

ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*, MYRTACEAE) SOBRE FASE LARVAL DE *Rhipicephalus sanguineus*

Catia Cericatto Segalla¹
Natália Berne Pinheiro²
Alexsander Ferraz³
Taís Poletti⁴
Renata Fontes Ongaratto⁵
Cléber Martins Ribeiro¹
Tiago Felipe Barbosa Moreira¹
Pedro Spagnol⁶
Marina Fucolo dos Santos⁷
Leandro Quintana Nizoli⁸

RESUMO

Rhipicephalus sanguineus vem se tornando uma praga urbana, com relatos de infestações em residências e populações resistentes a acaricidas, trazendo preocupações tanto a clínicos veterinários como também em saúde pública. Visando alternativas mais sustentáveis para o controle ambiental de *R. sanguineus*, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do óleo essencial de cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum*, sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus*. Para realizar os testes foram utilizadas larvas com 15 dias de vida, sendo testadas as concentrações de 0,5%, 1% e 2% do óleo essencial. A sensibilidade das larvas foi analisada pelos testes de imersão larval (TIL) com adaptações. Foi encontrada eficácia larvicida acima de 99% sobre *R. sanguineus* com concentrações acima de 0,5% de óleo de *S. aromaticum* diluído em solução hidroalcoólica. Demonstrando promissor efeito acaricida do óleo essencial de cravo-da-índia sobre larvas de *R. sanguineus*.

Palavras-chave: acaricida, carrapato, sustentabilidade.

IN VITRO EFFECT OF CLOVE ESSENTIAL OIL (*Syzygium aromaticum*, MYRTACEAE) ON THE LARVAL PHASE OF *Rhipicephalus sanguineus*

ABSTRACT

Rhipicephalus sanguineus has become an urban plague, with reports of infestations on residences and resistant populations to acaricides, bringing concerns both to veterinarians and public health. Looking for alternatives more sustainable for environmental control of *R. sanguineus*, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of the clove essential oil, *Syzygium aromaticum*, on *Rhipicephalus sanguineus* larvae. In the present study, it was used 15 old day larvae, which were tested concentrations of 0,5%, 1% and 2% of the essential oil.

¹ Residente em Doenças e Zoonoses Parasitárias Universidade Federal de Pelotas. Correspondência: catiacericatto@gmail.com; bebinhoribeiro@hotmail.com; tiagofelipevet@icloud.com

² Docente do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia. nbernevet@gmail.com

³ Doutor em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. xanderferraz@yahoo.com.br

⁴ Doutoranda em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal de Pelotas. taispoletti@hotmail.com

⁵ Doutora em Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande. renataongaratto@hotmail.com

⁶ Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. spagnolpedro1@gmail.com

⁷ Graduanda em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas. marinafucolo26@gmail.com

⁸ Docente na Universidade Federal de Pelotas. leandro.nizoli@gmail.com

The sensibility of larvae was tested by the larvae immersion tests (LIT) with adaptations. It was noted the larvicidal efficacy above 99% on *R. sanguineus* in concentrations above 0,5% of *Syzygium aromaticum* oil diluted in hydroalcoholic solution. Demonstrating promising acaricidal effect of clove essential oil on tick *R. sanguineus*.

Keywords: acaricides, tick, sustainability.

EFFECTO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*, MYRTACEAE) SOBRE LA FASE LARVAL DE *Rhipicephalus sanguineus*

RESUMEN

Rhipicephalus sanguineus se ha convertido en una plaga urbana, con informes de infestaciones en hogares y poblaciones resistentes a los acaricidas, lo que genera preocupación tanto a los médicos veterinarios como a la salud pública. Con el objetivo de alternativas más sostenibles para el control ambiental de *R. sanguineus*, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto in vitro del aceite esencial de clavo, *Syzygium aromaticum*, sobre las larvas de *Rhipicephalus sanguineus*. Se utilizaron larvas con 15 días de vida para realizar las pruebas, y se probaron concentraciones de 0.5%, 1% y 2% del aceite esencial. La sensibilidad larvaria se probó mediante pruebas de inmersión larvaria (TIL) con adaptaciones. Se encontró una eficacia larvicida superior al 99% sobre *R. sanguineus* con concentraciones superiores al 0,5% de aceite de *Syzygium aromaticum* diluido en solución hidroalcohólica. Demostrando efecto prometedor acaricida del aceite esencial de clavo para el control de larvas de *R. sanguineus*.

