-alho em fêmeas e larvas do carrapato do boi. O extrato metanólico de folhas e caules desta planta causou 100% de mortalidade em larvas e a oviposição das adultas foi inibida em 40 e 91%, respectivamente. A espécie *Melia azedarach* L. (Família Meliaceae), popularmente conhecida como Santa-Bárbara ou Cinamomo, é uma planta originária da Índia e tem sido estudada para o controle de insetos e carrapatos (VALLADARES et al., 1999; JUAN et al., 2000; BORGES et al., 2005; MENDES et al., 2007; SOUSA et al., 2008).

Sousa et al. (2008) avaliaram os efeitos de extratos hexânicos de frutos verdes e maduros de *Melia azedarach* sobre fêmeas e larvas do carrapato bovino. Ambos tiveram boa eficácia, tanto em fêmeas quanto em larvas, sendo superior o efeito dos frutos verdes. BORGES et al. (2003) realizaram estudo do efeito de extratos de frutos maduros de *M. azedarach*, preparados com diferentes solventes

sobre fêmeas adultas e larvas do carrapato do boi, entre as concentrações de 0,25 a 0,015%. Todos os extratos ocasionaram mortalidade larval, com 100 % para CHCl_3 , 98% para o extrato hexânico e 50% para o etanólico, 168h após o tratamento. Os extratos de frutos maduros não mataram as fêmeas, mas diminuíram parcial ou totalmente a produção de ovos e a embriogênese. BORGES et al. (2005) analisaram um extrato hexânico (concentração de 0,25%) dos frutos de *M. azedarach* em bezerros infestados artificialmente com *R. microplus*. As fêmeas ingurgitadas que desprendiam naturalmente dos animais foram contadas diariamente e 40 foram incubadas para acompanhamento dos parâmetros reprodutivos. Aos 21 dias de contagem, notou-se um decréscimo significativo do número médio de fêmeas no grupo tratado (188) em comparação com o controle (247). Entretanto a conversão em ovos e a eclodibilidade das larvas não foram afetadas indicando que houve interferência da planta no desenvolvimento do carrapato, mas não na sua reprodução. Um teste *in vivo* foi realizado por Valente et al. (2007) utilizando extrato aquoso de *Azadirachta indica* ou Neem (Meliaceae). Um Kg de folhas frescas foram imersas em 5L de água para posterior banho nos bovinos. Foram aplicados banhos semanais (2L/animal) por 1 mês. Este teste foi comparado com aplicação de abamectina. Os pesquisadores constataram que, dentro de um programa de controle de carrapatos, o extrato vegetal poderia substituir a abamectina, uma vez que não houve diferença na infestação por carrapatos nos diferentes grupos testados. De acordo com um estudo realizado com sementes de Neem (*A. indica*) pela Embrapa Pecuária Sudeste em parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, os extratos contendo teor de azadiractina-A que apresentaram maior eficácia foram os de concentração 10% e 12,8% sobre fêmeas adultas de *R. microplus*. Nenhuma das concentrações testadas apresentou efeito sobre as larvas do carrapato do boi (EMBRAPA 2009). Esta planta, em altas doses, pode apresentar graves efeitos de toxicidade a mamíferos. Méndez et al. (2006), administraram quantidades de pó de frutos maduros de *M. azedarach*, misturados à ração de 8 suínos, em doses únicas de 5-20g/kg. Na dose mais baixa (5g/kg) houve sintoma de diarreia passageira; nas doses de 10, 15 e 20g/kg, ocorreu incoordenação, tremores musculares, dificuldade para manter-se de pé, relutância para levantar-se, decúbito esternal e hipotermia; os 2 suínos que ingeriram 20g/kg morreram. Alterações histológicas caracterizaram-se por necroses em diversos órgãos. Já na pesquisa realizada por Seffrin et al. (2008), não foi constatada a

toxicidade de extrato aquoso de frutos verdes de *M. azedarach* em ratos Wistar. As concentrações analisadas foram 2,5; 5 e 10% (peso/volume - 1 ml/Kg) não causaram sintomas de toxicidade em ratos.

Segundo Costa et al. (2004), os produtos naturais possuem características de baixa toxicidade e persistência, por isso podem ser associados a um menor impacto ambiental em comparação aos produtos sintéticos, que apresentam problemas aos organismos benéficos e ao ambiente. Estes autores apontam o uso dos extratos vegetais como opção a ser utilizada no manejo integrado de pragas em associação a outras práticas. Os problemas associados à presença do carrapato do boi são amplos e o número de trabalhos relacionados ao desenvolvimento de resistência a acaricidas e estabelecimento de técnicas alternativas para o controle da praga é relativamente pequeno no Brasil.

Este fato dificulta o estabelecimento de um programa adequado de manejo da praga baseado em fundamentos científicos. Diante dessas dificuldades, um dos principais objetivos desse trabalho é a realização de estudos que busquem um modo de adequação de possíveis recursos disponíveis no ambiente que possam ser eficazes no combate ao carrapato bovino, evitando agredir a saúde do homem, do hospedeiro e o seu meio.

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis, solúveis em lipídeos e em solventes orgânicos, caracterizados por um forte odor e produzidos por plantas aromáticas a partir do metabolismo secundário desses vegetais. Geralmente, são obtidos através da destilação a vapor e conhecidos por suas atividades bactericidas, virucidas, antifúngicas e propriedades medicinais das suas fragâncias.

Aproximadamente, 3000 tipos de óleos essenciais são conhecidos, e destes, 300 são comercialmente importantes para as indústrias farmacêutica, agronômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumes (BAKKALI et al., 2008).

Devido à atenção que os produtos naturais vem recebendo na atualidade, através óleos essenciais, é importante desenvolver uma melhor compreensão do seu modo de ação biológica para novas aplicações na área da saúde humana, na agricultura e no meio ambiente. Alguns deles constituem alternativas eficazes ou

complementam o uso de compostos sintéticos produzidos na indústria, sem apresentar os mesmos efeitos secundários (CARSON; RILEY, 2003).

2.5 Aspectos gerais sobre a espécie *Origanum vulgare* Linnaeus (Orégano)

Origanum vulgare Linnaeus, conhecido como orégano, é uma planta herbácea, perene, aromática, de 30-50 cm de altura e pertencente à família das Lamiaceae. Suas folhas medem de 1-2 cm, suas flores são de esbranquiçadas a violáceas (LORENZI; MATOS, 2008) (Figura 1). O gênero *Origanum* possui diversas espécies, sendo a maioria delas originadas da região do Mediterrâneo (RODRIGUES, 2002) e atualmente cultivadas na Europa, Ásia e América (SOUZA, 2006). No Brasil o orégano é cultivado nas regiões Sul e Sudeste.

Suas folhas e flores são usadas como condimento, na maioria das vezes na forma desidratada. O orégano possui um odor agradável, herbáceo, intenso, de sabor quente e queimado. Para fins aromáticos, utilizam-se as folhas picadas em pedaços bem pequenos (RODRIGUES, 2002). Na composição química de suas folhas há até 1% de óleo essencial, o qual é usado na composição de aromatizantes de alimentos e perfumes (LORENZI; MATOS, 2008). Com base em diversas pesquisas, essa planta apresenta-se como um dos condimentos mais ativos já testados. O óleo essencial do orégano contém compostos fenólicos, sendo o timol e seu isômero, o carvacrol, comumente encontrados como compostos majoritários.

Souza (2006) relata o carvacrol (68,06%) como componente majoritário do óleo essencial do orégano, seguido de p-cimeno (15,91%), α -pineno (2,56%) e mirceno (1,87). O timol e o carvacrol rompem a membrana celular das bactérias, causando sua permeabilização. O orégano tem sido usado na medicina e na culinária por centenas de anos. A literatura atribui a essa planta propriedades digestivas, analgésicas, espasmolíticas, bem como expectorantes brandos (SOUZA, 2006). Diversos estudos tem abordado a atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante do óleo essencial de orégano (RODRIGUES, 2002; SOUZA, 2006) e sua aplicação em alimentos tem se mostrado promissora.

