

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação *in vitro* da Atividade Sinérgica Entre Fipronil, Eugenol e
Carvacrol Frente Larvas, Ninfas e Adultos Não Alimentados de
Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Latreille, 1806)**

Fernando Rocha Miranda

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE FIPRONIL, EUGENOL E CARVACROL FRENTE LARVAS, NINFAS E ADULTOS NÃO ALIMENTADOS DE *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (latreille, 1806)

Fernando Rocha Miranda

Sob a orientação do Professor
Fabio Barbour Scott

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2022

**Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico**

**Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

M672a Miranda, Fernando Rocha, 1990-
 Avaliação in vitro da Atividade Sinérgica Entre
 Fipronil, Eugenol e Carvacrol Frente Larvas, Ninfas e
 Adultos Não Alimentados de *Rhipicephalus sanguineus*
 sensu lato (Latreille, 1806) / Fernando Rocha
 Miranda. - Senhor do Bonfim, 2022.
 56 f.: il.

Orientador: Fabio Barbour Scott.
Coorientadora: Yara Peluso Cid.
Coorientadora: Barbara Rauta de Avelar.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias - PPGCV, 2022.

1. Carrapatos. 2. Teste in vitro. 3. Controle de
ectoparasito. 4. bionsaio. 5. Controle natural. I.
Scott, Fabio Barbour, 1966-, orient. II. Cid, Yara
Peluso, 1982-, coorient. III. de Avelar, Barbara
Rauta, 1987-, coorient. IV Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias - PPGCV. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 595/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.014584/2022-47

Seropédica-RJ, 07 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FERNANDO ROCHA MIRANDA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08/03/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

(Assinado digitalmente em 08/03/2022 15:15)
FABIO BARBOUR SCOTT
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###736#0

(Assinado digitalmente em 09/03/2022 20:22)
YARA PELUSO CID
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matrícula: ###004#7

(Assinado digitalmente em 08/03/2022 10:55)
GUILHERME MARCONDES KLAFFKE
CPF: ####.###.508-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 595, ano: 2022, tipo: ATA, data de emissão: 07/03/2022 e o código de verificação: e3f10d5841

*Ao amor da minha vida e melhor companhia, Isabelle
Aos meus alicerces, Janete e dona Gisélia
Aos meus pequenos Rico, Loren, Granola e Lobinha
Às vidas interrompidas pela Coví*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

Agradeço imensamente à minha mãe, Janete e minha avó, dona Gisélia, sem vocês seria impossível seguir meu sonho e crescer academicamente. Muito obrigado pelo apoio de sempre, jamais serei capaz de retribuir.

Agradeço à Isabelle Vilela Bonfim, minha amada sem a qual não seria possível suportar a pressão e o peso de todo esse período de trabalho. Obrigado pela paciência, cuidado, atenção e incentivo sempre que precisei.

Agradeço ao meu orientador, Professor Fábio Scott, pela oportunidade oferecida desde que cheguei ao laboratório até a realização deste experimento.

Meu Obrigado especial para a professora Thaís Ribeiro Correia Azevedo pela oportunidade oferecida ao me apresentar ao lugar que hoje amo fazer parte, o LQEPV.

Obrigado professora Yara Peluso Cid, pela amizade, orientação e dedicação de sempre, é um exemplo a ser seguido em todos os quesitos, minha maior referência acadêmica.

Obrigado Débora Azevedo Borges, por toda a amizade dentro e fora do laboratório, sua amizade é algo muito especial que levarei para sempre.

Obrigado Bárbara Rauta de Avelar pela paciência e pela parceria de sempre. Hoje minha experiência agradece aos seus ensinamentos práticos no laboratório.

Aos meus amigos e irmãos Rafael Batatinha, Joel Fonsequinha e José Marcos Prando que, apesar da distância, nos mantemos sempre perto numa amizade inabalável. Espero que nos reencontremos em breve.

A Juliana Aragão, minha preciosa amiga que farei questão de carregar para onde eu for, obrigado pela sua amizade, jú.

Obrigado especial aos meus amigos Gabriel Capucho e Guilherme Mota, sempre me apoiaram e ajudaram. Contem comigo para qualquer coisa.

Obrigado Pedro Casanova, grande parte da minha produção criativa vinha após acompanhar suas “lives” repletas de descontração, conhecimento, sensibilidade e uma luz inexplicável.

A minha caminhada seria muito mais difícil se não tivesse ao meu lado todos os companheiros e amigos do LQEPV cujo nomes não me arriscarei a citar, tendo em vista que poderei esquecer alguém pela quantidade enorme de pessoas que fizeram e fazem parte da minha vida. Para todos vocês, meu muito obrigado.

Meus agradecimentos a Alexandra Elbakyan e seu legado para a ciência, permitindo que o conhecimento não seja restrito e sim, universal.

Ao setor de farmacometria do LQEPV e seus membros. Vocês são peças essenciais para toda a produção científica do nosso grupo.

Obrigado professor Raimundo Palheta, João José, Ana Amélia e Durval Baraúna, tudo que sou hoje na área acadêmica, se ampara nos ensinamentos e experiência que tivemos juntos.

Muito obrigado à Fundação de Apoio à Pesquisa (FAPUR – UFRRJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por todo o fomento à educação.

Obrigado a todos que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho!

BIOGRAFIA

Fernando Rocha Miranda, filho de Janete Batista Rocha e Uilson Miranda Souza, nascido no dia 21 de janeiro de 1990, na cidade de Senhor do Bonfim, no estado da Bahia, cursou o ensino fundamental no colégio Educandário Nossa Senhora do Santíssimo Sacramento e ensino médio no colégio Centro Educacional Sagrado Coração.

Ingressou no ensino superior através do ENEM no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Vale do São Francisco, no ano de 2013, o concluindo em 2018. Durante a graduação, atuou como monitor bolsista da disciplina de farmacologia veterinária e monitor voluntário da disciplina de farmacologia animal, para o curso de Zootecnia, sob orientação do professor Dr. Raimundo Campos Palheta.

Em 2019 foi Médico veterinário de Apoio Técnico no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPM – UFRRJ) e ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária (PPGCV) onde trabalhou por dois anos até concluir o seu mestrado.

RESUMO

MIRANDA, Fernando Rocha. **Avaliação *in vitro* da Atividade Sinérgica Entre Fipronil, Eugenol e Carvacrol Frente Larvas, Ninfas e Adultos Não Alimentados de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille, 1806)** 2022. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Os cães deixaram de ser animais de companhia para se tornarem membros do núcleo familiar onde a preocupação com a sanidade e bem-estar destes indivíduos cada vez mais aumenta e atrelado a isso, a farmacologia também é impulsionada na busca de medicamentos cada vez mais eficazes e seguros para controlar infestações. *Rhipicephalus sanguineus* ou carapato marrom dos cães, é um artrópode que possui alta relevância em saúde pública devido a sua alta capacidade de transmissão de doenças, bem como seu potencial irritativo e espoliativo seja na fase de larva, ninfa ou adulta. Atualmente, na maioria dos casos, o seu controle é feito com acaricidas sintéticos como o fipronil na sua grande maioria, porém os produtos naturais têm ganhado cada vez mais espaço não só pela sua eficácia, mas também, pela segurança como é o caso do monoterpeno carvacrol e do fenilpropanóide eugenol. O presente trabalho apresenta duas etapas onde a primeira é a adaptação e padronização de uma técnica de bioensaio para testar compostos acaricidas frente a fase de adulto não alimentado de *R. sanguineus*, que consistiu primeiramente na adaptação e comparação de três técnicas conhecidas para teste contra a fase larval que são Teste de Imersão Larval (TIL), a metodologia de Monteiro et al. (2012) com o pacote de larvas impregnado (PLI) e o Teste do Pacote com Larvas (TPL) que se provou superior quando comparada as outras, apresentando menor valor de CL₅₀ de fipronil, que foi de 1236 µg/mL, contra 5598,8 µg/mL para TIL e 4834,8 µg/mL para PLI, sendo a técnica escolhida para a obtenção das CL₅₀ de fipronil, eugenol e carvacrol utilizadas para a avaliação sinérgica contra todas as fases não alimentadas. Carvacrol e eugenol apresentaram excelente sinergismo farmacológico para todas as fases, inclusive a de adultos, fase esta que apresenta maior resistência quando comparada as fases imaturas. Os valores de coeficiente de sinergismo, não excederam 0,548, comprovando o potencial dessa interação. Em contrapartida, o fipronil apresentou incompatibilidade com eugenol e carvacrol, apresentando antagonismo e diminuição da mortalidade em todas as proporções de concentração utilizadas para ambas as moléculas. Estudos com a fase adulta de *R. sanguineus* são escassos, este trabalho foi o primeiro a desenvolver uma metodologia de teste com carapatos adultos não alimentados e avaliar o sinergismo entre moléculas naturais e sintéticas, abrindo portas para futuros experimentos com o intuito de inserir cada vez mais componentes botânicos para o combate de ectoparasitos.

Palavras-chave: Carapatos, Teste *in vitro*, Controle Natural

ABSTRACT

MIRANDA, Fernando Rocha. ***In vitro Evaluation of Synergistic Activity Between Fipronil, Eugenol and Carvacrol Front Larvae, Nymphs and Non-Fed Adults of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Latreille, 1806)*** 2022. 54p. Dissertation (Master's in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Dogs are no longer companion animals to become members of the family where the concern for the health and well-being of these individuals increases and linked to this, pharmacology is also driven in the search for increasingly effective medicines and insurance to control infestations. *Rhipicephalus sanguineus* or brown dog tick, is an arthropod that has high public health relevance due to its high capacity for disease transmission, as well as its irritating and despoiling potential, whether in the larval, nymph or adult phase. Currently, in most cases, its control is done with synthetic acaricides such as fipronil in its vast majority, but natural products have gained more and more space not only for their effectiveness, but also for safety as is the case with monoterpenes carvacrol and the phenylpropanoid eugenol. The present work presents two steps where the first is the adaptation and standardization of a bioassay technique to test acaricide compounds against the non-fed adult stage of *R. sanguineus*, which consisted primarily in the adaptation and comparison of three known techniques for testing against the larval stage which are Larval Immersion Test (TIL), the methodology of Monteiro et al. (2012) with the impregnated package of larvae (PLI) and the Test of Package with Larvae (TPL) which proved to be superior when compared to the others, presenting a lower value of fipronil LC50, which was 1236 µg/mL, against 5598, 8 µg/mL for TIL and 4834.8 µg/mL for PLI, being the technique chosen to obtain the LC50 of fipronil, eugenol and carvacrol used for the synergistic evaluation against all unfed phases. Carvacrol and eugenol showed excellent pharmacological synergism for all stages, including adults, which stage has greater resistance when compared to immature stages. The synergism coefficient values did not exceed 0.548, proving the potential of this interaction. On the other hand, fipronil showed incompatibility with eugenol and carvacrol, showing antagonism and decreased mortality in all concentration ratios used for both molecules. Studies with the adult stage of *R. sanguineus* are scarce, this work was the first to develop a test methodology with unfed adult ticks and to evaluate the synergism between natural and synthetic molecules, opening doors for future experiments in order to insert each time more botanical components to combat ectoparasites.

Key words: Ticks, In vitro test, Natural Control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	4
Figura 2. Ciclo evolutivo do carrapato ixodídeo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . (A): Fases no hospedeiro antes de se soltarem e caírem ao ambiente. (B): Fêmea ingurgitada realizando postura em abrigo. (C): Ecdise (D) Eclosão.	5
Figura 3. Representação artística do carrapato adulto macho <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , evidenciando estruturas anatômicas que permitem a identificação do espécime.	6
Figura 4. Fases do ciclo evolutivo do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . (A): larva (3 pares de patas). (B): ninfa (4 pares de patas). (C): espécimes adultos C1: fêmea e C2: macho. (D): fêmea ingurgitada realizando postura com massa postural evidente em D1.	6
Figura 5. Estrutura química do fipronil.	12
Figura 6. Estrutura química do 4-Allyl-2-methoxyphenol (eugenol).	15
Figura 7. Estrutura química do carvacrol 5-Isopropyl-2-methylphenol 499-75-2Isopropyl-o-cresolo Thymol.	15
Figura 8. Microtubo contendo cinco casais de adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e 1 mL de solução FIP 300 µg/mL (A). TIL em execução com microtubos em processo de homogeneização (B).	18
Figura 9. Envelope de papel filtro contendo carrapatos (A). Envelopes dispostos em BOD. (B).	19
Figura 10. Papéis filtro de 7,5 x 8,5cm sendo impregnados com soluções contendo FIP, aguardando secagem do diluente tricloroetileno para a confecção dos envelopes.	20
Figura 11. Pacote contendo cinco casais de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> não alimentados, sendo impregnado com solução de FIP, seguindo a técnica de avaliação proposta por De Monteiro et al. (2012) adaptada (PLI).	20
Figura 12. Gráfico de linearidade para a técnica TPL. (observar precisão no alinhamento das avaliações e inclinação da reta.	22
Figura 13. Gráfico de linearidade para a técnica TIL.	23
Figura 14. Gráfico de linearidade para a técnica PLI.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de média de mortalidade, desvio padrão e coeficiente de variação frente à carapatos adultos não alimentados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> expostos a FIP em TIL, TPL e PLI.....	22
Tabela 2. CL ₅₀ e CL ₉₀ obtidas através das técnicas TIL, TPL e PLI, frente à carapatos adultos não alimentados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> expostos a FIP.....	24
Tabela 3. Faixas de concentração e mortalidade respectivas utilizadas para FIP, EUG e CAR na técnica de TPL com larvas, ninfas e adultos não alimentados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	25
Tabela 4. CL ₅₀ dos compostos fipronil, carvacrol e eugenol (FIP, CAR e EUG) para larvas, ninfas e adultos não alimentados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	26
Tabela 5. Associação entre fipronil (FIP) e eugenol (EUG) frente a larvas não alimentadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	27
Tabela 6. Associação entre fipronil (FIP) e carvacrol (CAR) frente a larvas não alimentadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	27
Tabela 7. Associação entre eugenol (EUG) e carvacrol (CAR) frente a larvas, ninfas e adultos não alimentados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	28

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ACH – Acetylcolina
AChE – Acetylcolinesterase
AHJ – Análogo do Hormônio Juvenil
BOD. – Estufa com demanda bioquímica de oxigênio
CAR – Carvacrol
CE – Concentrado emulsionável
CEUA – Comissão de Ética na Utilização de Animais
CL₅₀ – Concentração letal de um composto que acarreta a morte de 50% de um grupo exposto
CL₉₀ – Concentração letal de um composto que acarreta a morte de 90% de um grupo exposto
CS – Coeficiente de sinergismo
DAPE – Dermatite Alérgica A Picada De Ectoparasitos
EUG – Eugenol
FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA – Food and Drug Administration
FIP – Fipronil
GABA – Ácido gama-aminobutírico
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGR – Regulador de Crescimento de Insetos
ISQ – Inibidor da Síntese de Quitina
TIL – Larval immersion test
TPL – Teste do Pacote com Larvas
LQEPM – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
PLI – Teste do Pacote com Larvas Impregnado,adaptado por De Monteiro et al. (2012)
OE – Óleo Essencial
OMS – Organização Mundial de Saúde
RPM – Rotações por minuto
UR – Umidade Relativa (%)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Importância Médico Veterinária	2
2.2 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3
2.3 Controle de infestações por <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	7
2.4 Controle Químico: Apanhado de Alternativas Terapêuticas Disponíveis Para o Controle de Infestações por Carrapatos em Animais de Companhia e Suas Propriedades Farmacológicas	7
2.4.1 Piretrinas e piretróides	8
2.4.2 Inibidores da acetilcolinesterase	8
2.4.3 Formamidinas	9
2.4.4 Semicarbazona	9
2.4.5 Lactonas macrocíclicas	10
2.4.6 Neonicotinóides	10
2.4.7 Spinosinas	11
2.4.8 Fenilpirazóis	11
2.4.9 Fármacos inibidores de crescimento (IGR)	12
2.4.10 Isoxazolinas	13
2.5 Controle de Carrapatos com Produtos Naturais	13
2.6 Óleos Essenciais	13
2.7 Eugenol	14
2.8 Carvacrol	15
2.9 Sinergismo e Antagonismo Farmacológico: Desafios Para a Assimilação de Fármacos Antiparasitários	16
2.10 Bioensaios <i>in vitro</i>	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Origem dos Carrapatos do Experimento	17
3.2 Obtenção dos Reagentes	17
3.3 Padronização do Bioensaio <i>in vitro</i>	17
3.4 Teste de Imersão Larval (TIL)	18
3.5 Teste do Pacote Larval (TPL)	19
3.6 Pacote Larval Impregnado (PLI)	20
3.7 Análise Estatística, Cálculo das Concentrações Letais CL₅₀ e CL₉₀ e Avaliação do Sinergismo	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Avaliação da atividade do Fipronil (FIP) Frente à Carrapatos Adultos Não Alimentados de <i>R. sanguineus</i> e Validação do Bioensaio <i>in vitro</i>	21
4.2 Determinação da CL₅₀ de Fipronil, Eugenol e Carvacrol (FIP, CAR e EUG) Para Larvas, Ninfas e Adultos de <i>R. sanguineus</i> Não Alimentados	25
5 CONCLUSÃO	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

A evolução das sociedades humanas e a domesticação de cães, foram acontecimentos que se desenvolveram em paralelo. Os primeiros indícios da utilização de cães para a caça, datam de 10.000 anos atrás, dados descobertos com análises de padrão de variação genômica demonstram que o comportamento inicial desta domesticação é original da região sul da Ásia ocidental (AXELSSON, et al. 2013). Com o passar do tempo, a importância dos animais domésticos aumentou junto ao homem, de modo que cães, antes mais explorados nas atividades de caça e controle de pragas peridomiciliares, passaram a ser considerados como um componente da família, sendo inseridos no núcleo familiar como um filho na maioria dos domicílios (ALVES, et al. 2015). Junto a este maior interesse em animais de companhia, tem aumentado também os cuidados e a exigência dos seus tutores quanto à saúde, fato que influencia diretamente não só a medicina, mas também toda a indústria farmacêutica veterinária a investir em pesquisas para o desenvolvimento de produtos com maior qualidade para o tratamento e prevenção de doenças, inclusive aquelas causadas por ectoparasitos como pulgas e carapatos que, segundo Bauer et al. (2015), são agentes transmissores das principais enfermidades infecciosas que acometem cães e gatos no mundo.

O carapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae), mais conhecido popularmente como “o carapato marrom canino”, é uma espécie cosmopolita de maior incidência em regiões de clima tropical. A espécie de predileção para este carapato é o cão, sendo, além de um problema direto pelo parasitismo e espoliação, o carapato *R. sanguineus* também se mostra um importante vetor de patógenos como *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis*, *Erlichia canis* e *Hepatozoon canis*.

O uso de acaricidas sintéticos para o controle de infestações é bastante difundido dentre os tratamentos, sendo a maioria das alternativas de combate. Dentre esses medicamentos está o fipronil, uma molécula do grupo dos fenilpirazóis, que é utilizado para o controle de pragas na agricultura e ectoparasitos em cães, gatos e bovinos, apresentando eficácia elevada, porém também apresenta os problemas relacionados ao uso de antiparasitários que vão de toxicidade acentuada e deposição residual ambiental.

É comum portanto, o uso indiscriminado, diluições e aplicações equivocadas sem o acompanhamento médico veterinário, causando uma maior pressão de seleção genética, produzindo cepas resistentes às moléculas no mercado. Outro sério problema com relação ao uso indiscriminado, é a deposição residual ambiental, causando efeitos tóxicos em humanos e animais (MARTINS, et al. 2006). Atrelado a esta problemática, há um constante aumento na busca por alternativas naturais e tecnologias mais seguras, fato este que há mais de 20 anos, segundo Taylor et al. (2001), vem alavancando os estudos em torno do desenvolvimento de produtos de origem natural com pesquisas voltadas para plantas que produzem moléculas específicas com atividades farmacológicas contra parasitos, o que pode ser comprovado com as recentes pesquisas em torno de óleos essenciais (OE) para o controle de ectoparasitos tanto como parasiticidas, quanto como repelentes (ELLSE; WALL, 2014, BENELLI; PAVELLA, 2018).

É de suma importância a inserção de produtos de origem natural para o controle de ectoparasitidas por isso, faz-se então necessário o desenvolvimento de novos métodos para o controle de ectoparasitos que visem causar menos impactos negativos, como o emprego do uso de OE e outros compostos naturais combinados com agentes parasiticidas artificiais, neste caso, buscando aumentar a segurança, manter a eficácia e diminuir o uso de fármacos sintéticos bem como os seus resíduos ambientais (TAYLOR, 2001; BENELLI; PAVELLA, 2018).

O produto natural, obtido a partir de uma planta, ou parte desta, sob a forma de um extrato ou OE, apresenta em sua composição uma mistura complexa de componentes majoritários ou minoritários onde alguns destes compostos podem apresentar atividade contra artrópodes, como é o caso do OE do *Syzygium aromaticum*, conhecido como cravo-da-índia, rico em eugenol, um fenilpropanóide, e o OE do *Origanum vulgare*, o popular orégano, que possui carvacrol como componente majoritário, que é um monoterpeno que assim como o eugenol, possui extensa ação contra pulgas e carrapatos (LAMBERT et al., 2020; CONCEIÇÃO et al., 2020; ELLSE; WALL, 2014). Sabendo então que a atividade farmacológica inseticida ou acaricida pode estar atrelada a um componente isolado do OE de plantas, é vantajoso o estudo em torno desta atividade sinérgica entre os ativos, na constante busca por eficácia e segurança terapêutica contra pulgas e carrapatos.

O ciclo do *R. sanguineus*, compreende 3 fases pós ecdise a qual o carrapato é classificado como “não alimentado”, que são as larvas, ninfas e adultos não alimentados. A maioria dos estudos e experimentos estão relacionados com as fases de larva e ninfas, não existindo uma técnica descrita para teste com a fase de adultos não alimentados *in vitro*, onde o carrapato apresenta elevada resistência, quando comparado as formas imaturas.

Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivos desenvolver uma técnica de bioensaio *in vitro* para o teste de moléculas acaricidas contra a fase de adulto não alimentado e efetuar a avaliação da atividade sinérgica *in vitro* entre o fenilpropanóide eugenol, do monoterpeno carvacrol e do fenilpirazol, fipronil, frente ao carrapato *R. sanguineus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância Médico Veterinária

O filo Arthropoda engloba mais espécies de seres vivos, que todos os outros animais juntos no planeta terra, com milhões de espécies descritas, dentre elas todos os ectoparasitos como, ácaros, moscas e insetos hematófagos (WALL; SHEARER, 1997).

Com o crescente interesse dos núcleos familiares pelos animais de companhia, fator demonstrado não apenas pelo faturamento anual do varejo pet, que cresceu mundialmente 11% em 2020, de acordo com o Instituto Pet Brasil, mas também pelo notório aumento de domicílios que possuem cães ou gatos que, no ano de 2019, alcançaram a marca de 48 milhões no Brasil, de acordo com pesquisa divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), é clara a importância deste setor para a economia mundial e a susceptibilidade dos animais domésticos à infestações por carrapatos demandam cada vez mais esforços para o desenvolvimento de medicamentos com máximo potencial ectoparasiticida e menor atividade tóxica (DANTAS-TORRES et al., 2012).

Os carrapatos são, segundo Dantas-Torres et al. (2012), os primeiros artrópodes relatados como vetores de doenças estão diretamente relacionados com problemas de saúde tanto em humanos quanto em animais. Os exemplares da espécie *R. sanguineus*, por serem unicamente hematófagos em todas às fases do seu ciclo de vida, são responsáveis por severas infestações em cães que podem causar irritação, dermatites, anemias espoliativas e lesões de pele que servem de porta de entrada para infecções secundárias e miases. Além disto, carrapatos desta espécie são frequentemente relatados como transmissores de *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis*, *Erlichia canis* e *Hepatozoon canis*, bactérias e protozoários que são capazes de causar danos severos à

saúde do animal acometido, podendo ocasionar até a morte. (DANTAS-TORRES et al., 2008; ALVES, et al. 2017; NICHOLSON, et al. 2019).

Os carapatos, são ectoparasitos com elevado poder de infestação, podendo causar prejuízos à saúde do hospedeiro diretamente pela dor local e prurido intenso, a até processos sistêmicos como anafilaxia e prejuízos indiretos, pela transmissão de patógenos, além de servirem como porta de acesso para infecções secundárias e miases. Tendo em vista toda essa problemática, o tratamento para a eliminação destes artrópodes é imprescindível para a manutenção da saúde de humanos e animais, para isso, fazem-se uso de medicamentos denominados ectoparasiticidas que, além de terapêuticos, podem ser utilizados como profiláticos a depender da apresentação farmacológica e mecanismos de ação (MARCHIONDO et al., 2013).

2.2 *Rhipicephalus sanguineus*

Descrito originalmente por Latreille, (1806), o carapato *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*, também conhecido como carapato marrom dos cães, é a espécie mais importante do complexo *R. sanguineus*, pela sua ampla distribuição geográfica bem como os danos em potencial que pode causar com seu parasitismo, complexo este que inclui também outras espécies como: *Rhipicephalus aurantiacus*, *Rhipicephalus bergeoni*, *Rhipicephalus boueti*, *Rhipicephalus camicase*, *Rhipicephalus guilhomi*, *Rhipicephalus leporis*, *Rhipicephalus moucheti*, *Rhipicephalus pumilio*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus ramachandrai*, *Rhipicephalus rossicu*, *Rhipicephalus schulzei*, *Rhipicephalus sulcatus*, *Rhipicephalus tetracornus*, *Rhipicephalus turanicus*, e *Rhipicephalus ziemannii* (CASICAS et al. 1998; NAVA et al. 2015).

Como constituintes do filo Arthropoda, são seres hematófagos obrigatórios, ou seja, são ectoparasitos que obtém nutrientes para a realização das suas atividades biológicas, através unicamente do sangue do hospedeiro como alimento e apresentam significativo interesse médico veterinário, tanto pela sua capacidade de causar danos diretos ao seu hospedeiro, sejam eles homens ou animais, quanto pelo fato de transmitirem diferentes patógenos como bactérias e protozoários. (KRANTZ & WALTER, 2009; JONGEJAN & UILENBERG, 2004; DANTAS-TORRES, 2007). O grupo *Rhipicephalus sanguineus*, composto por 17 espécies morfologicamente semelhantes, está inserido no gênero taxonômico *Rhipicephalus*, grupo este que abrange os carapatos pertencentes à ordem Ixodida, com mais de 80 espécies, incluindo *Rhipicephalus microplus* (SANCHES, 2013).

R. sanguineus tem grande potencial de adaptação aos mais diferenciados climas, o que o torna cosmopolita, com distribuição homogênea, sendo relatado na América, África, Ásia, Europa e Oceania (Figura 1). Além do seu elevado grau de adaptabilidade, o carapato em questão, apesar da predileção por parasitar cães, possui habilidade em parasitar outras espécies de mamíferos, inclusive humanos que, diferente de outros carapatos, não apresenta dor à picada, ficando indetectável por algumas horas até a fixação completa, aumentando ainda mais sua eficiência parasitária, o tornando um problema direto e indireto (PAROLA & RAOULT, 2001).

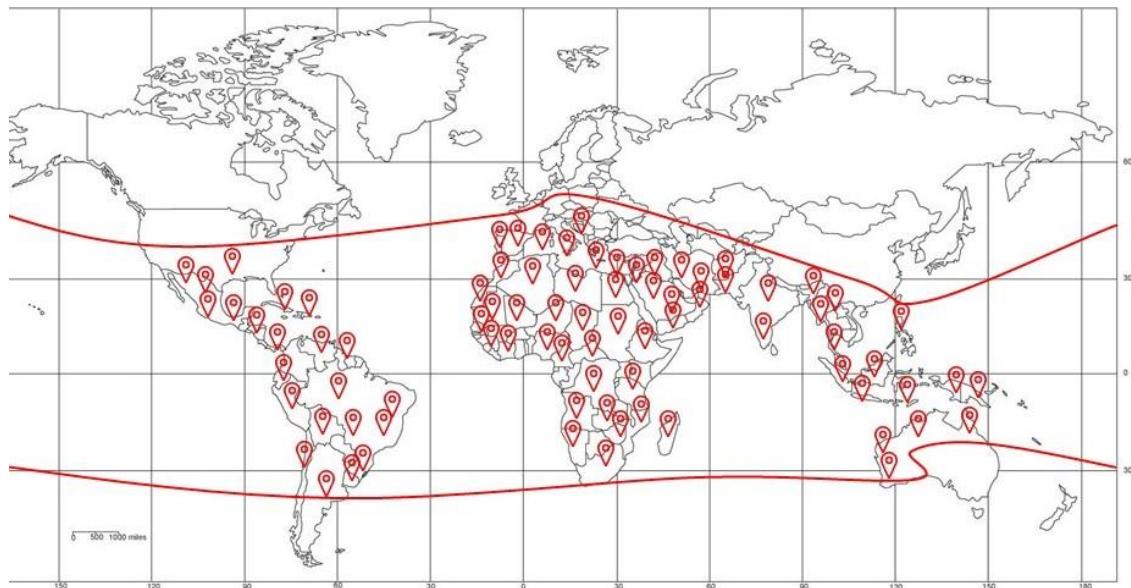


Figura 1. Distribuição global do carapato *Rhipicephalus sanguineus*. Fonte: Aguiar et al. (2013)

Os carapatos são seres que desenvolveram uma vasta gama de ciclos evolutivos, visando o aumento do desempenho da sua reprodução e alimentação, de acordo com as espécies-alvo, sempre respeitando o ambiente ao qual são endêmicos. De acordo com a quantidade de hospedeiros, que podem variar em até três, os carapatos podem ser classificados como monoxenos, ou seja, todas as fases do ciclo evolutivo são alcançadas no mesmo hospedeiro, ou trioxenos, quando larvas, ninfas e a fase adulta, vivem em hospedeiros distintos, realizando a ecdise no ambiente e retornando para se alimentar novamente de outro vertebrado (GUIMARAES et al., 2001).

Os carapatos *R. sanguineus*, possuem um ciclo de vida complexo, por serem ectoparasitos obrigatórios ao passo de também exercerem etapas de vida livre, longe do hospedeiro para que possam realizar a ecdise e ovoposição (BRITO et al., 2006). Diferentemente de outras espécies que não recorrem ao ambiente para a realização da muda, os *R. sanguineus* estão mais sujeitos a intempéries ambientais como temperatura e umidade, incidência solar e chuvas, fatores que os forçam a possuírem o hábito nidícola que segundo Sonenshine (1993) e Labruna (2004) conferem maior potencial de parasitismo aos carapatos pois estes se abrigam nos ambientes de estadia dos seus hospedeiros, dificultando ainda mais o controle de infestações.

Os carapatos da espécie *R. sanguineus* apresentam um ciclo evolutivo que envolve três hospedeiros com quatro estágios que são ovos, larvas, ninfas e adultos. Após a cópula e fertilização, que ocorrem preferencialmente em um animal vertebrado, as fêmeas se alimentam até a completa ingurgitação, atividade hematófaga que perdura por 14 dias. Posteriormente, se desprendem e seguem em direção ao solo para a realização da postura, que acontece em refúgios, sempre seguros e longe do pisoteio e captura dos animais predadores, podendo ser em frestas, fendas, telhado e buracos. Cada fêmea elimina uma massa postural com, em média 4.000 ovos, que eclodirão dando sequência ao ciclo. A depender da temperatura e umidade do ambiente, a eclosão pode demorar de 17 a 30 dias, liberando larvas hexápodes que sobem no hospedeiro e iniciam sua fase de alimentação com duração aproximada de 6 dias. Após a ingurgitação, as larvas caem ao solo, se refugiam para a realização da ecdise, que perdura por em torno de 5 a 23 dias, se transformando em ninfas octópodes. Assim como as larvas, as ninfas retornam a um hospedeiro e iniciam a sua alimentação que perdura de 4 a 9 dias para mais uma vez

desprender-se ao solo, realizar ecdise para o carrapato adulto (TAYLOR et al. 2017). A Figura 2 esquematiza como ocorre o ciclo evolutivo em um carrapato ixodídeo.

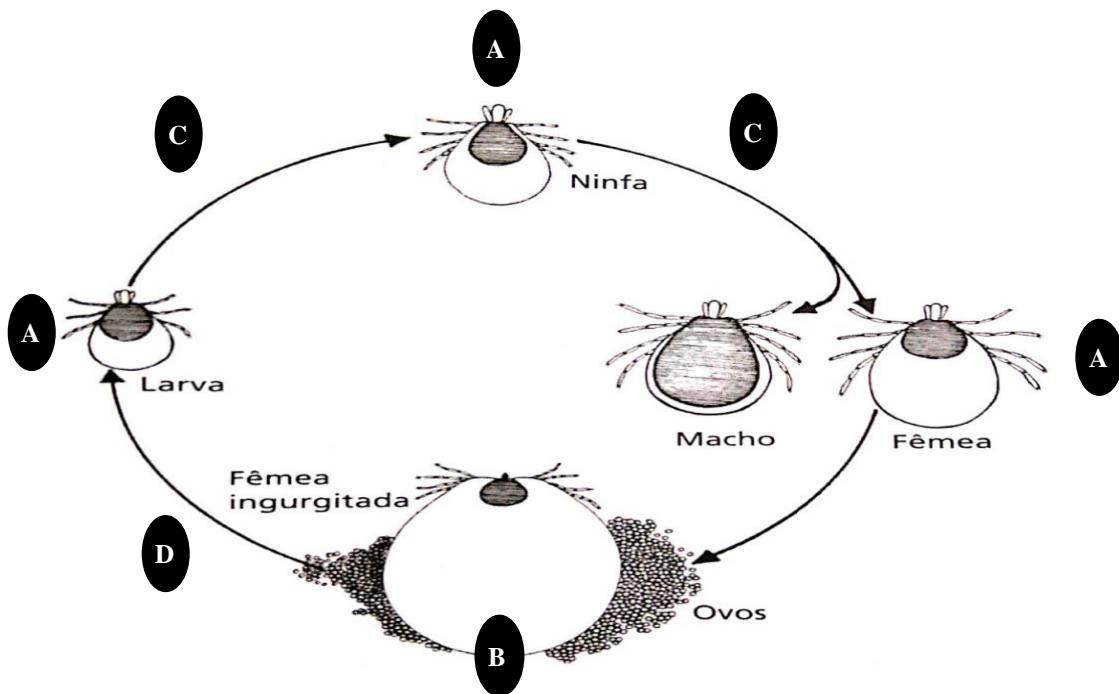


Figura 2. Ciclo evolutivo do carrapato ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*. (A): Fases no hospedeiro antes de se soltarem e caírem ao ambiente. (B): Fêmea ingurgitada realizando postura em abrigo. (C): Ecdise (D) Eclosão. Fonte: Ahid (2008)

A família taxonômica Ixodidae, a qual se inserem carrapatos da espécie *R. sanguineus*, comprehende os “carrapatos duros”, pela presença de um escudo rígido e quitinoso não ornamentado que cobre toda a superfície dorsal do macho adulto enquanto em fêmeas, larvas e ninfas, ele se estende apenas por uma pequena área que permite a expansão abdominal pós alimentação. (WALKER et al., 2000).