Palabras clave: acaricida, garrapata, sostenibilidad

INTRODUÇÃO

Dentre os ixodídeos, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* tem assumido relevante importância médico veterinária. Além das antigas preocupações quanto a vetorização de doenças infecciosas e patógenos emergentes (1,2) as crescentes infestações urbanas (3) e os relatos de populações resistentes a acaricidas comerciais (4,5) têm trazido a ecologia e as medidas de controle desse ácaro para debate, bem como a urgente necessidade de métodos de controle mais sustentáveis.

Conhecido popularmente como carrapato marrom/vermelho do cão pela sua coloração (1) é o ixodídeo mais comum em áreas urbanas no Rio Grande do Sul. Um problema rotineiro em canis, sendo também encontrado com frequência em ambiente domiciliar e peridomiciliar de humanos que convivem com o seu principal hospedeiro, o cão doméstico (6).

Estando plenamente adaptado ao clima subtropical do estado do Rio Grande do Sul, vem se observando um aumento significativo de infestações por *R. sanguineus* em cidades, invadindo residências e havendo inclusive relatos de parasitismo em humanos, sobretudo em crianças (3). Se tornando assim também uma preocupação de saúde pública.

Para o controle ambiental ainda é comum a aplicação de pesticidas em residências e pátios, muitas vezes executada de maneira indiscriminada e sem orientação profissional, trazendo o risco de seleção de populações resistentes às bases químicas disponíveis na indústria farmacológica (7).

Também há o risco à saúde humana e animal, uma vez que o uso inadequado de acaricidas representa grande parte das emergências de intoxicações acidentais de animais domésticos atendidas em clínicas veterinárias no Brasil (7,8).

O uso indiscriminado de acaricidas também aumenta a pressão de seleção. Vários pesquisadores vêm constando nas últimas décadas cepas de *R. sanguineus* resistentes à várias bases químicas no Brasil (5). Dentre os estudos, recentemente foi documentado a existência de populações dessa espécie resistentes à deltametrina, ivermectina, e ao fipronil em diversos locais da zona metropolitana de Porto Alegre, no estado do RS (4).

Dentro desse contexto os óleos essenciais surgem como uma alternativa, podendo auxiliar no controle integrado de carrapatos, sendo biodegradáveis, não poluentes e de menor poder residual (9,10). Podendo também atender a parcela de tutores que se opõem ao uso de produtos sintéticos em suas residências.

O óleo de cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum* é um produto de fácil disponibilidade no mercado de óleos essenciais e rico em eugenol, composto amplamente explorado pela indústria farmacológica pelo seu potencial antimicrobiano e por suas propriedades antioxidantes, e que vem sendo estudado também quanto ao seu potencial inseticida e acaricida (11).

Buscando uma solução prática e de menor impacto ambiental, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia, *S. aromaticum*, sobre larvas de carrapato de cão, *R. sanguineus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os ensaios de imersão larval foram utilizados como controle negativo água destilada, controle positivo álcool etílico a 92,8° INPM, e para o teste o óleo essencial de cravo-da-índia, *S. aromaticum* antigo *Eugenia caryophyllata*, da marca dōTERRA®, obtido por destilação a vapor dos botões florais da planta.

No Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica, LLIBIO UFPel, foi realizada uma análise do extrato oleoso para identificação dos constituintes químicos. O extrato foi diluído em metanol de grau HPLC e injetado automaticamente em um Cromatógrafo acoplado a Espectrometria de Massas modelo GC-MS QP-2020 (Shimadzu, Kyoto, Japão) usando hélio como gás de arraste e uma coluna capilar RTX-5ms (Restek, Bellefonte, Estados Unidos).

Para a obtenção de larvas de *R. sanguineus*, foram utilizadas teleóginas obtidas de animais que não haviam recebido tratamento acaricida há mais de 180 dias, coletadas por médicos veterinários colaboradores do projeto e encaminhadas ao laboratório para incubação.

No Laboratório de Doenças Parasitárias, LADOPAR, UFPel, as teleóginas foram lavadas em água corrente, secas em papel toalha, selecionadas quanto à viabilidade e acondicionadas em placas de Petri sendo fixadas dorsalmente em papel com fita adesiva dupla face.

Depois fixadas as teleóginas foram incubadas, e após quinze dias de incubação foram coletadas as posturas e incubada a massa total de ovos em um microtubo de 2 mL, do tipo Eppendorf®, com furo na tampa e vedado com tecido de nylon para passagem de ar, até a obtenção das larvas.

Para as imersões, foi primeiramente preparada uma solução hidroalcolica nas concentrações de 10% de álcool etílico 92,8° e água destilada, sendo esta a formulação do controle negativo e na qual foram diluídas as concentrações de 0,5%, 1% e 2% do óleo essencial de cravo-da-índia testado. Cada uma das soluções foi homogeneizada em mesa agitadora por 2 minutos.

Para o controle positivo foi utilizado o acaricida comercial Colosso Fc30, composto por fenthion, cipermetrina e 30% de clorpirifós. Foi aplicado 125µl do produto em 100 ml de água destilada, diluição de 1:800, dose recomendada pelo fabricante.

Os testes de imersão larval (TIL) foram baseados no método descrito por Shaw (12) e modificado pela EMBRAPA para estudos com óleos e extratos vegetais (13). Foi

necessário adaptações na metodologia, como a incubação das posturas em um único tubo, preservando a integridade dos ovos e mantendo assim maior umidade ao agrupar o total da massa de ovos em um único recipiente, sem formar pequenas alíquotas em tubos individuais como o realizado por outros pesquisadores (13,14).

Os testes de imersão foram realizados com larvas de 15 dias de vida, contados a partir do início da eclosão larval. Sendo formadas as alíquotas no dia dos testes, em grupos com cerca de 100 larvas, sugadas por ponteiras de 1 mL de volume adaptadas com vedação de tecido de nylon e acopladas à bomba de vácuo. Após a sucção as ponteiras foram vedadas na parte inferior com fita isolante.

Em triplicatas foram realizadas as imersões em cada tratamento, adicionando 1 mL das respectivas soluções em cada uma das ponteiras com larvas. A injeção dos tratamentos foi facilitada perfurando o tecido de nylon que vedava extremidade superior da ponteira. Imediatamente foram adicionadas as soluções de cada tratamento, e agitadas manualmente por 10 segundos para garantir que todas as larvas ficassem imersas nas soluções. Após 5 minutos de imersão, as larvas foram transferidas para envelopes de papel filtro, com o auxílio de um pincel. Os envelopes foram grampeados para vedação e secos por 30 minutos, logo após foram acondicionados em potes conforme o tratamento recebido, agrupando as repetições.

Após 24 horas foram abertos os pacotes e contadas as larvas vivas e as mortas com o auxílio da bomba de vácuo e de novas ponteiras adaptadas para a sucção das larvas.

A análise estatística foi realizada por ANOVA, seguido pós-teste de múltipla comparação de Tukey com nível de 5% de probabilidade, para comparar os valores entre os grupos, tratados e controle. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0.