Figura 1 – Imagem da planta *Origanum vulgare* Linnaeus



Fonte: <http://www.uniprot.org/taxonomy>

2.6 Aspectos gerais sobre a espécie *Laurus nobilis* L. (Folha de Louro)

A família Lauracea compreende 32 gêneros com cerca de 2000 a 2500 espécies, dentre as quais a espécie *Laurus nobilis* L. faz parte como membro (OZCAN et al., 2010), sendo considerada uma espécie nativa da região do Mediterrâneo, cultivada em muitos países com clima moderado e subtropical (DERWICH; BENZIANE; BOUKIR, 2009). *Laurus nobilis* L. é uma árvore perenifólia com múltiplas ramificações, que cresce a cerca de 10 m de altura, apresentando folhas simples, coriáceas, verde-escuras e aromáticas (Figura 2). As flores são pequenas, contendo poucos lóbulos, masculinas e femininas, separadas na mesma planta, com coloração amarela. O fruto apresenta 10 - 15 mm, ovóide, succulento, com coloração roxa e pequena semente (LORENZI et al., 2003; PATRAKAR; MANSURIYA; PATIL, 2012).

Figura 2 – Imagem da planta *Laurus nobilis* L.



Fonte: <http://sociedade-e-seresvivos.blogspot.com.br>

A folha é a parte da planta mais utilizada para fins medicinais (LORENZI, 2002; PANIZZA, 1997). Estudos fitoquímicos tem revelado a presença de terpenóides, antocianinas e glicosídeos (PATRAKAR; MANSURIYA; PATIL, 2012).

Na indústria de alimentos, os óleos essenciais presentes nas folhas são amplamente utilizados como realçadores de sabor para alimentos e produtos de confeitaria (MARION et al., 1994). Há um grande número de relatos na literatura relacionados às suas propriedades antimicrobianas (FIORINI et al., 1997).

2.7 Aspectos gerais sobre a espécie *Illicium verum* (Anis-estrelado)

O anis-estrelado é uma planta nativa da Ásia Menor, Ilhas Gregas e Egito e utilizada desde a antiguidade. É conhecido popularmente no Brasil como anis-da-china e badiana (NEGRAES, 2003; GROSSMAN, 2005) (Figura 3). Trata-se de uma planta arbórea ou arbustiva, de ciclo perene, que pode atingir de 2,5 a 4 metros de altura. O tronco é ereto, homogêneo, com casca lisa e madeira branca. As folhas são inteiras, lanceoladas e verdes; as flores são brancas a levemente creme, agrupadas em inflorescência do tipo umbela. O fruto é marrom, deiscente, pedunculado e possui oito carpelos em formato de barco e que, juntos formam uma estrela. As sementes são ovais e marrom-amareladas (NEGRAES, 2003). Seu óleo essencial é tradicionalmente usado pelas propriedades carminativas, antiespasmódicas, expectorantes, estimulantes e bactericidas (GROSSMAN, 2005).

Tuan e Ilangantileke (1997), analisando a composição química do óleo essencial de anis-estrelado obtido por arraste a vapor d'água e CO₂ supercrítico, observaram que não houve diferença significativa entre eles, apresentando como constituinte majoritário o trans-anetol, com 92,2% para o método convencional de extração e 89% para o CO₂ supercrítico. Roopa et al. (2007), estudando a atividade antioxidante do óleo essencial e de seus extratos em diferentes métodos (peroxidação do ácido linoléico, linoleato de β-caroteno e DPPH), observaram que em todas essas metodologias o anis-estrelado apresentou forte atividade antioxidante. Identificaram o trans-anetol (94%) como composto majoritário, seguido de limoneno (1%).

Figura 3 – Imagem da planta *Illicium verum*



Fonte: <http://www.alimentosetratamentos.com.br/Anis>

REFERÊNCIAS

- ANWAR, NASEER R., Bhangar M I., Ashraf S., Naz T. F., Aladedunye F. Physico-Chemical Characteristics of Citrus Seeds and Seed Oils from Pakistan. **J Am Oil Chem So**, v. 85, p. 321–330, 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. Quimica Nova, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BORGES, L.M.F.; FERRI, P.H.; SILVA, W.C.; SILVA, W.J. Ação do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.1, p.53-59, 2003.
- BORGES, L.M.F.; FERRI, P.H.; SILVA, W.C.; SILVA, W.J.; MELO, L.S.; SOUZA, L.A.D.; SOARES, S.F.; FARIA, K.A.; GOMES, N.A.; MORI, A.; SILVA, N.F. **Ação do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente**. Revista de Patologia Tropical, v. 34, n.1, p.53-59, jan./abr. 2005.
- BRITO, L.G. Carrapatograma: **um aliado do produtor na exploração leiteira**. Documento criado em 31/12/2008. Disponível em <http://www.agrosoft.org.br/pdf.php/?node=103589>. Acesso em 27 de out de 2016.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales**. 2.ed. Paris: Lavoisier, 1993.
- CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. **Commun. Diseases Intelligence**, v. 27, p.143-146, 2003.
- CASTRO, K.N.C.; ISHIKAWA, M.M.; CATTO, J.B.; CASTRO M.M.; MOTTA, I.S. **Avaliação *in vitro* do extrato do pinheiro brasileiro para controle do carrapato dos bovinos**. Revista Brasileira de Agroecologia, v.4, n.2, nov. 2009.
- CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
- CLÁUDIO JUNIOR, P. A. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas**, 80 f. Dissertação (Mestrado em Química)- pós-graduação em química Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. **Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas**. Acta Biologica Leopoldensia, v.26, n.2, p.173-185, jul./dez. 2004.

COSTA, F. B.; VASCONCELOS, P. S. S.; SILVA, A. M. M.; BRANDÃO, V. M.; SILVA, I. A.; TEIXEIRA, W. C.; GUERRA, R. M. S. N.; SANTOS, A. C. G. **Eficácia de fitoterápicos em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião oeste do Maranhão, Brasil**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, São Paulo, v. 17, supl. 1, p. 83-86, 2008.

CUNHA S. et al. **Cultivo dos Citros**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1996. 43p.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; BOUKIR, A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 3818-3824, 2009.

DE ARAÚJO, E.; DE QUEIROZ, L.; MACHADO, M. What is citrus taxonomic implications from a study of cp-dna evolution in the tribe citreae (rutaceae subfamily aurantioideae). **Organisms diversity and evolution**, v. 3, p. 55-62, 2003.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 230 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Uso de extratos de nim (*Azadirachta indica*) no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Comunicado Técnico, São Carlos, 2009. 12p.

EVANS, D. E. **Ecologia e controle de carrapato de bovinos**. Coronel Pacheco: IICA:EMBRAPA, 1992. 61 p. (Consultat Final Report).

FARIAS, M. P. O.; SOUSA, D. P.; ARRUDA, A. C.; ARRUDA, M. S. P.; WANDERLEY, A. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 68-71, 2007.

FERNANDES, F.F.; FREITAS, E.P.S. Acaricidal activity of na oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.147, p.150-154, 2007.

FIORINE, C. et al. Composition of the flower, leaf and stem essential oils from *Laurus nobilis* L. **Flavour and Fragrance Jornal**, 12, 91-93, 1997.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. de S.; PRATA, M. C. de A. **Carrapato de bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. 6 p. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 36).

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil**. Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, n. 8, p. 49-61, 1993.

GOMES, A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, 1998. p. 9-44.

GROSSMAN, L. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde**. São Paulo: Optonline, 2005. 300 p.

JUAN, A.; SANS, A.; RIBA, M. Antifeedant activity of fruit and seed extracts of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. **Phytoparasitica**, v.28, n.4, p.1-9, 2000.