Os exemplares desta espécie possuem os palpos curtos e a base do capítulo tem a apresentação hexagonal, presença de olhos, festões, corpo pequeno e alongado, quando comparado às outras espécies da mesma família, bem como o escudo não ornamentado. Outras particularidades como a presença de coxas bifurcadas e a placa espiracular em formato de vírgula, são características marcantes do *R. sanguineus* (WALKER et al., 2000). Nas Figuras 3 e 4, estão esquematizadas estas características morfológicas e a forma como se apresentam no espécime bem como imagens do carrapato em todas as suas fases do ciclo evolutivo respectivamente.

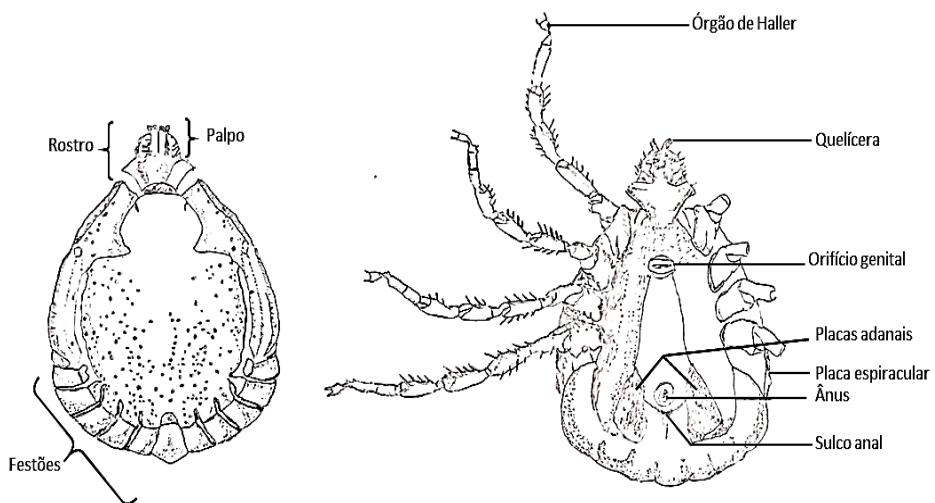


Figura 3. Representação artística do carapato adulto macho *Rhipicephalus sanguineus*, evidenciando estruturas anatômicas que permitem a identificação do espécime (Adaptado de Wall & Shearer, 2001).

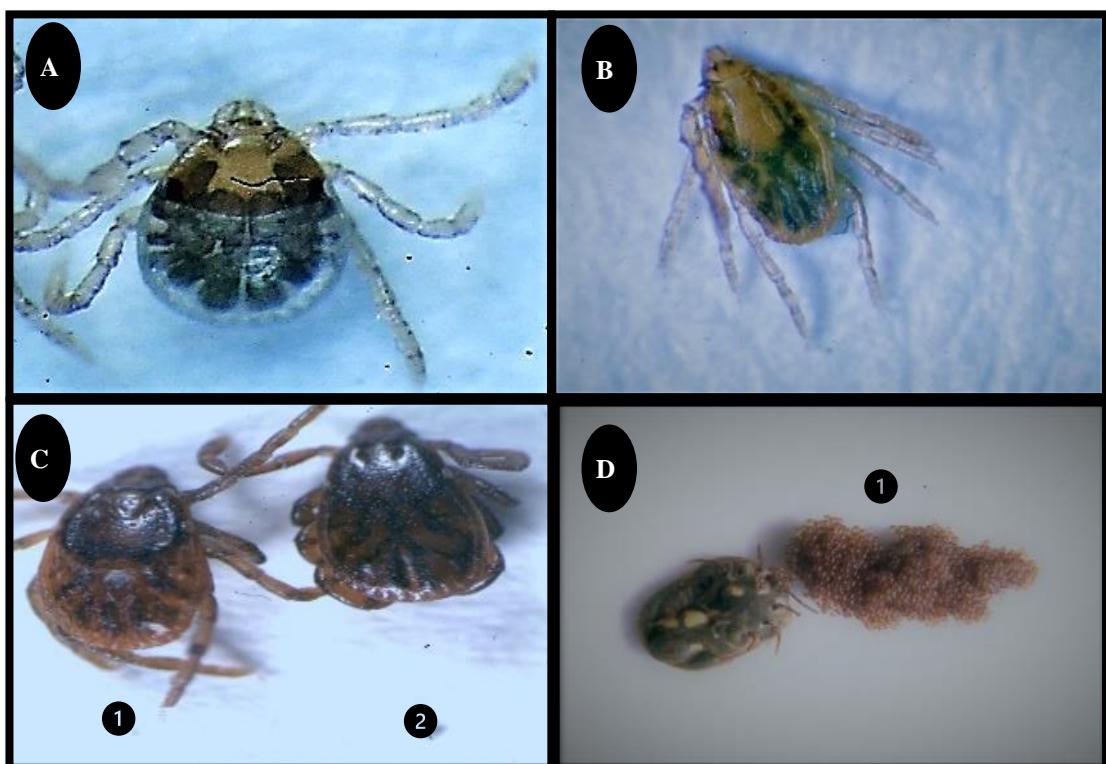


Figura 4. Fases do ciclo evolutivo do *Rhipicephalus sanguineus*. (A): larva (3 pares de patas). (B): ninfa (4 pares de patas). (C): espécimes adultos C1: fêmea e C2: macho. (D): fêmea ingurgitada realizando postura com massa postural evidente em D1 (Fonte: arquivo pessoal).

Apesar da preferência por cães, o *R. sanguineus* nas suas fases imaturas, não apresenta tanta especificidade parasitária, podendo ser encontrados infestando outras espécies de animais, como deixa claro Dantas-Torres et al. (2008), que relata parasitismo em espécies de pequeno porte como ratos, por larvas e ninfas, bem como Ortúñio et al. (2018) que relatam infestações em canídeos silvestres como raposas vermelhas.

Quanto ao modo de alimentação e o tempo que levam para realizarem, varia de acordo com o estágio evolutivo do carapato. As larvas são as que permanecem menos tempo se alimentando, em torno de dois dias. As fêmeas demandam um período muito maior para ficarem completamente ingurgitadas que varia de acordo com a temperatura, umidade e hospedeiro. Sabe-se que esse tempo pode aumentar também de acordo com a espécie do hospedeiro como no caso do maior tempo de alimentação e ingurgitação de fêmeas que parasitam coelhos quando comparadas ao parisitismo em cães (DANTAS-TORRES et al., 2004; PAZ et al., 2008).

2.3 Controle de infestações por *Rhipicephalus sanguineus*

Um recente estudo revelou que nos Estados Unidos, a maioria dos tutores de cães, mesmo com recomendações veterinárias para o controle eficaz de pulgas e carapatos, não seguem o protocolo profissional, o que pode causar problemas relacionados ao controle ineficaz, culminando numa maior pressão de seleção ao parasito, aumentando a resistência ao escopo de moléculas pulgicidas e acaricidas do mercado (LAVAN et al., 2017).

Infestações por pulgas e carapatos são um problema e necessitam de controle para a saúde e o bem-estar de cães, gatos e tutores com ações que visem a maior eficácia com a menor quantidade de produtos químicos possíveis, fazendo uso de medidas químicas, físicas e naturais pois o controle de ectoparasitos hoje é majoritariamente feito com o uso de acaricidas sintéticos, o que, através do uso indiscriminado, diluições e aplicações equivocadas, vem resultando numa maior geração de cepas resistentes, e produzindo resíduos para o meio ambiente, o que pode causar efeitos tóxicos em homens e animais (DRYDEN et al., 1989; MARTINS, et al. 2006).

Outro ponto importante para o sucesso no tratamento, é o conhecimento da espécie e do ciclo dos parasitos alvo, sempre levando em consideração a etapa não parasitária que é onde os espécimes se encontram fora do hospedeiro com cerca de 95% da infestação se encontrando no ambiente. Os carapatos *R. sanguineus*, além de serem mais resistentes que as pulgas, por exemplo, apresentam um ciclo do tipo heteroxeno, onde se desprendem do hospedeiro para realizar a muda no ambiente, trazendo um maior desafio no controle de infestações por estarem mais presentes no ambiente (DANTAS-TORRES et al., 2012; RUST, 2017).

2.4 Controle Químico: Apanhado de Alternativas Terapêuticas Disponíveis Para o Controle de Infestações por Carapatos em Animais de Companhia e suas Propriedades Farmacológicas

O controle químico é a alternativa mais comum e mais utilizada para o controle de populações de artrópodes e é feito com o uso de substâncias com o fim da eliminação de infestações, utilizando substâncias naturais, sintéticas ou semissintéticas, podendo atuar no parasito de maneira sistêmica, pela absorção direta da molécula ectoparasiticida, ou de maneira tópica, pelo contato direto causando irritação ou desnaturação de componentes vitais essenciais (CORREIA et al., 2007; TAYLOR et al., 2001).

Cada medicamento possui um determinado modo de ação e atividade residual que se adequa a cada situação e o emprego correto destes é fator responsável por grande parte

do sucesso do tratamento, devendo ser levado em consideração as condições ambientais em que os animais são submetidos, assim como o tamanho, peso, pelagem, forma de administração e o histórico de resistência daquela determinada população de insetos, identificando o uso de fármacos anteriormente (DRYDEN, 2009).

Dentre as principais classes de substâncias disponíveis para o controle químico de infestações por ectoparasitos, destacam-se piretrinas e piretróides, os fármacos inibidores da acetilcolinesterase (carbamatos e organofosforados), formamidinas, semicarbazona, lactonas macrocíclicas, neonicotinóides, spinozinás, fenilpirazóis, fármacos inibidores de crescimento e as isoxazolinás.

2.4.1 Piretrinas e piretróides

As piretrinas e os piretróides naturais, são moléculas descobertas de plantas há mais de 100 anos e tem sido utilizada na medicina veterinária desde o ano de 1950 com a produção sintética desta molécula, para o controle de infestações por artrópodes em animais de companhia. Piretrinas são moléculas naturais derivadas da planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*, o popular crisântemo, e apresentam toxicidade em torno de 2000 vezes mais elevada para insetos que para animais vertebrados, devido à maior susceptibilidade dos canais para sódio destes parasitos, bem como sua menor complexidade fisiológica. São inseridos no grupo número 4 de inseticidas, de acordo com a OMS que é composto por 42 moléculas. (BÄUMER et al., 2021; CHRUSTEK et al., 2018; GORMAN, 2016).

As piretrinas são compostas por 6 substâncias diferentes que são: piretrinas I, piretrinas II, cinerinas I, cinerinas II e as jasmolinas I e II. Estas substâncias são altamente reativas à luz, sofrendo inativação, perdendo sua atividade contra artrópodes. Frente a isso, foi desenvolvido a partir das permetrinas, os piretróides, análogos sintéticos, estáveis e seguros para o uso tanto no hospedeiro, quanto no ambiente (ANADÓN et al., 2009; ELLIOTT et al., 1978).

O seu modo de ação está relacionado com a indução da abertura de canais para sódio e manutenção do prolongamento da despolarização de neurônios, causando despolarizações exacerbadas, matando o parasito por hiperexcitabilidade. Além desta atividade, é bem conhecido também que os piretróides possuem atividade em canais para cloro, inclusive, GABA dependentes. A principal característica desta molécula é sua alta lipofilicidade que faz com que a penetração na cutícula dos insetos seja facilitada, aumentando ainda mais a eficácia. (SCHRECK et al., 1978; CHRUSTEK et al., 2018).

Atualmente, os principais fármacos desta classe de moléculas, são a permetrina e a flumetrina que inclusive são utilizados em associação com outras classes e apresentam eficácia contra carrapatos em cães (DANTAS-TORRES et al., 2013; MCCALL et al., 2004).

2.4.2 Inibidores da acetilcolinesterase

Pertencentes a esta classe, estão os compostos organofosforados e carbamatos. Os organofosforados são fármacos que atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE) irreversivelmente, enzima esta, que é responsável pela hidrólise e controle dos níveis de acetilcolina no sistema nervoso central e fenda sináptica, aumentando a atividade do sistema nervoso autossômico parassimpático, matando assim o parasito por paralisia flácida (MARTÍN et al., 2017; MASON et al., 1984).

Os carbamatos também interferem na atividade da enzima AChE, porém, com uma interação química não tão estável e menos potente, causando uma inibição reversível. Em casos de intoxicação por carbamato, por exemplo, existem antagonistas como as

oximas que conseguem competir pelo sítio enzimático e diminuir a atividade tóxica, o que não é possível com intoxicações por organofosforados. (MARTÍN et al., 2017; VITAL, 2015).

O diazinon é um organofosforado presente no mercado com indicação para o uso de controle de ectoparasitos em cães e gatos, porém, existem moléculas atuais e mais seguras, que são melhores e mais eficientes para tal fim. Outros organofosforados que se somam ao diazinon e podem ser encontrados no mercado brasileiro são o clorpirifós, diclorvós, coumafós, fention e triclorfon (FRANC; CADIERGUES, 1998; DRYDEN, 2009).

Como representante dos carbamatos, existem no mercado o propoxur e o carbaril, encontrados nas apresentações tópicas em coleiras para cães com eficácia contra pulgas e carrapatos (WITCHEY-LAKSHMANAN, 1999).

2.4.3 Formamidinas

Esta classe de medicamentos contra ectoparasitos, é amplamente usada, com relatos desde a década de 90. Apesar de não ser tão seguro, o amitraz, principal integrante desta classe, ainda é empregado para o controle de carrapatos em bovinos, além de ser utilizado também para tratamento do ambiente para eliminar formas imaturas de ectoparasitos de cães e gatos. (TAYLOR et al., 2001)

Quando se compara com os novos fármacos, fica clara essa falta de segurança, principalmente pelo fato do amitraz atuar em sítios que existem nos mamíferos. São dois principais mecanismos de ação que fazer do amitraz um fármaco que demanda cuidado na administração, o primeiro é atuar como agonista em receptores de octopamina, em artrópodes, causando hiperexcitação e despolarizações errôneas, matando por paralisia, e o segundo é pela atuação como agonista em receptores do tipo α_2 adrenérgico, que, por estar acoplado a uma proteína inibidora da adenilatociclase (pGi), atua diminuindo a liberação de catecolaminas na fenda sináptica, exacerbando a resposta inibitória do sistema nervoso autossômico simpático, mecanismo esse responsável por intoxicações em vertebrados. (TAYLOR et al., 2001)

O amitraz, apesar de ter um potencial tóxico, é um excelente fármaco para estar associado pois, além de promover sinergismo com outras moléculas, ele é capaz de apresentar repelência, principalmente para carrapatos já fixados, os derrubando (REF). Existem apresentações em coleiras, associado com fipronil e metoprene com excelente atividade contra infestações de pulgas e carrapatos (ELFASSY et al., 2001; HORAK et al., 2012)

2.4.4 Semicarbazona

Esta classe, descoberta há aproximadamente 50 anos com o fármaco metaflumizona, tem excelente atividade contra pulgas e outros insetos, principalmente cepas que apresentam resistência a outras classes de ectoparasiticidas como imidaclorprid, inibidores da AChE, e lactonas macrocíclicas. Seu principal representante é o fármaco metaflumizona, que é relatado como bastante eficaz contra pulgas e, quando associado com outras moléculas, apresenta também eficácia contra carrapatos *R. sanguineus*, como no caso da associação metaflumizona e amitraz, comprovando o sinergismo farmacológico (SALGADO; HAYASHI, 2007; HELLMANN et al., 2007).

O modo de ação é sugerido por Salgado e Hayashi (2007) que em experimentos comprovaram intensa atividade de bloqueio de canais para sódio, impedindo

despolarizações celulares, consequentemente, transmissão de impulsos nervosos, matando o inseto por paralisia.

2.4.5 Lactonas macrocíclicas

Subprodutos hidrofóbicos da fermentação fúngica do *Streptomyces cyanogriseus* e *Streptomices avermitilis*, as lactonas macrocíclicas se apresentam como uma classe terapêutica contra nematóides e ectoparasitos utilizados desde o ano 1981, com a descoberta e inserção da ivermectina no mercado de antiparasitários. (VERCRUYSSE et al., 2002; MARTIN et al., 2002; NOLAN; LOK, 2012).

Dentro desta classe, há uma subdivisão entre avermectinas, que são moléculas derivadas do fungo *S.avermitilis* e as milbemicinas, derivadas do fungo *S. cyanogruseus*. Estruturalmente, são parecidas, diferindo apenas quanto a presença de um grupo dissacarídeo no Carbono-13 (C-13) nas moléculas de avermectina, que não existe nas moléculas de milbemicina (GILL; LACEY, 1998).