RESULTADOS

O efeito acaricida das diferentes concentrações de álcool etílico 92,8° e das soluções contendo o óleo essencial de cravo em diferentes concentrações dos testes realizados *in vitro* com larvas de *R. sanguineus* estão demonstrados na Tabela 1.

O controle negativo contendo 10% de álcool demonstrou mortalidade de 0,30%. O controle positivo, composto por acaricida comercial, atingiu 100% de mortalidade larval.

Houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as médias do grupo controle negativo, com 0,30% de mortalidade larval, e dos grupos com óleo essencial *S. aromaticum*, que resultaram em mortalidades acima de 99%. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos com óleo essencial e com o acaricida comercial, todos alcançando máxima mortalidade larval.

Tabela 1. Médias percentuais de mortalidade de larvas de *R. sanguineus* submetidas ao teste de imersão em diferentes concentrações de óleo essencial de cravo-da-índia em solução hidroalcoólica, Pelotas, RS, 2021.

Solução testada	Concentração (%) álcool etílico 92,8°	Mortalidade (%) média do teste
Óleo 0,5%	10	99,34 ^a
Óleo 1%	10	100 ^a
Óleo 2%	10	100 ^a
Controle positivo	10	100 ^a
Controle negativo	10	0,30 ^b

Obs: Médias com letras iguais indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de comparação médias de Tukey.

Controle negativo: solução hidroalcolica (90% de água destilada e 10% álcool etílico 92,8°). Controle positivo: solução com acaricida comercial Colosso Fc30 (diluição de 1:800).

DISCUSSÃO

Foi obtida máxima mortalidade de larvas *R. sanguineus*, 100%, em baixas concentrações do óleo essencial, 1% e 2%. Pela análise estatística a média de mortalidade do tratamento com óleo a 0,5% não teve diferença significativa dos demais tratamentos, com 1% e 2% de óleo, e nem do tratamento com acaricida comercial que também resultou em mortalidade máxima de larvas.

Resultado similar encontrado em estudo com larvas de carrapato bovino (15), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, nas quais se alcançou mortalidades de 100% em concentrações a partir de 0,5% com o óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

O efeito acaricida desse óleo é associado à presença de eugenol, nome genérico do 4-alil-2-metoxifenol. A análise em CG-EM identificou esse composto entre os constituintes químicos do óleo essencial testado a partir da comparação do espectro de massas gerado pela biblioteca NIST 17-S.

Na Figura 1 pode-se visualizar o cromatograma com os 7 picos referentes aos constituintes do óleo testado, os quais estão descritos na Tabela 2.

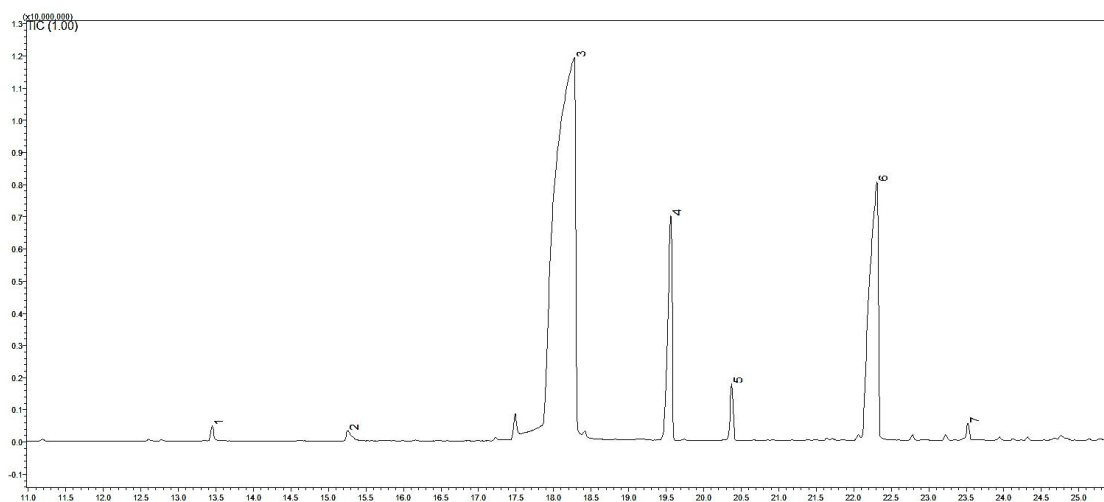


Figura 1. Cromatograma de CG-EM referente aos constituintes do óleo essencial de cravo-da-índia testado, LLIBIO UFPel, 2021.