LORENZI, H. et al. *Laurus nobilis* L. In: **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 153p. 2003.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MARION, J.P. et al. Spices and their Extracts: Utilization, Selection, Quality Control and New Developments. In: **Spices, Herbs and Edible Fungi; Charalambous, G.**, Ed. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. 71-95, 1994.

MARTINEZ, M.L., DA SILVA, M.V.G.B., MACHADO, M.A., TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S. **A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos**. In: V SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, Pirassununga, SP, p. 1-3, 2004.

MENDES, E.C.; MARONEZE, D.M.; NALIM, D.M. Avaliação da atividade ovicida de extrato aquoso de folhas de *Melia azedarach* sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16, 2007. Maringá, PR. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá 2007.

MÉNDEZ, M. C.; ELIAS, F.; RIET-CORREA, F.; GIMENO, E.J.; PORTIANSKY, E.L. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.26-30, jan./mar. 2006.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. 368p.

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

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas, condimentos**. São Paulo: Bei Comunicações, 2003. p. 254.

OTHA, Y.; HIROSE, Y, **Constituents of cold-pressed oil of citrus natsudai hayata. agric. biol. chem.**, v. 30: p. 1196-1201, 1966.

OZCAN, B. et al. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n. 5, p.637-641, 2010.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**. São Paulo: IBRASA, 28 ed., 279 p., 1997.

PATRAKAR, R.; MANSURIYA, M.; PATIL, P. Phytochemical and Pharmacological Review on *Laurus nobilis*. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v.1, n. 2, 2012.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Orgs.). ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência***. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2008. p15-53.

PIRES, J.E.P.; FERNANDES, R.M.; FERNANDES, M.Z.L.C.M.; VIANA, G.E.N.; DOURADO, J.C.L.; SOUSA, S.A.A. **Determinação da concentração inibitória média (CL50) do extrato aquoso de *Simarouba versicolor*, St. Hill sobre a ovipostura do carrapato bovino (*Boophilus microplus*, Canestrini, 1887)**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.9, n.4, p.23-26, 2007.

RIBEIRO, V.L.S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; VON POSER, G. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v.151, p.351-354, 2008.

RIBEIRO, V.L.S.; TOIGO, E.; SÉRGIO, A.L.; BORDIGNON, K.G.; VON POSER, G. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.199-203, 2007.

ROCHA, C. M. B. M. da. **Importância do carrapato *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 (Acarina, Ixodidae) no processo produtivo do leite**. Lavras: UFLA, 2000. 20 p. (UFLA. Boletim técnico, 35). Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/_adm/upload/boletim/bol_35.pdf>. Acesso em: 20 out. 2016.

RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 163p. Tese de Doutorado. Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

ROOPA, A. P.; SEMWAL, A. D.; SHARMA, G. K.; AGATHIAN, G.; BAWA, A. S. Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 59-66, 2007.

ROSADO-AGUILAR, J.A.; AGUILLAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; BORGES-AGAEZ, R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extract from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.168, p.299-303, 2010.

SÁ, C.G, **Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de Citrus sinensis L. Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer**, 83p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina 2011.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal), Mercado Veterinário: classe terapêutica e espécie animais. 2009. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em: 20 out. 2016.

SINGH, S; RAJAM, MV Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions. **Physiol mol biol plants**, v.15: p. 3-22, 2009.

SOUZA, A.P.; VEIGA, L.P.H.N.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; CARDOSO, C.P.; NUNES, A.P.O. **Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus: avaliação em cipermetrina e amitraz**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.17, n.4, p.242-245, 2008.

SOUZA,E.L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (Origanum vulgare L.)**:Uma abordagem para o uso de alimentos.141p.2006.Tese de Doutorado.Universidade Federal de Pernambuco,Recife,PE.

SOUSA, L.A.D.; SOARES, S.F.; JÚNIOR, H.B.P.; FERRI, P.H.; BORGES, L.M.F. **Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (Melia azedarach) sobre Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae)**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.17, n.1, p.36-40, 2008.

TAYLOR, B. Fruit and juice processing. IN: ASHURST, fruites juices. P.R Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruits Juices.Hereford (UK): **Blackwell Publishing Ltd**, p.35-66, 2005.

TUAN, D. Q.; ILANGANTILEKE, S. G. Liquid CO2 extraction of essential oil from star anise fruits (*Illicium verum* H.) **Journal of Food Engineering**, v. 31, p.47-57, 1997.

VALLADARES, G. R.; FERREYRA, D.; DEFAGO, M. T.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**, v.70, n.4, p.421-424, 1999.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. **Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará**. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.19, n. 3/4, p. 99-103, jul./dez. 1999.

YU, J.; WANG, L.; Wazem, RL. Miller, EG.; Pike, LM.; Patil, BS , Antioxidant activity of Citrus limonóides, flavonoids, and coumarins. **j. agric. chem**, v. 53: p.2009-2014,2005.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade *in vitro* de diferentes concentrações de óleos essenciais de *Laurus nobilis* L. (folha de louro), do *Origanum vulgare* L. (folha do orégano) e do fruto do *Illicium verum* L. (anis estrelado) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* e determinar a constituição química dos óleos essenciais dessas plantas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química de cada óleo essencial e determinar seus componentes majoritários
- Determinar o percentual de mortalidade das larvas de *R. microplus* utilizando os óleos essenciais nas concentrações de 2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL.
- Determinar o percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* utilizando os óleos essenciais nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 mg/mL.

4 ARTIGO

CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Laurus nobilis*, *Illicium verum* e *Origanum vulgare* SOBRE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

RESUMO

Rhipicephalus microplus é comumente conhecido como carrapato dos bovinos, sendo um dos principais problemas sanitários na bovinocultura em países de clima tropical e subtropical. As infestações por este ectoparasito são controladas principalmente, através da utilização de acaricidas químicos. Todavia, o uso excessivo destes produtos predispõe a contaminação do meio ambiente, do homem e estimula a seleção de carrapatos resistentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade *in vitro* de diferentes concentrações de óleos essenciais da folha de *Laurus nobilis* (louro), da folha de *Origanum vulgare* L. (orégano) e do fruto de *Illicium verum* L. (anis estrelado) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os óleos foram extraídos por hidrodestilação e a caracterização química foi realizada através de espectrofotometria de massa. Para avaliar a ação acaricida dos óleos sobre *R. microplus* foram realizados o teste sobre larvas através da metodologia de pacote e as concentrações testadas foram: 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20% e para fêmeas foi realizado o teste de imersão nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 mg/mL de cada óleo. Na análise da composição química e identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais, *I. verum* apresentou 18 compostos químicos, sendo 1 composto majoritário: o Trans anetol (88,32%), no óleo de *O. vulgare* foram identificados 28 componentes químicos tendo como composto majoritário o 4 terpineol (24,92%) e no óleo de *L. nobilis* foram identificados 28 componentes químicos, cujo componente majoritário foi o 1,8 cineol (74,23%). Com relação aos testes nos carrapatos, tanto em larvas quanto em fêmeas adultas, somente o óleo essencial de *I. verum* apresentou atividade acaricida, ocasionando 99,8 % de mortalidade de larvas na concentração de 15 mg/mL e percentual de controle de 85,4 % sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, utilizando o óleo na concentração de 80 mg/mL.