A primeira vez que uma lactona macrocíclica ficou disponível no mercado, foi há mais de 40 anos, com a ivermectina. A partir de então, começaram-se a estudar a atividade específica contra parasitos e descobriram-se que o mecanismo de ação desta classe se relaciona com os receptores GABA, ativando-os, causando o influxo de cloro, consequentemente a hiperpolarização com inibição dos estímulos nervosos e morte por paralisia. (MARTIN et al., 2002; TAYLOR, 2001).

Atualmente no mercado, encontram-se disponíveis para o uso em animais de companhia a ivermectina, milbemicina, selamectina, doramectina e eprinomectina, cada uma com indicações específicas, apresentando eficácia contra ácaros, pulgas, carapatos, helmintos e prevenção contra *Dirofilaria immitis*, o “verme do coração”. (NOLAN; LOK, 2012).

2.4.6 Neonicotinóides

Os neonicotinóides são moléculas com amplo espectro de ação contra insetos, tanto na agricultura, quanto em medicina veterinária, apresentando eficácia ultrarrápida e alto poder adulticida, com relatos de sua introdução no mercado em meados de 1991, com o fármaco imidacloprida (BASS; FIELD, 2018). Pelo seu modo de ação, com alta latência e pouca atividade residual, são específicos para controlar infestações no hospedeiro, efetuando a morte de todas as pulgas em até 20 minutos. O seu mecanismo de ação, ao contrário de outros ectoparasiticidas, é de agir em receptores nicotínicos de forma agonista, causando a morte por paralisia espástica (ELBERT et al., 1991; DRYDEN et al., 2011).

Hovda & Hooser (2002) esclarecem que, apesar da extensa eficácia na mortalidade dessa classe contra insetos, outros artrópodes não são susceptíveis, provavelmente pela susceptibilidade de receptores alvo ser menor, como é o caso de carapatos e vertebrados. Porém, foi comprovado que o tiacloprid, um inseticida desta classe, foi capaz de causar teratogenia em embriões de galinhas, denunciando a importância do controle do uso e administração deste fármaco (SALVAGGIO et al., 2018).

Apesar da sua extensa atividade inseticida em pulgas, De Oliveira et al. (2015) relataram que o dinotefuran apresentou eficácia em interferir a atividade reprodutiva de fêmeas semi- ingurgitadas de *R. sanguineus*, podendo ser também uma alternativa no controle deste carapato em populações de cães.

Na medicina veterinária, os principais neonicotinóides são a imidacloprida, o dinotefuran e o nitempiram que são encontrados nas diversas apresentações, tópica ou

oral, em associação com outras classes de ectoparasiticidas, ou isolados (MEHLHORN et al., 1999; DRYDEN et al. 2011).

2.4.7 Spinosinas

As spinosinas são fármacos macrolídeos introduzidos no mercado como inseticidas em 1997 sendo derivados da fermentação do fungo *Saccharopolyspora spinosa*, que no processo produzem dois compostos importantes, a spinosina A e spinosina D que se diferem estruturalmente e, quando combinadas, formam o spinosad, um potente e efetivo fármaco que atua no controle de insetos com baixo potencial de toxicidade em mamíferos (WALDRON et al., 2001; MADDURI et al., 2001; SPARKS et al., 2012).

O mecanismo de ação é complexo e atua em duas fases, o primeiro é relacionado com o antagonismo de receptores nicotínicos para acetilcolina (Ach) dos parasitos, mais especificamente na subunidade $\alpha 6$ destes receptores, no sistema nervoso, o que resulta num bloqueio neuronal que impede a movimentação do inseto, matando por paralisia espástica, com contrações involuntárias. Estudos posteriores também provaram intensa atividade secundária antagonista em receptores GABA, diminuindo o tempo de abertura de canais para cloro ou os fechando, atuando em sinergismo com o bloqueio de receptores nicotínicos, causando morte por hiperexcitação (KIRST, 2010; SALGADO, 1998).

No mercado, encontram-se as apresentações orais para o controle de pulgas, apresentando ótima eficácia adulticida com elevado efeito “knock-down”, e ainda com potencial de interferência no ciclo evolutivo, inibindo a atividade reprodutiva, eliminando quase que completamente a fase de postura, bem como a qualidade dos ovos que não são capazes de eclodir. Apesar da indicação inseticida, Snyder et al. (2009) comprovaram eficácia contra carrapatos *R. sanguineus* (SNYDER et al., 2013).

2.4.8 Fenilpirazóis

Os fenilpirazóis com o seu principal fármaco, o fipronil, integram o grupo de ectoparasiticidas mais utilizados na agricultura e na medicina veterinária, com apresentações tópicas para grandes e pequenos animais (HOVDA; HOOSER, 2002; ZILIOOTTO et al., 2017).

Constituinte de uma ampla gama de produtos que vão desde sprays, soluções “pour-on” e “spot-on”, o fipronil, que quimicamente se apresenta como: [5-amino-3-ciano-1- (2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil) -4-fluorometilsulfinil pirazole], é um fármaco pouco solúvel em água e tem como maior metabólito ativo, o fipronil sulfona que tem ação direta na inibição de receptores do tipo GABAA que causa a desregulação em canais para cloro, fechando-os, levando os artrópodes à morte por hiperexcitação, e posterior paralisia espástica. Apesar da presença de receptores GABAA em vertebrados e mamíferos, a molécula ativa apresenta alta segurança por apresentar afinidade maior que 1000 vezes pelos receptores dos artrópodes. (ZHAO et al., 2004; GUPTA; ANADÓN, 2018; DOS SANTOS et al., 2021).

O fipronil possui ampla absorção através da pele por uma extensa afinidade lipídica, o que faz com que o fármaco seja liberado através das glândulas sebáceas e as apresentações tópicas sejam um sucesso, porém, recentemente foi relatado também que a sua administração numa formulação oral, conseguiu com sucesso controlar pulgas e carrapatos em níveis acima de 94% de eficácia, fato importante para avanço da segurança de medicamentos ectoparasiticidas que evitam contaminações ambientais e intoxicações acidentais (DOS SANTOS et al., 2021).

O fipronil também demonstra bastante estabilidade em formulações com mais de um princípio ativo, apresentando sinergismo farmacológico com diversas moléculas no controle de pulgas e carrapatos, como inibidores de crescimento (IGR), piretróides e formamidinas (BRIANTI et al., 2010; NAVARRO et al., 2016).

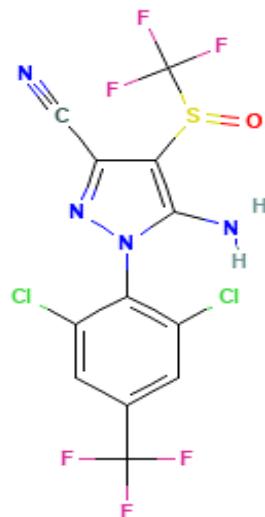


Figura 5. Estrutura química do fipronil (NCBI, 2022)

2.4.9 Fármacos inibidores de crescimento (IGR)

Compondo a terceira geração de inseticidas, esta classe terapêutica, possui pouca ou nenhuma ação adulticida, ou seja, não são medicamentos utilizados com o fim do controle de ectoparasitos adultos, pois interferem na síntese de quitina (ISQ) ou funcionam como análogos do hormônio juvenil (AHJ), impedindo o desenvolvimento e crescimento dos artrópodes, causando falhas no ciclo, eliminando infestações de maneira estratégica com o uso concomitante ou não de medicamentos que eliminam a forma parasitária adulta (DRYDEN, 2009; DANTAS-TORRES, 2010; BADAWY et al., 2013).

Quanto ao mecanismo de ação, é necessário antes entender que os artrópodes são invertebrados que possuem um exoesqueleto formado principalmente por quitina, qualquer interferência na síntese deste polissacarídeo estrutural, causa o não desenvolvimento do parasito, como é o caso da atividade inseticida dos ISQ, como o lufenuron que é uma benzofenilureia com alto poder residual, sendo uma ótima alternativa para o controle de pulgas (BADAWY et al., 2013; TAYLOR, 2001; FRANC & CADIERGUES, 1997).

Outros ISQ utilizados em medicina veterinária para o controle de artrópodes, são o novaluron, fluazuron e o diflubenzuron, ainda demandando testes para avaliar a eficácia frente a pulgas (JUNQUERA et al. 2019).

O piriproxifen e o (S)-metoprene, são fármacos que interferem de outra maneira o desenvolvimento dos ectoparasitos, dessa vez, relacionados com a fisiologia hormonal, impedem que a fase do parasito que entrou em contato com o fármaco, não consiga proceder com o seu desenvolvimento no ciclo biológico, eliminando-o e interrompendo a infestação. Esse modelo de atividade farmacológica é o ideal para o uso em animais que se encontram em ambientes infestados, com contato com animais peridomiciliares, principalmente para infestações de pulgas pois é relatada a atividade ovicida, e larvicida destes medicamentos, fases não parasitárias (VARLOUD; HODGKINS, 2015; RUST et al., 2016; MEOLA et al., 2001).

2.4.10 Isoxazolinas

Nas últimas décadas, uma nova classe de moléculas com potencial ectoparasiticida ganhou notoriedade, principalmente pela sua atividade residual extensa, atrelada a uma boa eficácia adulticida de pulgas, carrapatos e posteriormente, ácaros e larvas de *Cochliomyia hominivorax* em miíases cavitárias. (SNYDER et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019; PALMIERI et al., 2020).

As isoxazolinas tem como mecanismo de ação, atuarem como inibidores da abertura de canais para cloro pela atividade antagônica em receptores GABA, além de interagirem em canais de cloreto controlados por glutamato, um alvo de outra classe muito conhecida de moléculas, as lactonas macrocíclicas, que são responsáveis pelo controle da locomoção, alimentação e comportamento dos insetos (GASSEL et al., 2014; WOLSTENHOLME, 2012).

As principais substâncias que compõem essa classe terapêutica, são: afoxolaner, sarolaner, lotilaner e fluralaner, cada uma com particularidades quanto à farmacocinética e em formas de apresentação oral e tópica, ambas com distribuição sistêmica, apresentando eficácia ótima contra pulgas e carrapatos em cães e gatos (BOSCO et al., 2019; BURGIO et al., 2016).

2.5 Controle Carrapatos com Produtos Naturais

Pelo controle de ectoparasitos ser realizado atualmente com o uso de fármacos sintéticos em sua grande maioria dos tratamentos em cães e gatos, são importantes também os inconvenientes desta alternativa terapêutica pois, com a evolução da tecnologia empregada nos medicamentos empregados para eliminar infestações de artrópodes, sintomas de intoxicação em animais e humanos que antes eram bem mais claros, com fármacos que interferiam ativamente nos receptores do hospedeiro, vem se tornando cada vez menos acentuados, o que pode acabar causando subnotificação de casos agudos, dando a falsa impressão de segurança absoluta destes novos tratamentos (TESTA et al., 2019).

Estudos mostram que o uso de fipronil como parasiticida na Itália é de em torno de 7,3 – 9,7 toneladas por ano, números alarmantes tendo em vista o alto potencial de bioacumulação desta molécula que mostra toxicidade inclusive para vertebrados (MICHEL et al., 2016; TESTA et al., 2019).

Frente a este inconveniente, há uma crescente busca por produtos eficientes e seguros, o que vem alavancando os estudos em torno do desenvolvimento de produtos de origem natural como a pesquisa por plantas que produzam moléculas específicas com atividade farmacológica contra parasitos, algo que apesar de ser inovador não é tão novo assim, com relatos do uso eficiente de 20 espécies de plantas no controle de pragas agrícolas na Ásia e Europa há mais de 170 anos (TAYLOR, 2001; IBRAHIM et al., 2001).

Os sinais da evolução são notórios também nas plantas que desenvolveram estratégias para se protegerem de pragas ambientais, produzindo substâncias químicas com atividade repelente e inseticida e é essa propriedade o alvo de estudos da farmacologia que busca cada vez mais a inserção de medicamentos naturais, promovendo maior segurança e diminuindo os resíduos tóxicos no meio ambiente (DE MONTEIRO et al., 2012; MACHADO; SILVA; OLIVEIRA., 2007).

2.6 Óleos Essenciais

Pela ação do processo evolutivo e pela pressão de seleção genética exercida por pragas herbívoras, algumas plantas são capazes de produzir nano estruturas com potencial

repelente e ectoparasitida para sua proteção que, podem ser obtidos e isolados através de processos de extração, resultando desde o material vegetal desidratado integral moído ou em extrato, até a obtenção aquosa ou por meio de solventes como etanol, acetona, éter ou por destilação, dando origem aos óleos voláteis ou, óleos essenciais (MACHADO et al., 2007).

OE são componentes botânicos extraídos integralmente ou por partes específicas de plantas, através de técnicas de destilação, e arraste de vapor, compostos por uma mistura complexa de substâncias voláteis e lipofílicas que conferem o aspecto “oleoso” ao composto em temperatura ambiente, apresentando baixa toxicidade para mamíferos e sem potencial de acúmulo ambiental o que permite sua utilização como alternativa terapêutica para animais e humanos, sem impactos deletérios na saúde e no meio ambiente (BUSATO et al., 2014; BASER, 2015; ISMAN et al., 2011).

As principais classes de substâncias encontradas nos OE botânicos e mais frequentemente isoladas, são os terpenos e terpenóides como o timol e o carvacrol, componentes majoritários dos OE de tomilho e de orégano e os fenilpropanóides como o cinamaldeído e o eugenol, que são derivados da via metabólica do ácido chiquímico e abundantes nos OE de canela e do cravo-da-índia. Ambos compostos possuem extensa atividade biológica, inclusive ação comprovada contra bactérias, insetos, ácaros, carrapatos e pulgas (SENRA et al., 2013; VELOSO et al., 2014; BENELLI; PAVELA, 2018).

Os mecanismos de ação dos compostos ativos de OE contra artrópodes são diversos, atuando como inibidores da via do citocromo P450, interferindo com receptores do tipo GABA, inibindo sistemas colinérgicos e até atuando como moduladores de receptores para octopamina, porém, apesar de atuarem em sítios também presentes em mamíferos, estas moléculas apresentam alta especificidade para os artrópodes e baixa toxicidade inclusive em peixes, demonstrando o quanto é seguro utilizar os OE como alternativa terapêutica inclusive para o controle de infestações por ectoparasitos (BENELLI; PAVELA, 2018).

A ação e eficácia de OE contra artrópodes é tida como foco pela pesquisa farmacêutica atual, com excelente respaldo da literatura onde há comprovação da ação do OE do *Ocimum gratissimum* contra larvas de carrapatos *R. sanguineus*, *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus microplus* e da eficácia também inseticida contra pulgas *Ctenocephalides felis felis* do OE de *Schinus molle L.*, provando que os OE podem atuar como adulticidas ou interferindo no metabolismo e fisiologia dos artrópodes, também os impedindo de se alimentar ou de concluir seus processos reprodutivos (BATISTA et al., 2016; FERREIRA et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2020; LIMA-DE-SOUZA et al., 2021).

2.7 Eugenol

Os fenilpropanóides compõem uma classe de substâncias de origem natural que estão presentes em diversas plantas e apresentam inúmeras funções biológicas com destaque para relatos científicos de atividade hipotensora, antiviral, antifúngica, imunomoduladora, antimicrobiana, antineoplásica, inseticida, acaricida, anestésica para peixes e até como suporte analgésico em procedimentos odontológicos (KURKIN, 2003; DERIGGI et al., 2006; PARK et al., 2006; MARCHESE et al., 2017; LAMBERT et al., 2020).

O eugenol, 4-allyl-2-methoxyphenol (Figura 6), componente majoritário da planta *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecida como “cravo-da-índia”, e também

presente em outras plantas das famílias Myrtaceae, Lauraceae e Lamiaceae, é um fenilpropanóide que tem se mostrado uma molécula com importante ação contra carrapatos *Rhipicephalus microplus*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) e *R.sanguineus*, listado pelo FDA (Food and Drug Administration) como substância livre e segura para ingestão (ARAUJO et al., 2016; CHAGAS, et al. 2012; BISSINGER; ROE, 2010; THOMPSON et al., 1998)

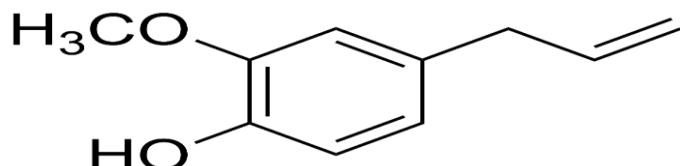


Figura 6. Estrutura química do 4-Allyl-2-methoxyphenol (eugenol)

Lambert et al. (2020), demonstraram que a eficácia do óleo essencial de *S. aromaticum*, que contém 95% de eugenol, também se aplica ao controle de pulgas tanto no seu desenvolvimento, impedindo a eclosão e maturação de ovos quanto como adulticida para este artrópode e Ferreira et al. (2019) também verificou que o OE de *O. gratissimum* que tem como constituinte majoritário o eugenol, apresentou eficácia contra larvas de *R. sanguineus*, *A. sculptum* e *R. microplus*, fatos que evidenciam a importância de pesquisas em torno desta classe de substâncias no tratamento e controle de infestações resistentes à tratamentos com medicamentos sintéticos.

2.8 Carvacrol

O carvacrol, 5-Isopropyl-2-methylphenol 499-75-2Isopropyl-o-cresolo-Thymol (Figura 7), é um composto botânico natural da classe dos monoterpenos. Esta classe apresenta substâncias com características lipofílicas, incolores e voláteis que compõe o odor em diversos vegetais das famílias Pinaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Asteraceae, além de promover potencial repelente e inseticida contra insetos herbívoros (GAMBIEL; CATES, 1995; GERSHENZON et al., 2000).