A Figura 2 ilustra os espectros de massas dos componentes encontrados no óleo testado: Salicilato de Metila, Chavicol, Eugenol, Cariofileno, Humuleno, Acetato de Isoeugenol e Óxido de Cariofileno.

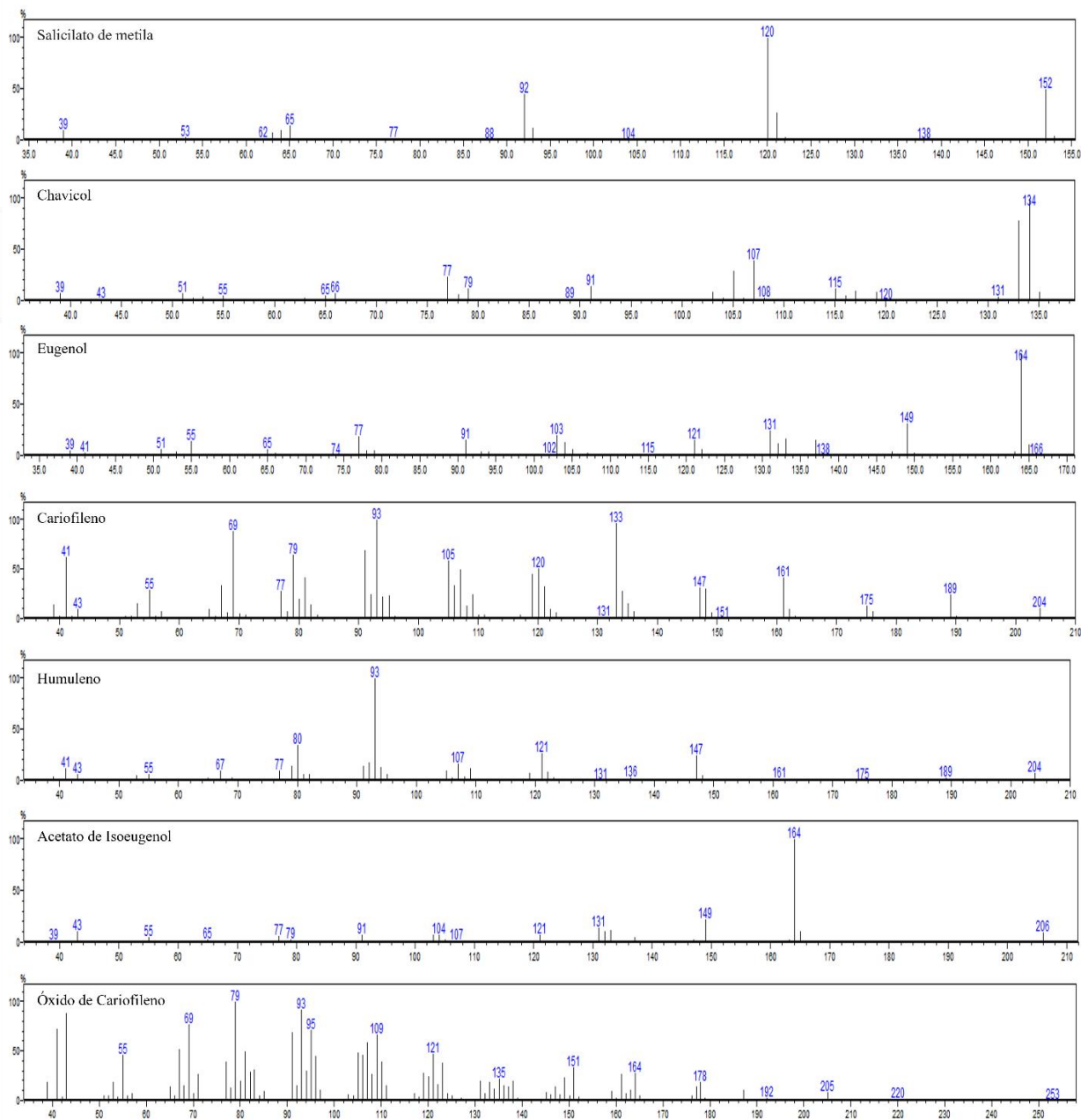


Figura 2. Espectros de Massas referentes aos constituintes do óleo de cravo-da-índia testado, LLIBIO UFPel, 2021.

Pela análise cromatográfica pode-se afirmar que o óleo testado possui os constituintes citados anteriormente, sendo o eugenol o majoritário, ocupando maior área na composição do óleo testado, conforme a Tabela 2.

O eugenol é um produto natural encontrado em maior quantidade no cravo-da-índia, *Eugenia caryophyllata* sinônimo botânica *Syzygium aromaticum*. Por isso escolhido foi o para o estudo, mas sabe-se que esse composto também pode ser abundante em diversas outras plantas aromáticas (16), como na Pimenteira-da-jamaica (*Pimenta dioica*, Myrtaceae), na Noz-moscada (*Myristica fragans*, Myristicaceae), na Canela (*Cinamomum verum*, Lauraceae) (17) e em Lamiaceae (18) como a alfavaca (*Ocimum gratissimum*) e o manjeriço (*O. basilicum*), sendo muitas dessas especiarias naturais cultivadas mundialmente e, de fácil extração e disponibilidade no mercado de óleos essenciais.

Tabela 2. Compostos presentes em amostra do óleo essencial testado, LLIBIO UFPel, 2021.

Pico	Nome	Área (%)
1	Salicilato de metila	0,35
2	Chavicol	0,39
3	Eugenol	68,11
4	Cariofileno	9,2
5	Humuleno	1,48
6	Acetato de Isoeugenol	20,27
7	Óxido de Cariofileno	0,39