Palavras-chave: Fitoterápicos. Biocarrapaticidas. Carrapatos.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is commonly known as bovine tick, being one of the main sanitary problems in bovine breeding in tropical and subtropical countries. Infestations by this ectoparasite are mainly controlled through the use of chemical acaricides. However, the excessive use of these products predisposes the contamination of the environment and man and stimulates the selection of resistant ticks. The objective of this study was to evaluate the in vitro pathogenicity of different concentrations of essential oils of *Laurus nobilis* (laurel) leaf, leaf of *Origanum vulgare* L. (oregano) and the fruit of *Illicium verum* L. (star anise) on engorged larvae and *R. microplus* females. The oils were extracted by hydrodistillation and the chemical characterization was performed by mass spectrometry. To evaluate the acaricidal action of the oils on *R. microplus*, the test on larvae was carried out using the package methodology and the concentrations tested were: 2.5%, 5%, 10%, 15% and 20% and for females the Immersion test at the concentrations of 10, 20, 40, 60 and 80 mg / mL of each oil. In the analysis of the chemical composition and identification of the chemical constituents of the essential oils, *I. verum* presented 18 chemical compounds, being 1 major compound: Trans anetol (88.32%), in *O. vulgare* oil were identified 28 chemical components having as (24.92%), and in *L. nobilis* oil, 28 chemical components were identified. The major component was 1.8 cineol (74.23%). With regard to tick tests, in both larvae and adult females, only *I. verum* essential oil showed acaricidal activity, causing 99.8% mortality of larvae at 15 mg / mL and control percentage of 85, 4% on engorged females of *R. microplus*, using the oil at the concentration of 80 mg / ml.

Key words: Herbal medicines. Biocarpathians. Ticks.

4.1 INTRODUÇÃO

A infestação de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* é um dos principais entraves à pecuária no Brasil, onde as características climáticas favorecem o desenvolvimento desses parasitas na maioria dos meses do ano (EVANS, 1992). O carrapato *R. microplus* é hematófago e pode causar anemia, inocular toxinas nos hospedeiros, transmitir agentes infecciosos dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*, reduzir a qualidade do couro animal, além de comprometer o ganho de peso e a produção de leite (GOMES, 1998). Em bovinos leiteiros é comum observar o agravamento destes problemas, pois grande parte dos rebanhos possui animais com maior proporção genética de origem europeia, sendo estes mais sensíveis ao *R. microplus* (ROCHA, 2000).

O controle do carrapato dos bovinos é feito, basicamente, pela utilização de carrapaticidas, muitas vezes de forma indiscriminada, o que tem levado ao desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003). O uso destes produtos pode levar a intoxicações dos animais e ao impacto ambiental, pelo efeito residual deles na natureza (FURLONG, 1993).

Também há um risco vigente relacionado à presença de resíduos de carrapaticidas nos alimentos, visto que muitos produtores não respeitam os prazos de carência e a proibição da utilização de determinados produtos em animais lactantes. Somado a isso, a pesquisa para produção de novas bases químicas demanda muito tempo e grandes investimentos (CHAGAS et al., 2002). Diante desse contexto, a utilização de fitoterápicos para o controle de parasitas é considerada uma importante alternativa, podendo reduzir os impactos econômicos e causar menos danos ao ecossistema, quando comparada ao uso de pesticidas sintéticos. Além disso, observa-se no Brasil e no mundo um aumento na produção de alimentos orgânicos, modelo este que não permite o uso de pesticidas (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Apesar de o Brasil ser considerado o país com o maior número de espécies vegetais no mundo, estudos sobre possíveis efeitos terapêuticos dessas plantas são limitados (DI STASI, 1996), principalmente no que diz respeito aos animais de produção. Por outro lado, observa-se em campo, em diversas regiões do país, a utilização de extratos vegetais produzidos de forma empírica, para o tratamento de diversos males do homem e dos animais. Estes extratos são produzidos com base no conhecimento transmitido por gerações, que

muitas vezes foi aprendido com indígenas ou raizeiros ou ainda pela observação do comportamento dos hábitos dos animais. Alguns estudos científicos revelam o efeito promissor de fitoterápicos no controle de *R. microplus* (COSTA et al., 2008; FARIAS et al., 2007).

O controle de carrapatos com fitoterápicos eficazes poderá trazer grandes vantagens para o produtor. Porém, se o óleo essencial utilizado não produzir efeito real, existe o risco de intensa infestação do rebanho, com consequências severas, como queda na produção, além de perda de animais. Nesse sentido, é evidente a necessidade de buscar alternativas viáveis e sustentáveis que possam de maneira eficaz, promover o controle de carrapatos, de modo a assegurar o bem-estar animal e garantir mínimos efeitos nocivos ao meio ambiente.

Estudos têm demonstrado que os óleos essenciais de *Illicium verum*, *Origanum vulgare* e *Laurus nobilis* contêm altas concentrações de trans-anetol (Tuan e Ilangantileke 1997), Carvacrol (Souza 2006) e 1,8 Cineol (Silveira 2012), respectivamente, o que dão a estes óleos potenciais antioxidantes, antifúngicos e antibacterianos.

Desse modo, a realização de pesquisas científicas que abordam sobre o controle de carrapatos a partir de fitoterápicos é de grande relevância para que se possam obter mais informações a respeito do tema. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade *in vitro* de diferentes concentrações de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis* L.), da folha do orégano (*Origanum vulgare* L.), e do fruto do anis estrelado (*Illicium verum* L.) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e determinar a constituição química dos óleos essenciais dessas plantas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Óleo essencial – material vegetal

Os materiais vegetais folha de louro (*Laurus nobilis* L.), folha do orégano (*Origanum vulgare* L.), e o fruto do anis estrelado (*Illicium verum* L.) foram adquiridos de forma seca em uma feira localizada no município de Cuiabá-MT. As plantas foram escolhidas através de pesquisa prévia na literatura e que ainda não foram testadas sobre carrapatos, mas que já demonstraram efeitos de controle ou repelência sobre

algum parasito. Para obtenção dos óleos essenciais, as plantas foram encaminhadas ao laboratório de Farmacognosia da Universidade de Cuiabá, e o óleo essencial foi obtido pela técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger de acordo com a metodologia de Simões et al. (2004).

4.2.2 Extração e análise dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em um sistema extrator de Clevenger de vidro, acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, com uma manta elétrica aquecedora mantendo-se a temperatura em 100°C (FARMACOPÉIA, 2010) (Figura 1). Para cada rotina de extração foram utilizadas 100 g de folhas secas do orégano para 850 ml de água, 159,25g de folha de louro secas para 850 ml de água e 119,21g do fruto seco e triturado do anis estrelado para 300 ml de água destilada. Os materiais vegetais foram colocados separadamente em um balão de fundo redondo acoplado ao sistema Clevenger onde a extração foi realizada durante aproximadamente três horas, mantendo a solução em ebulição. Posteriormente coletou-se o óleo essencial onde se obteve 1,5 ml de óleo essencial de orégano e de folha de louro e 2,97 ml de óleo essencial do fruto do anis estrelado.

A análise em relação à composição química dos óleos essenciais foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS - Shimadzu QP-2010 Plus) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Factor Four / VF - 5ms (30mx 0,25mm x 0,25µm espessura do filme), utilizando hélio como gás veículo a 1 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 60°C, a qual foi mantida constante durante 2 min. Foi aumentada a uma taxa de 3°C min⁻¹ a 260°C, seguido de 10°C min⁻¹ a 290 °C, com um final isotérmico (290 °C) durante 10 min. A injeção da amostra foi 1µ (modo de divisão 1:50). As temperaturas do injetor e do detector foram de 220°C e 250°C, respectivamente. O espectro de massa foi obtido numa gama de m / z 10-300, pela técnica de impacto de elétrons a 70 eV.

A análise quantitativa da composição química dos óleos foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização de chama HP5890 Série II (FID), utilizando as mesmas condições operacionais e o mesmo tipo de coluna que na análise GC/MS, na qual a o percentual de cada componente foi calculado pela

área integral sob os respectivos picos em relação à área total de todos os constituintes da amostra. Os diferentes constituintes químicos do óleo essencial foram identificados pela comparação visual dos seus espectros de massa com os da literatura e os espectros fornecidos pela base de dados de equipamentos (NIST 08), assim como pela comparação dos índices de retenção com os da literatura (ADAMS, 2007). Uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20) foi injetada sob as mesmas condições cromatográficas que a amostra e utilizada para obter os índices de retenção como descrito por Van den Dool e Kratz (1963).