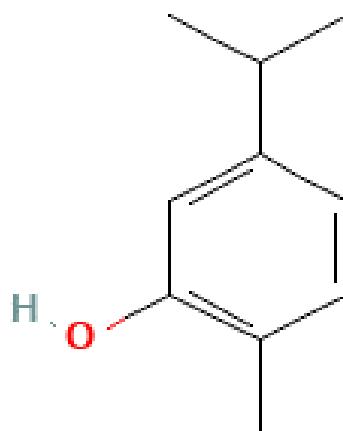


Figura 7. Estrutura química do carvacrol 5-Isopropyl-2-methylphenol 499-75-2Isopropyl-o-cresolo Thymol (NCBI, 2022).

Componente majoritário de algumas plantas como por exemplo o *Origanum vulgare*, o orégano, o carvacrol é uma substância que possui atividade antimicrobiana, e em sinergismo com outras moléculas, também foi capaz de atuar contra pulgas, carrapatos e moscas domésticas (CONCEIÇÃO et al., 2020).

Pela sua lipofilicidade e característica hidrofóbica, um dos mecanismos que podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana do carvacrol contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, é o seu potencial de acúmulo na membrana celular, formando hidroxilas, alterando a conformação estrutural, matando assim a bactéria. Já os mecanismos de ação contra artrópodes ainda se encontram sob alvo de pesquisas, porém, sabem-se que ele possui afinidade por receptores GABA, e estudos também confirmaram ação de inibição sobre enzimas AChE em baratas e moscas domésticas, o que pode explicar a ação acaricida e pulgicida deste composto, abrindo possibilidades para estudos de avaliação de sinergismo com outras moléculas (BEN ARFA et al., 2006; ANDERSON; COATS, 2012; TABARI et al., 2017; XIE et al., 2019).

A assimilação entre monoterpenos, fenilpropanóides e uma molécula sintética como o fipronil no intuito de aumentar o potencial acaricida e pulgicida, se vale pela ação destes três compostos de maneira isolada que, ao serem utilizados juntos, podem conferir sinergismo farmacológico, aumentando a eficácia e o período residual do tratamento, fato evidenciado por Novato et al. (2018) que verificou eficácia contra *R.microplus* na associação entre os monoterpenóides carvacrol e timol, com o fenilpropanóide eugenol. Os esforços da farmacologia se concentram então na busca por substâncias compatíveis, aumento da segurança e eficácia e evitar moléculas que sejam antagonistas.

2.9 Sinergismo e Antagonismo Farmacológico: Desafios Para a Assimilação de Fármacos Antiparasitários

Sinergismo farmacológico é uma classe de resposta a uma interação medicamentosa obtida a partir da associação de dois fármacos com efeito final maior que o uso isolado de um dos dois. Flório (2016) define ainda como o efeito conjugado de fármacos que atuam numa mesma direção.

O sinergismo pode ser dividido em: sinergismo farmacológico por adição, que é quando o efeito combinado de dois fármacos de mesmo mecanismo de ação ou mais, é igual à soma dos efeitos isolados de cada um, ou sinergismo farmacológico por potenciação, nesse caso, os fármacos nesta interação apresentam diferentes mecanismos de ação, atuando em diferentes receptores e o efeito combinado dos fármacos, é maior que os efeitos isolados de cada um (NUNES et al., 2017; SPINOSA et al., 2016)

O antagonismo farmacológico é a anulação completa ou diminuição da atividade de um fármaco pela interação de outro, no caso de formulações tópicas com derivados botânicos, o que mais interessa é o antagonismo químico direto, substâncias que não irão reagir em sítios receptores, mas sim, quimicamente entre si, diminuindo a eficácia final ou anulando-a (SPINOSA et al., 2016).

2.10 Bioensaios *in vitro*

Para que a ciência farmacêutica de antiparasitários continue avançando, se faz necessário manter um ritmo elevado de testes e experimentos com novos compostos, algo que é extremamente facilitado pelos bioensaios *in vitro*. Os experimentos com animais demandam diversas questões técnicas e éticas, o que torna o processo de descoberta de moléculas antiparasitárias, algo dispendioso e laborioso, frente a isso, os métodos de bioensaio fornecem subsídios suficientes para a realização de uma pré-triagem de vários compostos químicos, determinando as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}), permitindo a

produção de novas formulações e suas dosagens, bem como a atividade sinérgica de associações e a atividade residual química de uma maneira simples, barata e eficaz (SCOTT, 1995; SU et al., 2014).

A Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), é uma organização que há mais de 55 anos determina em compêndios, técnicas de bioensaios para a avaliação de eficácia e detecção de resistência em carapatos *R. microplus*, aos mais diversos compostos e medicamentos, servindo como base para a execução de muitos estudos que se aplicam ao controle de outras fases e espécies diferentes de carapatos, permitindo adaptações nestas técnicas, como as feitas por Sabatini et al. (2001) que, a partir do teste de imersão larval (LIT), descrito por Shaw (1966), foram capazes de verificar com sucesso a resistência às lactonas macrocíclicas em cepas australianas de larvas do carapato *R. microplus* (FAO, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para uma padronização e aumento de confiabilidade, bem como o de consistência dos resultados, todos os experimentos foram realizados no mesmo ambiente laboratorial e nas mesmas condições de tempo e temperatura, pelo mesmo analista, com micropipetas Peguepet® com faixa de volume variável (100 – 1000 µg/mL) e Testline® (50 – 200 µg/mL).

3.1 Origem dos Carapatos do Experimento

Todos os carapatos utilizados, foram provenientes da colônia de carapatos *R. sanguineus* mantida em coelhos, do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), anexo I do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica (22°45'31.3"S 43°40'42.3"W), amparada pelo protocolo de número 090/14 da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA). Para os experimentos, foram obtidos larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* não alimentados, com 14 dias de vida (21 dias de incubação) em estufas com demanda bioquímica de oxigênio (BOD), com controle de umidade (90% UR) e temperatura (27°C ±1°C).

3.2 Obtenção dos Reagentes

O fipronil (FIP) com 99,61 % de pureza foi obtido através de doação da empresa Ceva®, o carvacrol (CAR) e o eugenol (EUG), foram comprados na empresa Sigma-Aldrich®, com números de lote MKCF6269 e STBJO145 respectivamente, ambos com pureza de 98%.

3.3 Padronização do Bioensaio *in vitro*

Os experimentos ocorreram no LQEPV. A obtenção da CL₅₀ e padronização ocorreram com a execução da primeira etapa experimental, baseada na adaptação e comparação da atividade do fipronil, entre três metodologias de testes *in vitro*, que foram as técnicas de imersão de larvas (TIL), a técnica do pacote com larvas ou “Teste do Pacote com Larvas” (TPL) e o teste do pacote impregnado (PLI), adaptado por De Monteiro et al. (2012), adaptado de Stone e Haydock (1962), ambas, frente à 5 casais de carapatos adultos não alimentados da espécie *R. sanguineus*. O experimento foi realizado em 2 dias diferentes totalizando 6 repetições inter-dia para cada faixa de concentração. Todas as técnicas foram efetuadas com a mesma faixa de concentração que será descrita a seguir e

o mesmo analista foi o responsável por efetuar todas as leituras para a obtenção dos dados que irão compor os resultados.

O parâmetro utilizado para a avaliação da mortalidade era a motilidade e atividade geral do espécime após 24 horas. Quando surgia a suspeita de que um espécime estava vivo e não apenas paralisado como forma de proteção, este era submetido a uma observação criteriosa e estimulado por, em torno de 1 minuto. Qualquer mínima movimentação era o suficiente para anotar o espécime como vivo.

3.3.1 Teste de Imersão Larval (TIL)

O teste foi efetuado de acordo com o protocolo primeiramente descrito por Shaw (1966) para larvas de *R. microplus*, com adaptações para adultos não alimentados de *R. sanguineus*. Foi preparado um concentrado emulsionável (CE) de FIP a x%, constituído de DMSO (x %), acetona (x%), N-metilpirrolidona (x%), Triton-X (x%), e água ultrapura (qsp. —100%). A partir do CE, foram preparadas soluções de FIP nas concentrações de 250, 275, 300, 500, 1000 e 5000 µg/mL utilizando água como diluente. Cinco casais não alimentados de *R. sanguineus* foram colocados em microtubos de 2 mL (Figura 8 A) que posteriormente receberiam 1 mL de solução para cada concentração, em três repetições. Como exposto na Figura 8 B, cada microtubo contendo os caracatos e as soluções, eram colocados em um homogeneizador de soluções Phoenix Luferco, modelo AP22, por 10 minutos a 30 RPM (rotações por minuto).

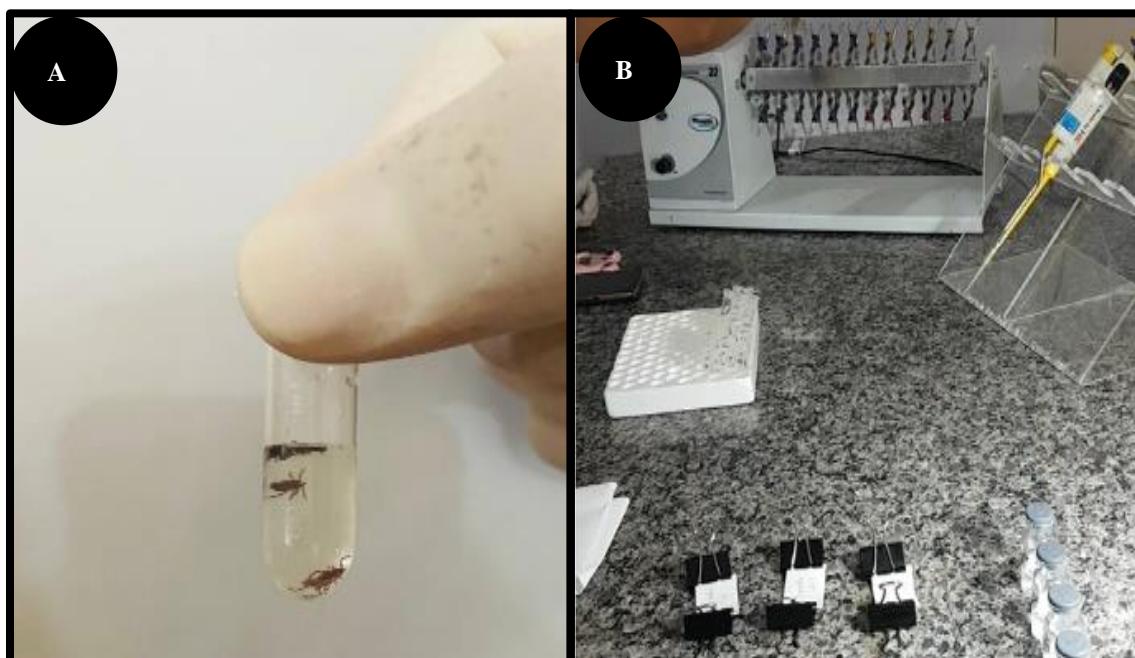


Figura 8. Microtubo contendo cinco casais de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* e 1 mL de solução FIP 300 µg/mL (A). TIL em execução com microtubos em processo de homogeneização (B) (Fonte: arquivo pessoal).

Após o término do tempo de contato dos espécimes com as soluções, os microtubos eram removidos do aparelho homogeneizador e tinham todo o conteúdo interno, juntamente com os carrapatos, vertido em papel toalha absorvente para secagem onde, após secos, os carrapatos eram capturados manualmente e inseridos em envelopes que eram confeccionados a partir de papéis filtro nas dimensões 6 x 6 cm, dobrando-os ao meio e os prendendo com *binder clips* como mostra a Figura 9A. Imediatamente após esse processo, os envelopes eram colocados em BOD como demonstrado na Figura 9B, para avaliação da mortalidade em 24h de incubação.



Figura 9. Envelope de papel filtro contendo carrapatos **(A)**. Envelopes dispostos em BOD. **(B)**. (Fonte: arquivo pessoal)

3.3.2 Teste do Pacote Larval (TPL)

Para este teste, as soluções de FIP foram preparadas a partir da diluição em Azeite de Oliva Extra Virgem Gallo® e tricloroetileno (2:1), que compuseram uma solução mãe, de acordo com as recomendações da FAO (2004). As soluções obtidas, assim como no teste supracitado, tinham cinco concentrações que eram, 250, 275, 300, 500, 1000 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FIP.

De cada diluição, eram pipetados 670 μL que eram utilizados para impregnar papéis filtro, nas dimensões de 7,5 x 8,5 cm que permaneciam na bancada, sobre lâminas de papel alumínio por duas horas, tempo necessário para que ocorra a secagem do tricloroetileno (Figura 10), para posteriormente serem confeccionados os envelopes que receberiam os espécimes para exposição ao princípio ativo por 24h em ambiente controlado (Figura 9B). Decorrido o tempo de 2h, cada papel era dobrado ao meio para formar um envelope e cinco casais de carrapatos adultos não alimentados de *R. sanguineus* eram colocados no interior, fechavam-se as bordas com *binder clips* e então, acomodavam-se todos os envelopes em estufas BOD, para leitura e avaliação da mortalidade no dia seguinte, após 24h.



Figura 10. Papéis filtro de 7,5 x 8,5cm sendo impregnados com soluções contendo FIP, aguardando secagem do diluente tricloroetileno para a confecção dos envelopes

3.3.3 Pacote Larval Impregnado (PLI)

Cinco casais de adultos não alimentados de *R. sanguineus*, eram inseridos em envelopes feitos com papéis filtro nas dimensões de 6 x 6 cm que posteriormente tinham suas bordas seladas com binder clips. Após esta etapa, os envelopes, formando grupos de três por concentração de solução a ser impregnada, eram colocados em grades em cima da bancada e cada um recebia 90 µL de solução contendo FIP nas concentrações 250, 275, 300, 500, 1000 e 5000 µg/mL (Figura 11). As soluções utilizadas foram preparadas pelo mesmo procedimento descrito na técnica de TIL a partir do CE.



Figura 11. Pacote contendo cinco casais de *Rhipicephalus sanguineus* não alimentados, sendo impregnado com solução de FIP, seguindo a técnica de avaliação proposta por De Monteiro et al. (2012) adaptada (PLI). (Fonte: Arquivo pessoal)

Ao término de todo o procedimento de inserção dos espécimes no pacote e impregnação, todos os envelopes com os carapatos eram colocados em estufas do tipo BOD, para leitura e avaliação da mortalidade com 24h (Figura 9B).

3.4 Análise estatística, Cálculo das Concentrações Letais CL₅₀ e CL₉₀ e Avaliação do Sinergismo.

Para a avaliação da mortalidade ou eficácia *in vitro*, foi utilizada a fórmula proposta por Abbott (1987) que consistiu na obtenção da média observada entre carapatos vivos e mortos nas 3 repetições ($\text{Eficácia} = \frac{(\text{carapatos mortos})}{\text{total de carapatos}} \times 100$). A análise estatística e obtenção das concentrações letais, foram alcançadas através da análise de probito usando o RStudio Team (2020, RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA), com significância estatística de 95% ($P < 0,05$).

A atividade sinérgica foi verificada através do software CompuSyn (Cambridge, MA) que ao ser alimentado com os valores de mortalidade de cada composto, gerou os dados do coeficiente de sinergismo (CS), onde valores menores que 0,70 ($CS < 0,70$) indicam sinergismo, valores compreendidos entre 0,70 e 0,90 ($CS 0,70 - 0,90$) apontam uma atividade sinérgica, porém, moderada. Valores que se apresentaram entre 0,90 e 1,10 ($CS 0,90 - 1,10$) indicam que há uma interação sinérgica de adição. O antagonismo moderado foi identificado para valores entre 1,10 e 1,45 ($CS 1,10 - 1,45$) e antagonismo quando o coeficiente se apresentou maior que 1,45 ($CS > 1,45$) (NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al. 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Atividade do Fipronil (FIP) Frente à Carapatos Adultos Não Alimentados de *R. sanguineus* e Validação do Bioensaio *in vitro*.

Todas as técnicas adaptadas para adultos não alimentados de *R. sanguineus* apresentaram eficácia, com resultados diferentes entre si.

Na Tabela 1, estão descritos os valores que demonstram a linearidade das técnicas, bem como a média de mortalidade, desvio padrão e coeficiente de variação encontrados para cada metodologia testada. Pode-se observar que a técnica de TPL mostrou-se superior, sendo a única metodologia que apresentou 100% de mortalidade na concentração de 5000 µg/mL, com coeficiente de variação de 0%, frente a 46,6% de mortalidade (CV 21%) para TIL e 45% de mortalidade (CV 25%) para PLI na mesma faixa de concentração.

Tabela 1. Resultados de média de mortalidade, desvio padrão e coeficiente de variação frente à carrapatos adultos não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* expostos a FIP em TIL, TPL e PLI.

(µg/mL)	TIL			TPL			PLI		
	Média	dp	CV	Média	dp	CV	Média	dp	CV
250	3,33	3,35	100	3,33	3,3	100	1,67	1,65	100
275	10,0	6,70	67	3,33	0	0	5,00	5,00	100
300	15,36	15,3	100	8,33	8,35	100	3,33	0	0
500	8,75	8,76	100	6,67	3,35	50	6,67	6,65	100
1000	23,3	10,0	43	30,8	10,8	35	3,33	33,3	100
5000	46,6	10,0	21	100	0	0	45,0	25,0	56

O grupo controle manteve-se com taxa de mortalidade = 0%; IC 95% = Intervalo de confiança de 95%; CV (%) = coeficiente de variação.

A linearidade dos dados de cada teste está ilustrada a seguir, onde pode-se observar que o gráfico de dispersão para a técnica de TPL na Figura 12, apresenta maior precisão com maior proximidade entre as retas, determinado pelo valor do coeficiente de variação que se apresentou abaixo de 50% nas concentrações de 500, 1000 e 5000 µg/mL. É possível também observar que, apesar de positivas, há uma maior inclinação destas retas quando comparadas aos testes de TIL (Figura 13) e o de PLI (Figura 14), devido ao valor de slope 3,052 para TPL, 1,09 em TIL e 1,283 em PLI, mais uma vez mostrando que TPL é uma técnica sensível para avaliar a eficácia de compostos acaricidas para adultos não alimentados de *R. sanguineus*.

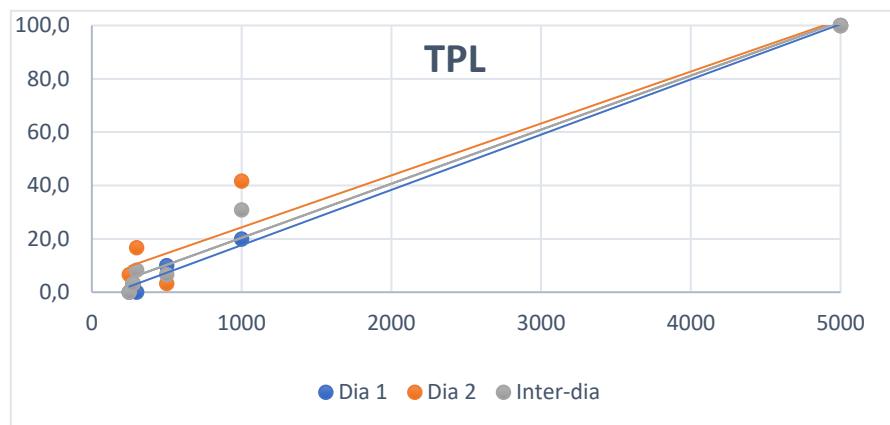


Figura 12. Gráfico de linearidade para a técnica TPL

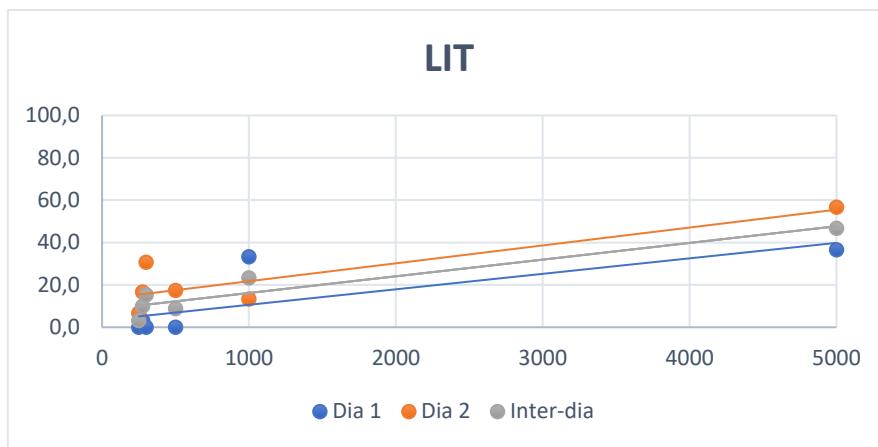


Figura 13. Gráfico de linearidade para a técnica TIL

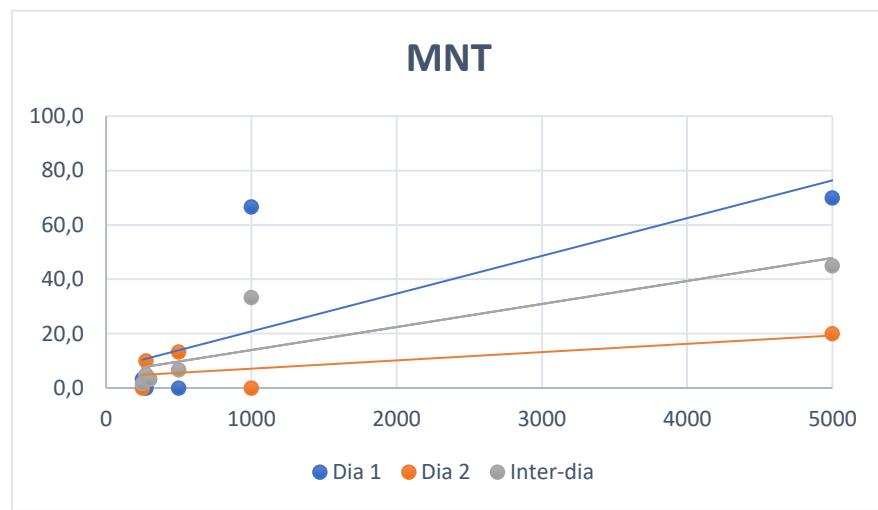


Figura 14. Gráfico de linearidade para a técnica PLI

A análise de probito estimou os valores das CL₅₀ e CL₉₀ para cada técnica executada. TPL apresentou 1236 µg/mL e 3250,4 µg/mL, valores inferiores quando correlacionado com as outras duas técnicas que foram, 4834,8 µg/mL e 48256,2 µg/mL em PLI e 5598,8 µg/mL e 82135,0 µg/mL para TIL. Todas as técnicas apresentaram uma relação linear positiva, observada nos valores dos coeficientes de correlação linear (*r*) obtidos que foram 0,991 para TPL, 0,958 para TIL e 0,860 para PLI. A Tabela 2 expõe todos os resultados de CL₅₀ e CL₉₀ e seus intervalos mínimos e máximos, slope e erro padrão, Qui-quadrado(χ^2) e coeficiente de correlação linear para todas as metodologias testadas.

Tabela 2. CL50 e CL90 obtidas através das técnicas TIL, TPL e PLI, frente à carapatos adultos não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* expostos a FIP.

	TIL	TPL	PLI
CL₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5598,8	1236,0 (947,5 – 1781,4)	4834,8 (2512,1 – x)
CL₉₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	82135,0	3250,4 (2156,8 – 6687,2)	48256,2 (13589,5 - x)
Slope (EP)	1,09 (0,176)	3,052 (0,578)	1,283 (0,329)
X² (p-valor)	1,815 (0,596)	11,068 (0,989)	9,522 (0,977)
r	0,958	0,991	0,860

O grupo controle manteve-se com taxa de mortalidade = 0%; IC 95% = Intervalo de confiança de 95% Probit - R®; CL50 ($\mu\text{g/mL}$) (IC 95%); r² = coeficiente de regressão

Apesar de serem técnicas diferentes de bioensaio, ambas foram desenvolvidas com o intuito de testar o potencial acaricida de moléculas frente a uma única fase do ciclo de carapatos, a fase larval, isso explica a escassez de trabalhos relacionados a metodologias específicas para carapatos trioxenos, mais especificamente, adultos não alimentados.

TIL, embora seja um teste que aparenta ser mais sensível, como demonstrado por Castro-Janer et al. (2009) que concluíram que esta técnica apresentou melhor resultado de CL quando comparada à de TPL frente a larvas não alimentadas de *R. microplus*, não apresentou bons resultados quando executada com adultos de *R. sanguineus* não alimentados, fornecendo resultados inferiores inclusive a PLI. Este fato pode ser explicado pela diferença na evolução de mecanismos de resistência do carapato de acordo com a sua fase do ciclo evolutivo, onde larvas e ninfas são mais susceptíveis a determinadas moléculas carapaticidas que adultos, fato comprovado quando se observa que a CL₅₀ de FIP para larvas obteve um aumento de 621,7% quando comparada ao valor encontrado em adultos não alimentados de *R. sanguineus*.

Um dos fatores que faz a metodologia TPL apresentar um maior desempenho quando comparada a TIL, pode ser explicada pelo fato desta ser uma técnica que apresenta um processo de execução com menos etapas e menos processos manuais, o que faz com que, naturalmente, os níveis de confiabilidade e reproduzibilidade sejam elevados. TIL, diferentemente de TPL, determina que os carapatos sejam imersos na solução teste, o que sugere uma maior toxicidade nos espécimes submetidos a avaliação, devido ao contato direto com o agente acaricida por alguns minutos, porém os resultados encontrados neste experimento para adultos não alimentados de *R. sanguineus*, divergem dos dados encontrados por Shaw (1996), White et al. (2004) e Castro-Janer et al. (2009), muito provavelmente pelos espécimes adultos possuírem maior resistência como citado anteriormente.

A técnica de avaliação PLI foi adaptada por De Monteiro et al. (2012) não só quanto a espécie e fase de carapato avaliada, mas também na remoção de uma etapa de execução que determinava que os espécimes deveriam estar contidos numa espécie de “sanduíche”, entre dois papéis filtro nas dimensões de 2 x 2 cm, para serem instilados com as soluções contendo o princípio ativo. Esta etapa foi removida do teste pois os adultos não alimentados possuem bastante habilidade de fuga e agilidade, fato que impossibilitava a permanência no “sanduíche”, diferentemente do observado quando o teste é efetuado com larvas. Devido a esse fato, a impregnação direta no envelope contendo os carapatos, pode ter feito com que a solução não se espalhasse de maneira uniforme, deixando espaços com maior ou menor concentração de FIP, determinando a inconsistência nos resultados obtidos.

4.2 Determinação da CL₅₀ de Fipronil, Eugenol e Carvacrol (FIP, CAR e EUG) Para Larvas, Ninfas e Adultos de *R. sanguineus* Não Alimentados.

Com base nos resultados dos testes *in vitro* para a validação do bioensaio, TPL foi a metodologia utilizada para a avaliação da atividade isolada e sinergismo entre FIP, CAR e EUG, seguindo os mesmos processos de obtenção de soluções, de acordo os passos descritos anteriormente. As faixas de concentração utilizadas nesta fase experimental para cada composto, junto com o seu valor de mortalidade nas três fases avaliadas do *R. sanguineus*, está descrita a seguir, na Tabela 3.

Tabela 3. Faixas de concentração e mortalidade respectivas utilizadas para FIP, EUG e CAR na técnica de TPL com larvas, ninfas e adultos não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus*.

	Larvas		Ninfas		Adultos	
	µg/mL	Mortalidade (%)	µg/mL	Mortalidade (%)	µg/mL	Mortalidade (%)
FIP	50	7,18	50	1,54	250	5,00
	75	25,33	75	11,90	300	13,33
	100	54,55	100	15,69	500	21,67
	150	45,71	150	37,16	750	33,33
	200	71,88	200	48,42	875	48,33
	250	99,26	250	76,96	1000	38,89
	300	100	300	82,82	1500	86,44
EUG	6250	13,13	12500	19,12	10000	0,00
	12500	59,07	15000	22,47	22500	13,11
	15000	83,97	20000	55,36	50000	5,08
	20000	90,64	25000	65,12	62500	5,08
	25000	98,69	37500	92,92	75000	13,33
	50000	99,77	50000	96,87	87000	17,19
CAR	1000	1,25	12500	21,99	10000	12,50
	5000	4,83	15000	37,54	22500	15,25
	10000	31,66	20000	41,86	50000	23,33
	12500	44,89	25000	63,04	62500	41,67
	15000	53,06	37500	86,05	75000	58,33
	17500	59,68	50000	92,68	87000	72,13
	20000	89,39			100000	90,16
	25000	98,45				
	30000	99,76				

Após a leitura e avaliação da mortalidade, os valores encontrados foram utilizados para uma nova análise estatística e obtenção da CL₅₀ que será utilizada para a avaliação da atividade sinérgica entre FIP, EUG e CAR.

Tabela 4. CL₅₀ dos compostos fipronil, carvacrol e eugenol (FIP, CAR e EUG) para larvas, ninhas e adultos não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus*.

Fase avaliada	Princípio ativo	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IC 95%
Larva	FIP	118,99	114,95 – 122,94
	EUG	10259,91	9894,33 – 1061,32
	CAR	12160,69	11826,43 – 12489,40
Ninfa	FIP	174,04	165,98 – 182,68
	EUG	18160,16	17112,28 – 19184,45
	CAR	20079,66	18934,38 – 21262,63
Adulto	FIP	858,82	741,30 – 1017,42
	EUG	-	-
	CAR	57514,28	48373,3 – 68564,0

O grupo controle manteve-se com taxa de mortalidade = 0%; IC 95% = Intervalo de confiança de 95%

Nesta etapa do experimento, os resultados mostraram uma maior mortalidade isolada do FIP, quando comparado com EUG e CAR, apresentando CL₅₀ para larvas, ninhas e adultos, de 118,99, 174,04 e 858,82 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, comprovando a diminuição da susceptibilidade do carrapato, à medida que avança para a maturidade, no seu ciclo evolutivo.

Apesar do EUG e CAR demonstrarem isolados, atividade acaricida, no teste apresentaram altos valores de CL₅₀. Como pode ser observado na Tabela 4, o teste efetuado com EUG contra a fase de adultos, não sensibilizou os espécimes, mesmo em maiores concentrações, apresentando mortalidade abaixo de 20%, denunciando a menor susceptibilidade de carrapatos nesta fase.

A ação acaricida de fenilpropanóides e monoterpenos já é bem descrita e comprovada na literatura. Coelho et al. (2020) verificaram a ação do EUG frente as fases de larvas e ninhas de *R. sanguineus*, de Monteiro et al (2012), provaram também que larvas de *R. microplus* e *D. nitens* são sensíveis ao EUG. De Oliveira et al. (2013) demonstraram a eficácia do CAR e outro monoterpeno, o Linalol contra larvas de *R. microplus* e *D. nitens*.

A maioria dos experimentos *in vitro* publicados, são realizados com fases imaturas de carrapatos, fato que ocorre devido ao grande interesse no controle de infestações do carrapato dos bovinos, espécie monoxênica que impossibilita a obtenção do espécime adulto não alimentado, por este não cair ao ambiente para a realização da ecdise.

Podemos perceber que, apesar de apresentarem susceptibilidade reduzida, inclusive ao composto sintético amplamente utilizado no controle de infestações FIP, os adultos não alimentados de *R. sanguineus* não são tão explorados para avaliação da eficácia de fármacos, mesmo sendo responsáveis também pela transmissão de agentes patogênicos e acentuado trauma no sítio de fixação para alimentação, causando lesões que podem servir para o estabelecimento de infecções bacterianas secundárias, miíases por *C. hominivorax* e até episódios de Dermatite alérgica a picada de ectoparasitos (DAPE) (WALL ; SHEARER, 1997; SZABÓ; BECHARA, 1999; CONTREARY, 2021).

A padronização da técnica de bioensaio *in vitro* com carrapatos na fase adulta, faz então com que uma nova modalidade de avaliação da eficácia de moléculas seja

explorada, permitindo inclusive novos experimentos para a avaliação de resistência de todas as classes de acaricidas que possuem atividade comprovada apenas com as formas imaturas do carapato, inclusive a ação sinérgica de compostos na fase adulta, na busca de associações eficazes contra essa fase.

Não existem trabalhos associando acaricidas sintéticos a compostos naturais, o presente estudo é o primeiro a associar FIP com EUG e CAR, na busca de uma maior atividade contra os carapatos *R. sanguineus* em todas as suas fases, bem como o primeiro a avaliar esta atividade frente à adultos não alimentados, adaptando uma técnica nova de bioensaio.

Os resultados das Tabelas 5 e 6 revelam a interação entre um fenilpirazol (FIP) e dois compostos naturais, sendo um monoterpeno (CAR) e um fenilpropanóide (EUG).

Tabela 5. Associação entre fipronil (FIP) e eugenol (EUG) frente a larvas não alimentadas de *Rhipicephalus sanguineus*.

Larvas	FIP ($\mu\text{g/mL}$)	EUG ($\mu\text{g/mL}$)	Mortalidade (%)	Dose- efeito	CS	Efeito
	80	10000	18,60	0,19	1,630	Antagonismo
	90	11000	20,02	0,20	1,780	Antagonismo
	100	12000	13,75	0,14	2,170	Antagonismo
	110	13000	46,03	0,46	1,620	Antagonismo
	120	14000	38,80	0,39	1,870	Antagonismo

Coeficiente de sinergismo (CS) < 0,70 = sinergismo; 0,70 – 0,90 = sinergismo moderado; 0,90 – 1,10 = sinergismo aditivo; > 1,45 = antagonismo (NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016).

Tabela 6. Associação entre fipronil (FIP) e carvacrol (CAR) frente a larvas não alimentadas de *Rhipicephalus sanguineus*.

Larvas	FIP ($\mu\text{g/mL}$)	CAR ($\mu\text{g/mL}$)	Mortalidade (%)	Dose- efeito	CS	Efeito
	80	12000	1,7	0,02	3,830	Antagonismo
	90	13000	1,2	0,01	5,210	Antagonismo
	100	14000	0	0,00	5,670	Antagonismo
	110	15000	0	0,00	6,130	Antagonismo
	120	16000	0	0,00	6,580	Antagonismo

Coeficiente de sinergismo (CS) < 0,70 = sinergismo; 0,70 – 0,90 = sinergismo moderado; 0,90 – 1,10 = sinergismo aditivo; > 1,45 = antagonismo (NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016).