Figura 1 – Aparelho de Clevenger para obtenção de óleo essencial



Fonte: CORRÊA, R.S, 2016

4.2.3 Obtenção dos carrapatos

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram obtidas através de infestação natural em bovinos de leite mantidos em uma propriedade particular na cidade de Juiz de Fora (MG) sem contato prévio com produtos químicos. As fêmeas ingurgitadas foram coletadas e levadas ao laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (MG), lavadas em água corrente, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% para assepsia da cutícula e secas em papel toalha. Algumas fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri e mantidas em

câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ para a obtenção de ovos e larvas; enquanto outras foram divididas em grupos com peso homogêneo e submetidas aos tratamentos pertinentes.

4.2.4 Teste de pacote de larvas

Foi utilizada a metodologia adaptada por Monteiro et al. (2012), onde aproximadamente 100 larvas foram colocadas entre papéis de filtro de 6 x 6 cm, fechados com pregadores (*binder clips*), e impregnados com óleos essenciais nas concentrações de 2,5; 5; 10; 15 e 20 mg/mL, sendo este óleo emulsificado com Tween 80 a 30 mg/mL tendo como veículo água destilada, além do estabelecimento de um grupo controle negativo com água destilada e Tween 80 a 30 mg/mL (Figura 2). Após o tratamento, os pacotes de larvas foram mantidos em estufa climatizada a 27°C com umidade relativa superior a 80%. A leitura foi realizada 24 após a impregnação, contando-se as larvas vivas e mortas com o auxílio de uma bomba a vácuo. Foram utilizados 6 envelopes para cada tratamento determinado.

4.2.5 Teste de imersão de fêmeas

As teleóginas foram submetidas a teste *in vitro* de imersão, segundo Drummond et al. (1973), as fêmeas foram pesadas individualmente para formação de seis grupos homogêneos contendo 10 fêmeas em cada e o bioensaio foi realizado duas vezes.

As concentrações dos óleos foram 10, 20, 40, 60 e 80 mg/mL, com a adição de Tween 80 a 30 mg/mL para emulsificação, e como veículo água destilada. O bioensaio teve um grupo controle negativo composto apenas por água destilada e Tween 80 a 30 mg/mL. As fêmeas foram imersas por cinco minutos em seus respectivos tratamentos, e em seguida foram acondicionadas em placas de Petri (Figura 2) e mantidas em estufa climatizada a 27°C com umidade relativa superior a 70%, durante todo período de oviposição. A partir da incubação, as teleóginas dos respectivos tratamentos foram analisadas diariamente, sendo mensurado o peso da massa de ovos de cada fêmea, até o término da postura, para avaliação do percentual de eclosão das larvas. O cálculo da eficácia do produto (EP) foi realizado usando-se as fórmulas matemáticas abaixo descritas (Drummond et al., 1973).

$$RE = \frac{\text{(massa de ovos)}}{\text{(Peso inicial das fêmeas)}} \times \text{percentual de eclosão} \times 20.000$$

$$PC = \frac{\text{(RE grupo controle - RE grupo tratado)}}{\text{(RE grupo controle)}} \times 100$$

$$IPO = \frac{\text{(massa de ovos)}}{\text{(Peso inicial das fêmeas)}} \times 100$$

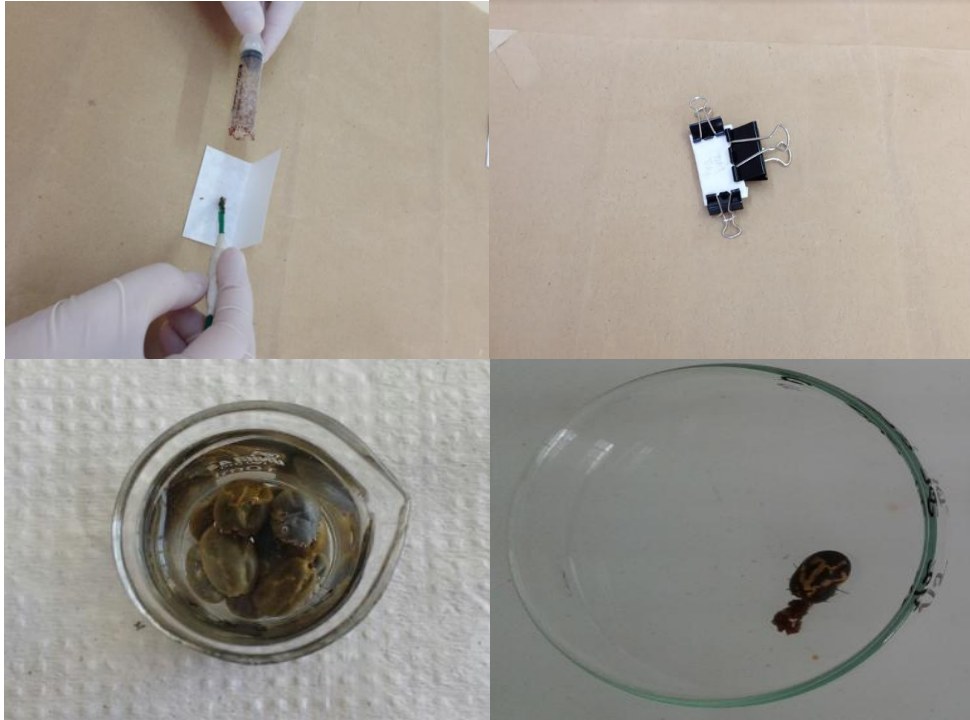
Legenda:

IPO: índice de produção de ovos;

RE: reprodução estimada;

PC: percentual de controle;

Figura 2 – Larvas de *R. microplus* colocadas entre papéis de filtro 6 x 6 cm, fechados com pregadores (*binder clips*) seguido do teste de imersão de fêmeas e oviposição



Fonte: CORRÊA, R.S, 2016

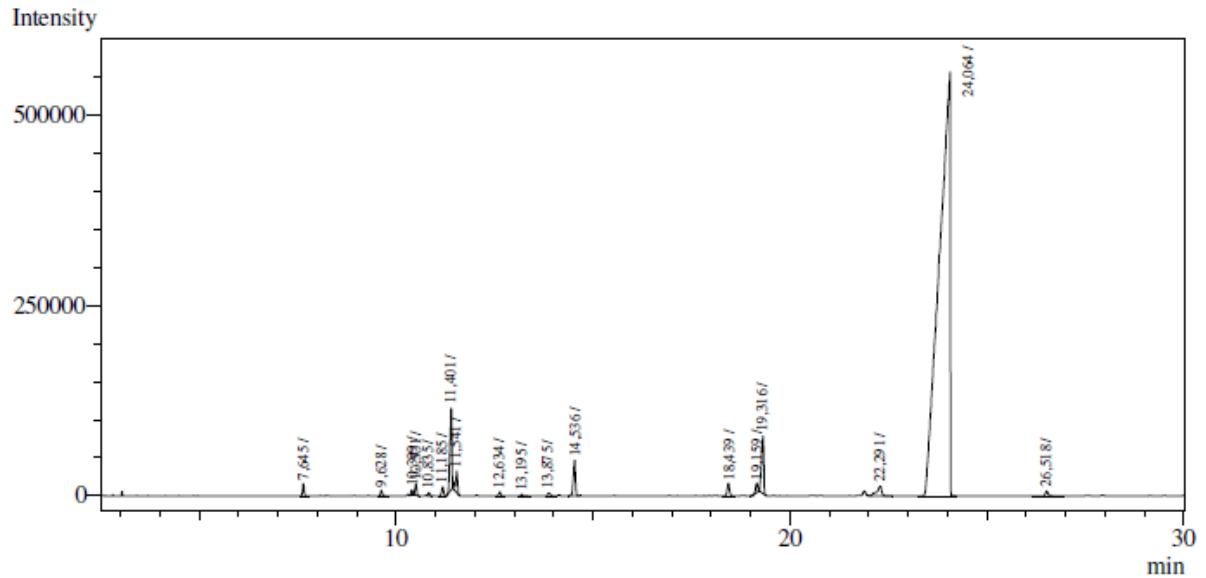
4.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o *software Instat 3.0*. As médias dos tratamentos foram comparadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, exceto nos casos de dados não paramétricos, os quais foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por Student-Newman-Keuls.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da composição química e identificação dos constituintes químicos do óleo essencial através de CG-EM, *Illicium verum* apresentou 18 compostos químicos presentes no óleo, sendo o composto majoritário trans-anetol com 88,32% (Tabela 1 e Figura 3).