O maior interesse na assimilação de dois ou mais fármacos, em parasitologia, é um aumento da resposta final, pelo sinergismo entre as moléculas, fato facilmente comprovado nas inúmeras apresentações comerciais que se valem desta propriedade farmacológica. Porém, pode ocorrer um evento contrário quando dois compostos são associados, chamado de antagonismo que pode ser observado na Tabela 5 e Tabela 6.

FIP isolado, apresentou-se como um ótimo fármaco, sensibilizando todas as fases que foram submetidas, inclusive a fase adulta, porém, ao ser associado com a maior concentração de EUG (14.000 $\mu\text{g/mL}$), a eficácia final foi inferior que a dos dois compostos isolados com uma mortalidade de 38,8% e CS = 1,87, denunciando antagonismo FIP-EUG. Quando a associação é feita com CAR, os resultados

surpreendem mais ainda, com uma mortalidade de 0% nas 3 maiores proporções. A CL₅₀ de FIP para larvas foi de 120 µg/mL porém, quando associado com uma concentração maior que a CL₅₀ de CAR, 16.000 µg/mL, a mortalidade observada foi de 0% com um CS = 6,580, indicando que o FIP apresenta incompatibilidade com CAR e EUG.

Na Tabela 7, se encontram os dados relacionados com os testes da associação entre EUG e CAR.

Tabela 7. Associação entre eugenol (EUG) e carvacrol (CAR) frente a larvas, ninfas e adultos não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus*.

	EUG (µg/mL)	CAR (µg/mL)	Mortalidade (%)	Dose- efeito	CS	Efeito
Larvas	10000	12000	95,41	0,95	0,227	Sinergismo
	11000	13000	94,94	0,95	0,249	Sinergismo
	12000	14000	96,62	0,97	0,222	Sinergismo
	13000	15000	97,92	0,98	0,207	Sinergismo
	14000	16000	99,53	1,00	0,174	Sinergismo
Ninfas	16000	17000	66,2	0,66	0,191	Sinergismo
	17000	18000	78,5	0,79	0,067	Sinergismo
	18000	19000	69,6	0,70	0,156	Sinergismo
	19000	20000	79,9	0,80	0,068	Sinergismo
	20000	21000	80,8	0,81	0,064	Sinergismo
Adultos	50000	50000	81,97	0,82	0,548	Sinergismo
	75000	75000	94,83	0,95	0,426	Sinergismo
	100000	100000	100,00	1,00	0,293	Sinergismo

Coeficiente de sinergismo (CS) < 0,70 = sinergismo; 0,70 – 0,90 = sinergismo moderado; 0,90 – 1,10 = sinergismo aditivo; > 1,45 = antagonismo (NOVATO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016).

Quando se analisa os dados obtidos referentes as ninfas, CAR isolado apresentou CL₅₀ de 20.079,66 µg/mL, porém, observou-se sinergismo capaz de alcançar 80,8% de mortalidade, quando adicionado 20.000 µg/mL de EUG, exibindo um CS = 0,064. Vale et al. (2021) também encontraram atividade sinérgica contra ninfas de *A. sculptum*, com sinergismo moderado em todas as proporções avaliadas.

Novato et al. (2015) já tinham apresentado a eficácia do CAR e do timol, outro monoterpeno, contra larvas de *A. sculptum* e *D. nitens*, Araújo et al. (2016) também verificaram o sinergismo de três compostos naturais, EUG, CAR e timol, frente a larvas de *R. sanguineus* e *R. microplus*, encontrando resultados satisfatórios de atividade sinérgica, o que reforça nossos resultados encontrados para a fase em questão.

Para a fase adulta, os valores de CL₅₀ foram elevados tanto para CAR, quanto para FIP. EUG isolado não conseguiu sensibilizar os carrapatos, não apresentando níveis de mortalidade, porém, os resultados quando associado ao CAR são muito satisfatórios onde 50.000 µg/mL de ambos os compostos, atingiu 81,97% de mortalidade e a eficácia máxima, com 100% de mortalidade para esta fase tão resistente, foi atingida com 100.000 µg/mL.

O fipronil é uma molécula que apresenta extensa atividade comprovada contra carrapatos e sua ação acaricida pode ser potencializada pela assimilação com outros

fármacos como o metopreno, a permetrina, e o amitraz (FOURIE et al., 2013; JONGEJAN et al., 2015; IBARRA-VELARDE et al., 2020). Os monoterpenos e os fenilpropanóides, possuem atividade acaricida bastante explorada e recentemente tem sido utilizados juntos para aumentarem a eficácia contra diversas espécies e fases de carrapatos (Coelho et al. 2020; Vale et al. 2021).

Pela primeira vez, um fenilpirazol foi associado com um monoterpeno ou um fenilpropanóide e tiveram sua atividade acaricida contra todas as fases não alimentadas de *R. sanguineus* onde ficou comprovado *in vitro* que quando utilizados isolados, estes compostos se comportam de uma maneira diferente de quando associados numa solução. O mecanismo de ação do carvacrol não é bem esclarecido, porém sabe-se que possui atividade direta em receptores nicotínicos para Ach em insetos, além de expressarem atividade inibitória da AchE em moscas domésticas, podendo também atuar em sítios alostéricos de receptores GABA, matando pela ação inibitória (TONG et al., 2012).

Os fenilpropanóides, mais especificamente o eugenol, tem mecanismos de ação ainda não totalmente elucidados, porém, sabem-se que expressam atividade em receptores de octopamina e GABA, também matando os parasitos susceptíveis por inibição (HARO-GONZALEZ et al., 2021; ENAN, 2005). Quando associados, monoterpenos e fenilpropanóides apresentam compatibilidade, muito provavelmente pelo modo de ação acaricida que atuam numa mesma direção, atuando em receptores que matam o parasito pela diminuição da atividade excitatória, além de causarem danos aos órgãos do carrapato, fato observado por Vale et al. (2021) que pode também explicar maior atividade final do sinergismo entre carvacrol e eugenol.

O fipronil, ao contrário do carvacrol e eugenol, possui mecanismo de ação bem descrito, atuando como antagonista em receptores GABA, fechando canais para cloro, o que faz com que haja uma hiperpolarização no sistema nervoso central de artrópodes, os levando a uma morte por hiperexcitação (GUPTA; ANADÓN, 2018). Muito provavelmente, uma das hipóteses para o antagonismo observado no experimento, pode se dar ao fato dos mecanismos de ação entre monoterpenos e fenilpirazóis, irem de encontro, onde os compostos naturais utilizados atuam como reguladores do sistema inibitório e o fipronil atua aumentando o sistema excitatório, este conflito poderia configurar um antagonismo fisiológico, porém, não pode ser desconsiderado o antagonismo químico ou farmacológico direto, que pode, antes mesmo de entrar em contato com os carrapatos, complexar os princípios ativos ainda na solução pela incompatibilidade química entre os compostos.

Controlar infestações de *R. sanguineus*, não é apenas eliminar carrapatos de populações de cães, mas também levar em consideração o ciclo e os hábitos da espécie, bem como a susceptibilidade entre as fases evolutivas. Por tanto, buscar uma alternativa eficaz para este desafio é essencial e o sinergismo farmacológico mostra-se uma ótima alternativa, diminuindo a quantidade final dos compostos conjugados, alcançando níveis de eficácia maiores que quando utilizados isolados, promovendo segurança para o indivíduo e toda a comunidade, inserindo cada vez mais óleos essenciais e compostos naturais em sinergismo com fármacos sintéticos.

A partir deste trabalho, o desenvolvimento de novos medicamentos deve levar em conta o sinergismo com produtos naturais, principalmente para fases mais resistentes de carrapatos *R. sanguineus*.

5. CONCLUSÃO

Com a execução desse trabalho e com base nos resultados encontrados, é possível concluir que a técnica de bioensaio *in vivo* padronizada para carrapatos adultos não

alimentados de *R. sanguineus* apresentou bons resultados, alta sensibilidade e robustez, o que permite uma boa repetibilidade da metodologia, inclusive com outras molécula naturais ou sintéticas. O sinergismo de eugenol e carvacrol pôde ser observado contra todas as fases, aumentando a atividade acaricida dos dois compostos, fato que comprova a importância de experimentos para a assimilação de compostos em busca de um desempenho final maior. O antagonismo do eugenol e do Carvacrol, quando associados com o fipronil, mostra a importância da execução destes testes onde, apesar de um fim em comum, fármacos não devem ser assimilados sem experimentos anteriores onde foi verificado se há interação entre eles.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 1, p. 265-267, 1987.

ANDERSON, J. A.; COATS, J.L. R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 2, p. 124-128, 2012.

AGUIAR, C. L. G.; PINTO, D. M.; PAPPEN, F. G.; CUNHA FILHO, N. A. D.; SANTOS, T. R. B. D.; FARIA, N. A. D. R. Parâmetros da fase de vida livre de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): adaptado ao clima subtropical. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 375-380, 2013.

ALVES, N. D. "Pain in pets." **Ciência Veterinária nos Trópicos** 18.2 (2015): 81-84.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 7-20, 2009.

ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D.; DA SILVA, B. C.; DAEMON, E.; DE CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and veterinary entomology**, v. 30, n. 4, p. 377-382, 2016.

AXELSSON, E., RATNAKUMAR, A., ARENDT, M. L., MAQBOOL, K., Webster, M. T., PERLOSKI, M. & LINDBLAD-TOH, K. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. **Nature**, 495(7441), 360. 2013

BADAWY, M. E.I.; KENAWY, A.; EL-ASWAD, A. F. Toxicity assessment of buprofezin, lufenuron, and triflumuron to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **International Journal of Zoology**, v. 2013, 2013.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**. Second Edition, CRC Press, 2015, 1112p.

BASS, C.; FIELD, L. M. Neonicotinoids. **Current Biology**, v. 28, n. 14, p. R772-R773, 2018.

BATISTA, L. C. D. S.; CID, Y. P.; DE ALMEIDA, A. P.; PRUDÊNCIO, E. R.; RIGER, C. J.; DE SOUZA, M. A.; COUMENDOUROS, K.; CHAVES, D. S. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 627-638, 2016.

BÄUMER, W.; BAYNES, R. Surface distribution of pyrethroids following topical application to veterinary species: Implications for lateral transport. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2021.

BAUER, E. C. et al. **Protecting Your Cats and Dogs from Pesticide Poisoning**. 2015

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BENELLI, G.; PAVELA, R. Beyond mosquitoes—Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. **Industrial Crops and Products**, v. 117, n. February, p. 382–392, 2018.

BISSINGER, B. W.; ROE, R. M. Tick repellents: past, present, and future. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 96, n. 2, p. 63-79, 2010.

BOSCO, A.; RINALDI, L.; LEONE, F.; PENNACCHIO, S.; CIUCA, L.; CRINGOLI, G.; GENCHI, M. The efficacy of fluralaner spot-on against natural infestations by fleas and otodectic mange mites in cats. **Summa, Animali da Compagnia**, v. 36, n. 7, p. 45-47, 2019.

BRIANTI, E.; PENNISI, M. G.; BRUCATO, G.; RISITANO, A. L.; GAGLIO, G.; LOMBARDO, G.; MALARA, D.; FOGLIAZZA, A.; GIANNETTO, S. Efficacy of the fipronil 10%+(S)-methoprene 9% combination against *Rhipicephalus sanguineus* in naturally infested dogs: speed of kill, persistent efficacy on immature and adult stages and effect of water. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 96-103, 2010.

BRITO, L. G., da SILVA NETO, F. G., OLIVEIRA, M. D. S., BARBIERI, F. D. S. Biogeografia, importância médicoveterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Embrapa Rondônia-Documents** (INFOTECA-E), 2006.

BURGIO, F.; MEYER, L.; ARMSTRONG, R. A comparative laboratory trial evaluating the immediate efficacy of fluralaner, afoxolaner, sarolaner and imidacloprid+ permethrin against adult *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks attached to dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 626, 2016.

BUSATO, N. V.; SILVEIRA, J. C.; COSTA, A. O. S.; COSTA-JUNIOR, E. F. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.

CADIERGUES, M. C.; SANTAMARTA, D.; MALLET, X.; FRANC, M. First blood meal of *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) on dogs: time to initiation of feeding and duration. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 214-215, 2001.

CAMICAS, J. L; HERVY, J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. The ticks of the world (Acarida, Ixodida): nomenclature, described stages, hosts, distribution. Paris: **Éditions de l'ORSTOM**, 1998. 233p

CASTRO-JANER, E.; RIFRAN, L.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. S. In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 120-128, 2009.

CHAGAS, A. C. D. S.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; PRATES, H. T.; PASSOS, W. M. Sensibility of *Boophilus microplus* tick to solvents. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.109-114, 2003.

CHRUSTEK, A.; HOŁYŃSKA-IWAN, I.; DZIEMBOWSKA, I.; BOGUSIEWICZ, J.; WRÓBLEWSKI, M.; CWYNAR, A.; OLSZEWSKA-SŁONINA, D. Current research on the safety of pyrethroids used as insecticides. **Medicina**, v. 54, n. 4, p. 61, 2018.

COELHO, L.; DE PAULA, L. G. F.; ALVES, S. D. G. A.; SAMPAIO, A. L. N.; BEZERRA, G. P.; VILELA, F. M. P.; MATOS, R. S.; ZERINGÓTA, V.; BORGES, L. M. F.; MONTEIRO, C. Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. **Veterinary Parasitology**, v. 277, p. 108989, 2020.

CONCEICAO, C. L.; DE MORAIS, L. A.; CAMPOS, D. R.; JÉSSICA, K. D. O.; DOS SANTOS, G. C.; CID, Y. P.; DE SOUSA, M. A. A.; SCOTT, F. B.; COUMENDOUROS, K. Evaluation of insecticidal activity of thyme, oregano, and cassia volatile oils on cat flea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 6, p. 774-779, 2020.

CONTREARY, Catlin. Parasitic Infections. **Diagnostics and Therapy in Veterinary Dermatology**, p. 63-74, 2021.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 13, n. 4, p. 151-154, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 213, 2013.

DE MONTEIRO, C. M.; MATORANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A.; CALMON, F.; DE SOUZA SENRA, T.; FAZA, A.; DE CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology research**, v. 111, n. 3, p. 1295-1300, 2012.

DE OLIVEIRA, P. C.; DE ALMEIDA, G. P. S.; CARDOSO, J. D.; TAVARES, R. B.; FERNANDES, J. I.; CORREIA, T. R.; VEROCAI, G. G.; SCOTT, F. B. Efficacy of sarolaner on the treatment of myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 276, p. 108966, 2019.

DE OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; DE ABREU, R. M. M.; MATHIAS, M. I. C. Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. **Experimental parasitology**, v. 155, p. 82-88, 2015.

DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.

DOS SANTOS, G. C. M.; SCOTT, F. B.; CAMPOS, D. R.; MAGALHÃES, V. D. S.; BORGES, D. A.; MIRANDA, F. R.; ALVES, M. C. C.; PEREIRA, G. A.; MOREIRA, L. O.; LIMA, E. A. S.; ROCHA, M. B. D. S.; CID, Y. P. Oral pharmacokinetic profile of fipronil and efficacy against flea and tick in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2021.

DOS SANTOS, J. V. B.; DE ALMEIDA CHAVES, D. S.; DE SOUZA, M. A. A.; RIGER, C. J.; LAMBERT, M. M.; CAMPOS, D. R.; MOREIRA, L. O.; SIQUEIRA, R. C. S.; OSORIO, R. P.; CID, Y. P. In vitro activity of essential oils against adult and immature stages of *Ctenocephalides felis felis*. *Parasitology*, v. 147, n. 3, p. 340-347, 2020.

DRYDEN, M. W.; PAYNE, P. A.; VICKI, S.; RIGGS, B.; DAVENPORT, J.; KOBUSZEWSKI, D. Efficacy of dinotefuran–pyriproxyfen, dinotefuran–pyriproxyfen–permethrin and fipronil–(S)-methoprene topical spot-on formulations to control flea populations in naturally infested pets and private residences in Tampa, FL. *Veterinary Parasitology*, v. 182, n. 2-4, p. 281-286, 2011.

DRYDEN, M. W. Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. *Veterinary dermatology*, v. 20, n. 5-6, p. 435-440, 2009.

DRYDEN, M. W; NEAL, J. J.; BENNETT, G. W. Concepts of Flea Control. *Companion Animal Practice-Parasitology/Dermatology*. v. 19, n. 4-5, p. 11-20, 1989.

ELBERT, A.; BECKER, B.; HARTWIG, J.; ERDELEN, C. Imidacloprid-a new systemic insecticide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* (Germany, FR), 1991.

ELFASSY, O. J.; GOODMAN, F. W.; LEVY, S. A.; CARTER, L. L. Efficacy of an amitraz-impregnated collar in preventing transmission of *Borrelia burgdorferi* by adult *Ixodes scapularis* to dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 219, n. 2, p. 185-189, 2001.

ELLIOTT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; SODERLUND, D. M. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-phenoxybenzyl esters. *Pesticide Science*, v. 9, n. 2, p. 112-116, 1978.

ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: A review. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 28, n. 3, p. 233–243, 2014.

ENAN, E. E. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 35, n. 4, p. 309-321, 2005.

FAO, Resistance. Management and integrated parasite control in ruminants—Guidelines, Module 1. Ticks: Acaricide resistance: Diagnosis, management and prevention. *Food and Agriculture Organization. Animal Production and Health Division*, Rome, 2004.