Figura 3 - Cromatografia do óleo essencial de *Illicium verum*



Resultados similares apresentando trans-anetol como componente majoritário em *I. verum* estão presentes na literatura, como por exemplo, Tuan e Ilangantileke (1997), que observaram trans-anetol numa concentração de 92,2% para o método convencional de extração e 89% para o CO₂ supercrítico. Roopa et al. (2007), em seus estudos identificaram o trans-anetol com 94% como composto majoritário, seguido de limoneno (1%). Da mesma forma, Huang (2010), identificou por GC e GCMS que o componente mais abundante foi trans-anetol (89,5%), sendo o componente majoritário deste óleo. Entretanto, Lima (2014) avaliando a toxicidade do óleo essencial de *I. verum* para o pulgão-verde *Schizaphis graminum*, identificou como constituintes do óleo essencial de *Illicium verum* os compostos Trans-anetol (90,40%) e em menores quantidades, o limoneno (2,60%) e metil-chavicol (1,30%), além de pequenas concentrações do α -pineno, linalol e 4-terpineol.

As diferenças na qualidade e quantidade na composição do óleo essencial, entre este estudo e outros podem ser devido à variação genética, clima, distribuição geográfica e sazonal da planta, ciclo vegetativo, fatores extrínsecos e processo de obtenção desses óleos.

Tabela 1 - Índice de retenção, RI e área relativa do pico (%) de compostos em óleos essenciais da planta *Illicium verum*.

Compostos	RI ^b	% área relativa do pico <i>Illicium verum</i>
α- pinene	939	0,38
mircene	990	0,19
α- phellandrene	1002	0,15
δ-3- carene	1011	0,35
α-terpineno	1017	0,10
p-cimeno	1024	0,33
limonen0	1029	3,05
1,8-cineol	1031	0,83
γ-terpineno	1059	0,15
z-óxido de linalol	1072	0,07
terpinoleno	1088	0,15
linalol	1096	1,45
terpinen-4-ol	1177	0,55
α-terpineol	1188	0,29
estragole	1196	2,52
p-anis aldeído	1250	0,87
Trans-anetol	1284	88,32
eugenol	1359	0,24
Total		99,99

^bÍndice de Retenção (RI) relativo a n-alcanos em coluna capilar VF-5ms (30m x 0.25mm, 0.25 μm).

No óleo essencial de *Origanum vulgare* foram identificados 28 componentes químicos tendo como compostos majoritários o 4 terpineol (24,92%) ,carvacrol (19,67%), γ-terpineno (11,82%), 4 thujanol (8,31%) e o α-terpineno (7,32%) (Tabela 2).

Resultados similares apresentando carvacrol como componente majoritário em *O. vulgare* estão presentes na literatura, como por exemplo, Souza (2006), que observou carvacrol numa concentração de 68,06% em seus estudos seguido de p-cimeno (15,91%),α-pineno (2,56%) e mirceneo (1,87%).

Acredita-se que as diferenças na qualidade e quantidade na composição do óleo essencial, entre este estudo e o de Souza (2006) podem ser devido a variação genética, clima, distribuição geográfica e sazonal da planta, ciclo vegetativo, fatores extrínsecos e processo de obtenção desses óleos.

Tabela 2 - Índice de retenção, RI e área relativa do pico (%) de compostos em óleos essenciais da planta *Origanum vulgare*

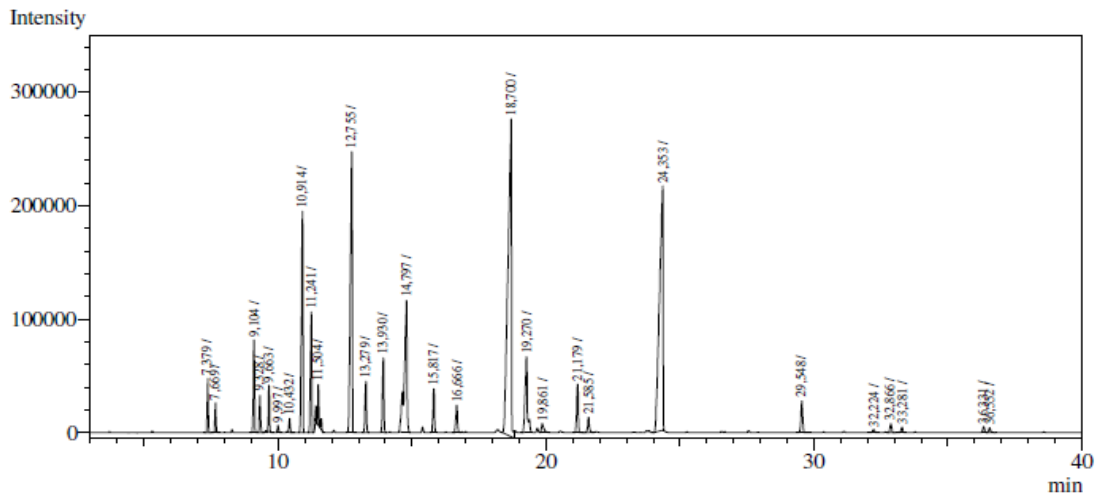
Compostos	RI ^b	% área relativa do pico
		<i>Origanum vulgare</i>
α- thujene	930	1,30
α- pinene	939	0,75
sabinene	975	2,53
β- pinene	979	1,04
mircene	990	1,17
3-octanol	991	0,21
α- phellandrene	1002	0.43
α-terpineno	1017	7.32
p-cimeno	1024	3.64
sylvestrene	1030	1.49
γ-terpineno	1059	11,82
E-4-thujanol	1070	1,64
terpinoleno	1088	2.33
Z-4-thujanol	1098	8,31
z-p-menth-2-em-1-ol	1121	1,46
E-p-menth-2-em-1-ol	1140	1,00
terpinen-4-ol	1177	24,72
α-terpineol	1188	3,88
E-piperitol	1208	0,46
Anisol	1235	1,70
acetato de linalol	1257	0,58
Carvacrol	1299	19,67
E-cariofileno	1419	1,23
Germacrene D	1485	0,13
Bicyclogermacrene	1500	0,33
B- bisaboleno	1505	0,22
Espatulenol	1578	0,22
Óxido de cariofileno	1583	0,21
Total		99,99

^bÍndice de Retenção (RI) relativo a n-alcenos em coluna capilar VF-5ms (30m x 0.25mm, 0.25 μm).

Souza et al. (2016) ao avaliarem o efeito bactericida *in vitro* dos óleos essenciais de *Illicium verum* (anis estrelado) e *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) analisaram por CG-EM e CG-DIC a composição química e concentração mínima bactericida desses óleos essenciais sobre a *bactéria* verificando como compostos químicos majoritários o Trans-Anetol (87,69%) encontrado no *Illicium verum* e o carvacrol (73,11%) no *Origanum vulgare* (Figura 4).

As diferenças na qualidade e quantidade na composição do óleo essencial, entre este estudo e outros podem ser devido a variação genética, clima, distribuição geográfica e sazonal da planta, ciclo vegetativo, fatores extrínsecos e processo de obtenção desses óleos.

Figura 4 - Cromatografia do óleo essencial de *Origanum vulgare*.



No óleo de *Laurus nobilis* foram identificados 28 componentes químicos cujo componente majoritário foi o 1,8 cineol (74,23%), conforme observado na Tabela 3 e Figura 5. Estudos fitoquímicos tem revelado a presença de terpenóides, antocianinas e glicosídeos (PATRAKAR; MANSURIYA; PATIL, 2012).

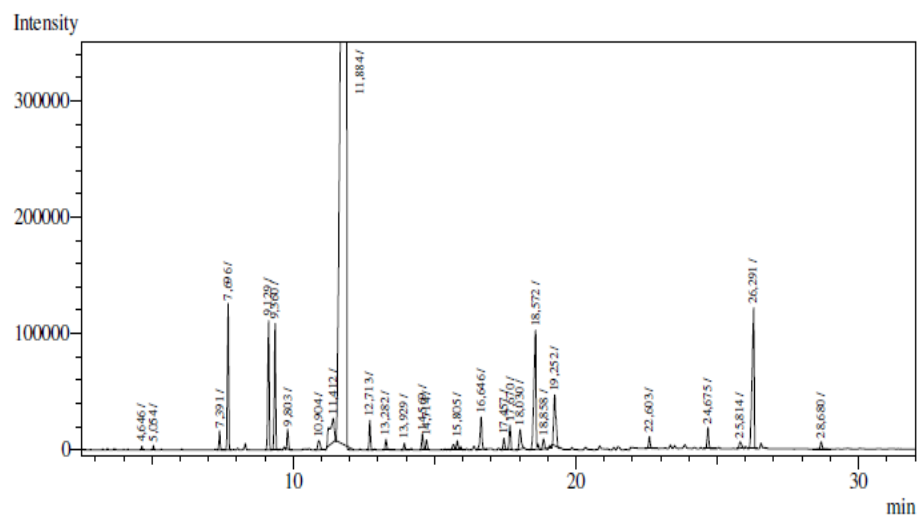
Silveira (2012) avaliou a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *L. nobilis* como agente conservador natural em embutido cárneo fresco, onde a análise por CG-EM do óleo essencial de *L. nobilis* revelou como compostos químicos majoritários o 1,8 cineol (35,50%) e o linalol (14,10%) constatando que o óleo essencial de *L. nobilis* apresentou atividade antimicrobiana *in vitro*, principalmente contra *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*.

Tabela 3 - Índice de retenção, RI e área relativa do pico (%) de compostos em óleos essenciais da planta *Laurus nobilis*

Compostos	RI ^b	% área relativa do pico
		<i>Laurus nobilis</i>
α- thujene	930	0,34
α- pinene	939	2,64
sabinene	975	2,64
β- pinene	979	2,51
desidro-1,8-cineol	991	0,36
α-terpineno	1017	0,32
p-cimeno	1024	1,67
1,8-cineol	1031	74,23
γ-terpineno	1059	0,58
E-4-thujanol	1070	0,24
terpinoleno	1088	0,12
linalol	1096	0,21
Z-4-thujanol	1098	0,31
z-p-menth-2-em-1-ol	1121	0,42
E-pinocarveol	1139	0,86
Sabina cetona	1159	0,26
Pinocarvona	1164	0,53
δ-terpineol	1166	0,59
terpinen-4-ol	1177	3,75
α-terpineol	1188	0,30
mirtenol	1195	1,65
δ- terpinil acetato	1317	0,49
α- terpinil acetato	1349	0,18
Total		95,20

^bÍndice de Retenção (RI) relativo a n-alcenos em coluna capilar VF-5ms (30m x 0.25mm, 0.25 μm).

Figura 5 - Cromatografia do óleo essencial de *Laurus nobilis*.



Na análise do percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *I. verum*, *O. vulgare*, e *L. nobilis* (Tabela 4), verificou-se que somente o óleo essencial de *I. verum* foi eficaz na mortalidade das larvas, apresentando percentuais de mortalidade de 72,2, 99,8 e 94,8% nas concentrações de 10, 15 e 20 mg/ml respectivamente.

Tabela 4 - Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Illicium verum*, *Origanum vulgare* e *Laurus nobilis* em condições laboratoriais ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R $\geq 10\%$). Média \pm Desvio padrão.

Concentrações	<i>Illicium verum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Laurus nobilis</i>
Controle Tween 80- 30 mg/ml	0 \pm 0 a	0 \pm 0	0 \pm 0
2,5 mg/ml	0 \pm 0 a	0 \pm 0	0 \pm 0
5,0 mg/ml	0 \pm 0 a	0 \pm 0	0 \pm 0
10,0 mg/ml	72,2 \pm 10,0 ab	0 \pm 0	0 \pm 0
15,0 mg/ml	99,8 \pm 0,003 b	0 \pm 0	0 \pm 0
20,0 mg/ml	94,8 \pm 0,07 b	0 \pm 0	0 \pm 0

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

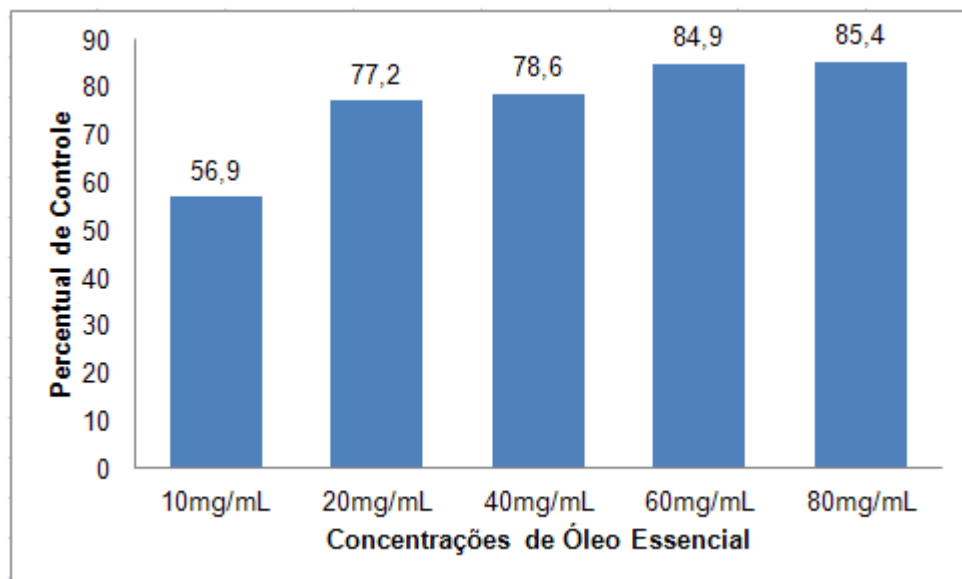
Por não terem apresentado atividade acaricida sobre larvas, os óleos de *O. vulgare* e *L. nobilis* não foram testados sobre teleóginas. O Peso das fêmeas ingurgitadas antes da postura (mg), peso da massa de ovos (mg), índice de produção de ovos (IPO%) e percentual de eclosão de larvas (%) de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *I. verum* estão representados na Tabela 5, onde pode-se perceber redução significativa no peso da massa de ovos a partir da concentração de 60 mg/ml e na porcentagem de eclosão a partir de 20 mg/ml. As porcentagens do controle obtidas com exposição ao óleo nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80mg/ml foram 56,9; 77,2; 78,5; 84,9 e 85,4% respectivamente (Gráfico 1).

Tabela 5 – Peso das fêmeas ingurgitadas antes da postura (mg), peso da massa de ovos (mg), índice de produção de ovos (IPO%) e percentual de eclosão de larvas (%) de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Illicium verum* em condições laboratoriais (laboratoriais ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R $\geq 10\%$). Média \pm Desvio padrão.