FERREIRA, T. P.; CID, Y. P.; ALVES, M. C. C.; SANTOS, G. C. M.; AVELAR, B. R.; FREITAS, J. P.; OŽAROWSKI, M.; CHAVES, D. S. A. In vitro acaricidal activity of Ocimum gratissimum essential oil on *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1604-1613, 2019.

FLÓRIO, J. C.; SOUZA, A, B, S. Farmacocinética. Em. SPINOSA, H.S. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6^aed. Guanabara Koogan, p 27-46. Rio de Janeiro, 2016

FOURIE, J. J.; OLLAGNIER, C.; BEUGNET, F.; LUUS, H. G.; JONGEJAN, F. Prevention of transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs treated with a combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene (CERTIFECT®). **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 223-228, 2013.

FRANC, M.; CADIERGUES, M. C. Use of injectable lufenuron for treatment of infestations of *Ctenocephalides felis* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 2, p. 140-142, 1997.

FRANC, M.; YAO, K. P. Comparison of the activity of selamectin, imidacloprid and fipronil for the treatment of cats infested experimentally with *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides felis strongylus*. **Veterinary parasitology**, v. 143, n. 2, p. 131-133, 2007.

FULAR, A.; NAGAR, G.; SHAKYA, M.; BISHT, N.; UPADHAYA, D. Infestation of *Ctenocephalides felis orientis* and *Ctenocephalides felis felis* in human-a case report. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 40, n. 3, p. 651-656, 2020.

GAMBLIEL, H. A.; CATES, R. G. Terpene changes due to maturation and canopy level in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) flush needle oil. **Biochemical systematics and ecology**, 1995, 23.5: 469-476.

GASSEL, M.; WOLF, C.; NOACK, S.; WILLIAMS, H.; ILG, T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid-and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 45, p. 111-124, 2014.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpenes accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 122, n. 1, p. 205-214, 2000.

GILL, J. H.; LACEY, E. Avermectin\milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 6, p. 863-877, 1998.

a

GUIMARAES, J.H. et al. **Ectoparasitas de Importância Veterinária**. São Paulo, Plêiade, 2001.

GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. Fipronil. **Veterinary toxicology**. Academic press, 2018. p. 533-538.

HARO-GONZÁLEZ, J. N.; CASTILLO-HERRERA, G. A.; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, M.; ESPINOSA-ANDREWS, H. Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6387, 2021.

HELLMANN, K.; ADLER, K.; PARKER, L.; PFISTER, K.; DELAY, R. L.; RUGG, D. Evaluation of the efficacy and safety of a novel formulation of metaflumizone plus amitraz in dogs naturally infested with fleas and ticks in Europe. **Veterinary parasitology**, v. 150, n. 3, p. 239-245, 2007.

HORAK, I. G.; FOURIE, J. J.; STANNECK, D. Efficacy of slow-release collar formulations of imidacloprid/flumethrin and deltamethrin and of spot-on formulations of fipronil/(s)-methoprene, dinotefuran/pyriproxyfen/permethrin and (s)-methoprene/amitraz/fipronil against *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* on dogs. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 79, 2012.

HOVDA, L. R.; HOOSER, S. B. Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. Veterinary Clinics of North America: **Small Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 455-467, 2002.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2019: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde.

IBARRA-VELARDE, F.; VERA-MONTENEGRO, Y.; ACALA-CANTO, Y.; CRUZ-MENDOZA, I. Additive Efficiency of Fipronil+ Methoprene Compared to Fipronil Alone against *Rhipicephalus sanguineus* Ticks in Naturally Infested Dogs. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 11, n. 8, p. 174-187, 2020.

IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J. K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science**, v. 10, p. 243–259, 2001.

ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Review**, v. 10, p. 197–204, 2011.

JONGEJAN, F.; DE VOS, C.; FOURIE, J. J.; BEUGNET, F. A novel combination of fipronil and permethrin (Frontline Tri-Act®/Frontect®) reduces risk of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* and of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2015

JONGEJAN, Frans; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology-Cambridge**, v. 129, p. S3, 2004.

GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. Fipronil. In: Veterinary toxicology. **Academic press**, 2018. p. 533-538.

JUNQUERA, P.; HOSKING, B.; GAMEIRO, M.; MACDONALD, A. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, 2019.

KIRST, Herbert A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. **The Journal of antibiotics**, v. 63, n. 3, p. 101-111, 2010.

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

KURKIN, V. A. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. **Chemistry of natural compounds**, v. 39, n. 2, p. 123-153, 2003.

LABRUNA, M.B. Biologia e ecologia de Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl. 1, p.123-124, 2004.

LAMBERT, M. M.; CAMPOS, D. R.; BORGES, D. A.; DE AVELAR, B. R.; FERREIRA, T. P.; CID, Y. P.; BOYLAN, F.; SCOTT, F. B.; CHAVES, D.S.A; COUMENDOUROS, K. Activity of Syzygium aromaticum essential oil and its main constituent eugenol in the inhibition of the development of Ctenocephalides felis felis and the control of adults. **Veterinary parasitology**, v. 282, p. 109126, 2020.

LAVAN, R. P.; TUNCELI, K.; ZHANG, D.; NORMILE, D.; ARMSTRONG, R. Assessment of dog owner adherence to veterinarians' flea and tick prevention recommendations in the United States using a cross-sectional survey. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2017.

LIMA-DE-SOUZA, J. R.; DE OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; SODELLI, L. F.; FERREIRA, A. R. F.; REMEDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The bioactive compound carvacrol as a potential acaricide: An assessment of its effects on the integument of female Rhipicephalus sanguineus sensu lato ticks. **Microscopy research and technique**, 2021.

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. C. Ctenocephalides felis felis vs. Ctenocephalides canis (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 21, p. 345-354, 2012.

MACHADO, L. A.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, MM de. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 103-106, 2007.

MADDURI, K. et al. Genes for the biosynthesis of spinosyns: applications for yield improvement in Saccharopolyspora spinosa. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 399-402, 2001.

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI, M.; NABAVI, S. M.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, 2017, 43.6: 668-689.

MARCHIONDO, A. A.; HOLDSWORTH, P. A.; FOURIE, L. J.; RUGG, D.; HELLMANN, K.; SNYDER, D. E.; DRYDEN, M. W. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: Guidelines forevaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v.194, n.1, p.84– 97, 2013.

MARTÍN, R. J.; DUARTE, J. A.; CERRILLOS, L.; BAUTISTA PALOMAS, J. D.; MORENO NAVARRO, I. M. Insecticide reproductive toxicity profile: organophosphate, carbamate and pyrethrroids. **Journal of Toxins**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2017.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; WOLSTENHOLME, A. J. Mode of action of the macrocyclic lactones. **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**, p. 125-140, 2002.

MARTINS, J.R.S., FURLONG, J. & LEITE, R.C. (2006) Controle de carapatos. **Carapatos de importância médica veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies** (ed. by D.M. Barros-Battesti, M. Arzua & G.H. Bechara), pp. 155–164. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo.

MASON, K. V.; RING, J.; DUGGAN, J. Fenthion for flea control on dogs under field conditions: dose response efficacy studies and effect on cholinesterase activity. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 20, n. 2, p. 591-595, 1984.

MCCALL, J. W.; ALVA, R.; IRWIN, J. P.; CARITHERS, D.; BOECKH, A. Comparative efficacy of a combination of fipronil/(S)-methoprene, a combination of imidacloprid/permethrin, and imidacloprid against fleas and ticks when administered topically to dogs. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 2, n. 1, p. 74, 2004.

MEHLHORN, H.; MENCKE, N.; HANSEN, O. Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light- and electron-microscopy study. **Parasitology research**, v. 85, n. 8, p. 625-637, 1999.

MÉNIER, K.; BEAUCOURNU, J. Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 883-890, 1998.

MEOLA, R. W.; DEAN, S. R.; BHASKARAN, G. Effects of juvenile hormone on eggs and adults of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 85-92, 2001.

MICHEL, N.; FREESE, M.; BRINKMANN, M.; POHLMANN, J. D.; HOLLERT, H.; KAMMANN, U; HAARICH, M.; THEOBALD, N.; GERWINSKI, W.; ROTARD, W.; HANEL, R. Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe. **Science of The Total Environment**, v. 568, p. 171-179, 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2022). PubChem Compound Summary for CID 3352, Fipronil. Acessado em 19 de Janeiro, 2022 do sítio <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fipronil>.

NAVARRO, C.; LIEBENBERG, J.; HELLMANN, K.; CVEJIC, D.; DE MARI, K.; FOURIE, J.; BONNEAU, S. Efficacy comparison of Effipro® Duo, fipronil alone and pyriproxyfen alone against the further development of flea (*Ctenocephalides felis*) eggs collected from cats. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 39, 2016.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; VENZAL, J.M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONEA, A.A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 2-8, 2015.

NOLAN, J. T.; LOK, B. J. Macroyclic lactones in the treatment and control of parasitism in small companion animals. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 1078-1094, 2012.

NOVATO, T.; GOMES, G. A.; ZERINGÓTA, V.; FRANCO, C. T.; DE OLIVEIRA, D. R.; MELO, D.; DE CARVALHO, M. G.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M. In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 260, p. 1-4, 2018.

NOVATO, T. P. L.; ARAÚJO, L. X.; DE MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; SENRA, T. D. O. S.; DA SILVA MATOS, R.; GOMES, G. A.; DE CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. 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, 2015.

NUNES, C. N. O.; SALTIVA, E. R.; ALVES, N. F. A. G; LIMA, P. H. S; MIYAMOTO, C. A. Interações medicamentosas. **Revista Conexão Eletrônica**. Três Lagoas, v. 14, n. 1, p. 112-121. 2017.

ORTUÑO, A., SANFELIU, I., NOGUERAS, M. M., PONS, I., LÓPEZ-CLAESSENS, S., CASTELLÀ, J., ANTÓN, E., SEGURA, F. Detection of *Rickettsia massiliae/Bar29* and *Rickettsia conorii* in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their *Rhipicephalus sanguineus* complex ticks. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 3, p. 629-631, 2018.

PALMIERI, Valerie et al. Survey of canine use and safety of isoxazoline parasiticides. **Veterinary medicine and science**, v. 6, n. 4, p. 933-945, 2020.

PARK, C. K., LI, H. Y., YEON, K. Y., JUNG, S. J., CHOI, S. Y., LEE, S. J.; LEE, S.; PARK, K.; KIM, J. S.; OH, S. B. Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. **Journal of dental research**, v. 85, n. 10, p. 900-904, 2006.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928, 2001.

PAZ, G. F.; LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C. Ritmo de Queda de *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) de Cães Artificialmente Infestados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 17, n. 3, p. 139-144, 2008.

RUST, M. K. The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management: A Review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017.

RUST, M. K.; LANCE, W.; HEMSARTH, H. Synergism of the IGRs Methoprene and Pyriproxyfen Against Larval Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of medical Entomology**, v. 53, n. 3, p. 629-633, 2016.

SABATINI, G. A.; KEMP, D. H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 53-62, 2001.

SALGADO, V. L. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 60, n. 2, p. 91-102, 1998.

SALGADO, V. L.; HAYASHI, J. H. Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. **Veterinary parasitology**, v. 150, n. 3, p. 182-189, 2007.

SALVAGGIO, A.; ANTOCI, F.; MESSINA, A.; FERRANTE, M.; COPAT, C.; RUBERTO, C.; SCALISI, E. M.; PECORARO, R.; BRUNDO, M. V. Teratogenic effects of the neonicotinoid thiacloprid on chick embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 812-820, 2018.

SANCHES, G. S. Comparação biológica, morfológica e molecular entre carrapatos do complexo *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Tese (Doutorado Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, p. 19. 2013.

SANTOS, H. D. Período de desenvolvimento dos estágios imaturos de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 87-91, 2008.

SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. Spinosa, HS; Górnjak, SL; Bernardi, MM **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, v. 5, p. 549-558, 2006.

SCHRECK, C. E.; POSEY, K.; SMITH, D. Durability of permethrin as a potential clothing treatment to protect against blood-feeding arthropods. **Journal of Economic Entomology**, v. 71, n. 3, p. 397-400, 1978.

SCOTT, J. A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Florida Entomologist**, p. 399-399, 1995.

SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R., DA SILVA MATOS, R.; MELO, D.; GOMES, G. A.; DE CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. 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, 2013.

SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2006. 199 p.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 389-405, 1966.

SNYDER, D. E.; MEYER, K. A.; WISEMAN, S.; TROUT, C. M.; YOUNG, D. R. Speed of kill efficacy and efficacy of flavored spinosad tablets administered orally to cats in a simulated home environment for the treatment and prevention of cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestations. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 492-496, 2013.

SNYDER, DANIEL E.; WISEMAN, SCOTT; LIEBENBERG, JULIAN E. Efficacy of lotilaner (CredelioTM), a novel oral isoxazoline against naturally occurring mange mite infestations in dogs caused by *Demodex* spp. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2017.

SNYDER, D. E.; CRUTHERS, L. R.; SLONE, R. L. Preliminary study on the acaricidal efficacy of spinosad administered orally to dogs infested with the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 131-135, 2009.

SONENSHINE, D. E., ADAMS, T., ALLAN, S. A., MCLAUGHLIN, J., WEBSTER, F. X. Chemical composition of some components of the arrestment pheromone of the black-legged tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and their use in tick control. **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 6, p. 849-859, 2003.

SPARKS, T. C.; DRIPPS, J. E.; WATSON, G. B.; PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns—a review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2012.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6^aed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2016

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

SU, L. C.; HUANG, C. G.; CHANG, S. T.; YANG, S. H.; HSU, S. H.; WU, W. J.; HUANG, R. N. An improved bioassay facilitates the screening of repellents against cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Pest management science**, v. 70, n. 2, p. 264-270, 2014.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Experimental & applied acarology**, v. 23, n. 11, p. 915-928, 1999.

TABARI, M. A.; YOUSSEFI, M. R.; MAGGI, F.; BENELLI, G. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor

bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 245, p. 86-91, 2017.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253 – 268, 2001.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4^a Edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2017. p. 245

TEERLINK, J.; HERNANDEZ, J.; BUDD, R. Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. **Science of the Total Environment**, v. 599–600, p. 960–966, 2017

TESTA, C.; SALIS, S.; RUBATTU, N.; RONCADA, P.; MINIERO, R.; BRAMBILLA, G. Occurrence of Fipronil in residential house dust in the presence and absence of pets: A hint for a comprehensive toxicological assessment. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 6, p. 441-448, 2019.

THOMPSON, D. C.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R. C. Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 149, n. 1, p. 55-63, 1998.

TONG, F.; GROSS, A. D.; DOLAN, M. C.; COATS, J. R. The phenolic monoterpenoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. **Pest management science**, v. 69, n. 7, p. 775-780, 2013.

VARLOUD, M.; HODGKINS, E. Five-month comparative efficacy evaluation of three ectoparasiticides against adult cat fleas (*Ctenocephalides felis*), flea egg hatch and emergence, 65 and adult brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus sensu lato*) on dogs housed outdoors. **Parasitology Research**, v. 114, n. 3, p. 965-973, 2015

VALE, L., DE PAULA, L. G. F., VIEIRA, M. S., ALVES, S. D. G. A., DE MORAES JUNIOR, N. R., GOMES, M. D. F., TEIXEIRA, W. F. P.; RIZZO, P. V.; FREITAS, F. M. C.; FERREIRA, L. L.; LOPES, W. D. Z. MONTEIRO, C. 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, 2021.

VELOSO, R. A.; CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; CARDOSO, D. P.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; SCHEIDT, G. N. Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjericão (*Ocimum basilicum L.*). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, p. 364-371, 2014.

VERCRUYSSSE, J.; ROBERT S. (Ed.). **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. CABI Pub., 2002.

VITAL, M.A.B.F. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA H.S., GÓRNIAK S.L.; BERNARDI M.M. (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2015., p.64 – 76

WALDRON, C.; MATSUSHIMA, P.; ROSTECK JR, P. R.; BROUGHTON, M. C.; TURNER, J.; MADDURI, K.; CRAWFORD, K. P.; MERLO, D. J.; BALTZ, R. H Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. **Chemistry & biology**, v. 8, n. 5, p. 487-499, 2001.

WALL, R; SHEARER, D. The importance and diversity of arthropod ectoparasites. **Veterinary Entomology**. Springer, Dordrecht, 1997. p. 1-42.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2000. 643p.

WHITE, W. H.; PLUMMER, P. R.; KEMPER, C. J.; MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; KEMP, D. H.; HUGHES, S.; SMITH, C. K.; GUTIERREZ, J. A. An in vitro larval immersion microassay for identifying and characterizing candidate acaricides. **Journal of medical entomology**, v. 41, n. 6, p. 1034-1042, 2004.

WITCHEY-LAKSHMANAN, L. C. Long-acting control of ectoparasites: a review of collar technologies for companion animals. **Advanced drug delivery reviews**, v. 38, n. 2, p. 113-122, 1999.

WOLSTENHOLME, A. J. Glutamate-gated chloride channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40232-40238, 2012.

XIE, Y.; HUANG, Q.; RAO, Y.; HONG, L.; ZHANG, D. Efficacy of *Origanum vulgare* essential oil and carvacrol against the housefly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 23, p. 23824-23831, 2019.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZILIOOTTO, L.; LUNA, S. P.; A FILHO, D. A.; RESENDE, L. O.; AUN, A. G.; BRAZ, M. G. Genotoxicity assessment of fipronil (frontline plus®) in *Canis familiaris*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 257-260, 2017.