Tratamentos	Peso das fêmeas Ingurgitadas antes da postura (mg)	Peso da massa ovos (mg)	Índice de produção de ovos (%)	Percentual de eclosão de larvas (%)
Controle Tween 80 (3%)	232,9 \pm 37,1 a	108,0 \pm 47,5 a	44 \pm 15 ab	93,0 \pm 8,0 a
10,0 mg/mL	233,7 \pm 34,6 a	92,9 \pm 32,7 ab	40 \pm 12 abc	46,8 \pm 37,7 ab
20,0 mg/mL	233,8 \pm 40,2 a	82,5 \pm 34,8 ab	31 \pm 17 bc	27,9 \pm 32,8 b
40,0 mg/mL	233,3 \pm 27,1 a	85,6 \pm 30,2 ab	37 \pm 12 ab	25,3 \pm 33,1 b
60,0 mg/mL	233,7 \pm 50,3 a	79,1 \pm 45,1 ab	32 \pm 15 bc	19,2 \pm 24,6 b
80,0 mg/mL	233,7 \pm 39,2 a	57,3 \pm 34,4 b	25 \pm 13 c	25,6 \pm 29,0 b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa($p < 0,05$).

Gráfico 1- Porcentagens de controle obtidas com exposição ao óleo nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80mg/ml.



A atividade acaricida do óleo essencial de *I. verum* é provavelmente

relacionada ao alto teor de trans- anetol (88,32%). Este composto já apresentou atividade contra fungos (HUANG et al., 2010), pulgões (LIMA et al., 2014) e bactérias (SOUZA et al., 2016).

Apel et al. (2009) observou a presença do 1,8 Cineol (54,4%) como composto majoritário em partes aéreas de *Cunila incisa* demonstrando baixo efeito acaricida sobre *R. microplus*. Da mesma Forma HÜI (2015) identificou por GC e GCMS que o componente mais abundante das partes aéreas do *Ocimum canum* (alfavaca) foi o 1,8 Cineol (70,2%) que também demonstrou a não atividade acaricida do óleo essencial de *O. canum* sobre *R. microplus*. Assim como CHAGAS (2002) em seus estudos comprovou a presença do 1,8 Cineol (85,84%) nas partes aéreas de *Eucalyptus globulos* (Eucalipto comum), verificando a baixa eficácia (15%) do óleo essencial de *E. globulos* sobre carrapatos de *R. microplus*. Entretanto JUY HYUNG (2015) avaliando a toxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis L* em insetos da espécie *Trichoplusia ni*, identificou como constituinte majoritário o composto 1,8 Cineol (37,6%) e em menores quantidades α -pineno, canfora e canfeno onde a atividade inseticida do óleo de alecrim parece ser uma consequência do efeito sinérgico da interação entre 1,8-cineol, canfora, e canfeno. Os estudos de APEL (2009), HÜI (2015) e CHAGAS (2002) demonstraram a ineficácia do composto 1,8 Cineol sobre o carrapato *R. microplus*, assim como neste presente estudo óleo essencial de *L. nobilis* cujo componente químico majoritário é o 1,8 Cineol (74,23), também não apresentou nenhuma atividade acaricida sobre *R. microplus*.

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam existência de atividade acaricida *in vitro* do óleo essencial de *I. verum* sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sugerindo o potencial uso desse fitoterápico para o controle do referido parasito. A atividade acaricida pode estar relacionada à presença do trans-anetol (88,32%) na sua composição. Ficou evidenciado que os óleos essenciais de *O. vulgare* e *L. nobilis* não apresentaram efeito acaricida sobre larvas e fêmeas ingurgitadas *R. microplus*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectrometry. **Carol Stream: Allured Publishing Corporation**, 2007.
- ANTHONY, J. P., FYFE, L., SMITH, H. Plant active components a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol.** v. 21, p. 462–468, 2005.
- APEL, M. A.; RIBEIRO, V. L. S.; BORDIGNON, S. A. L.; HENRIQUES, A. T.; POSER, G.V. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitol Res** (2009) 105:863–868.
- CAMPOS, R. N. S., BACCI, L., ARAÚJO, A. P. A., BLANK, A. F., ARRIGONI-BLANK, M. F., SANTOS, G. R. A.; RONE, M. N. B. **Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. Arquivos de Zootecnia. V. 61, p. 67-78. 2012.
- CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. **Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus***. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v.39, n.5, p.247-253,2002.
- CRUZ, E. M. O.; COSTA-JUNIOR, L.M, PINTO, J. A. O., SANTOS, D. A., ARAUJO, S. A., ARRIGONI-BLANK, M. F., BACCI, L., ALVES, P. B., CAVALCANTI, S. C. H., BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology.** v. 195, p. 198– 202, 2013.
- DAVEY, R.B.; AHRENS, E.H. Control of *Boophilus* ticks on heifers with two pyrethroids applied as sprays. **American Journal Veterinary Research**, v.45, n.5, p.1008-10, 1984.
- DRUMMOND, R.O. et al. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.66, n.1, p.130-3, 1973.
- DRUMMOND, R.O. et al. Laboratory tests of insecticides for control of the winter tick. **Journal of Economic Entomology**, v.64, n.3, p.686-8,1971.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA IV-PARTE 1. 5. Ed.São Paulo :Editora Atheneu, 1320p,2010.
- FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tickspecies. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, n. 1-4, p.71-93, 2008.
- FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S. & PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **Controle estratégico do carrapato dos bovinos**. A Hora Veterinária, Porto Alegre, v.27, n.159, p.53-56, 2007.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S. & PRATA, M. C. A. **Controle estratégico do carrapato dos bovinos**. A Hora Veterinária, Porto Alegre, v.23, n.137, p.53-56, 2004.

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

HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; GONG, Y.; CHEN, X.; GUO, Z.; WANG, Q.; JIANG, W. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component *trans*-Anethole. **Molecules** **2010**, 15, 7558-7569.

HÜE.T.; CAUQUIL. L.; FOKOU. J. B. H.; DONGMO.P.M.J et.al. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum* species on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larvae. **Parasitol Res** (2015) 114:91–99.

LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J. **Perspectivas para o controle bovino**. Acta Scientiae Veterinariae, v. 31, 2003.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.;MORAES,J.C. et.al. **Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852)**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.1, p. 22-29, 2014.

MARTINS, J. R. S.; FURLONG, J.; LEITE, R. C. Controle de carrapatos. p. 145-153. In: BARROS BATTESTI, D. M. B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Org.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical**. Um guia ilustrado para a identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. 223p.

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

PEREIRA, J.R.; FAMADAS, K.M. **Avaliação “in vitro” do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (leguminosae, Papilionoidae, Millettiedae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil**. Arquivo do Instituto Biológico, v.71, n.4, p.443-50, 2004.

ROEL, A. R. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável**. *Interações: Revista Internacional de Desenvolvimento Local*. v. 1, p. 43-50, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 1102p.

SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L.***

nobilis) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal.215P.2010.Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,SC.

SOARES, M.C.S.C. **Avaliação comparativa da eficácia de fitoterápicos e produtos químicos carrapaticidas no controle de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) por meio do biocarrapaticidograma.** 2003. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) -Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SOUZA, A. A.; DIAS, N. A. A.; PICCOLI, R. H.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, p.105-112, 2016.

SOUSA, D.P. et al. Avaliação “in vitro” da atividade do extrato de andiroba (*Carapa guianensis*) sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 5., 2005, Recife. **Anais...** Recife, 2005a. 1 CD- ROM.

SOUSA, L.A.D. et. al. Teste de eficácia sobre fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* com compostos e extratos hexânicos de *Melia azedarach*. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG, 2., 2005, Goiânia. **Anais...**Goiânia, 2005b. 1CD-ROM.

TAK, J. H.;JOVEL.E.;ISMÁN,M.B.Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Manag Sci** 2016; 72: 474–480.

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