Esse composto vem sendo amplamente estudado e explorado pela indústria farmacológica, já incorporada a produtos alimentícios, cosméticos e produtos odontológicos, por apresentar relevante potencial antimicrobiano além de ações antioxidantes. Sendo crescentes os estudos e o número de registro de patentes com eugenol nas últimas décadas (11).

Sabe-se que esse composto também apresenta propriedades nematicidas e larvicidas, porém esse potencial biológico tem sido timidamente explorado, corroborando para que novas pesquisas sejam desenvolvidas (19).

Quanto a ação acaricida, estudos vêm demonstrando a eficácia tanto do eugenol isolado de cravo-da-índia assim como de seu óleo essencial sobre teleóginas e larvas de carrapato bovino, *R. microplus*, e de outras espécies de ixodídeos (20-22). Já em carrapato de cão, existem poucos trabalhos, sendo a maioria deles com o Eugenol purificado e testado em associação com outros compostos de interesse industrial como o timol (20) cinamaldeído e o carvacrol (23).

Comparando o efeito acaricida do eugenol purificado com o óleo essencial de cravo-da-índia em carrapatos, pesquisadores vêm observando que o componente extraído e purificado não proporciona superioridade significativa na eficácia acaricida do que o óleo essencial de *S. aromaticum* (15,24), já que o eugenol é seu composto majoritário.

Sendo assim o óleo essencial de cravo-da-índia a melhor alternativa. Uma vez que seu óleo essencial é um produto de mais fácil acesso, menor custo, de alto rendimento no processo extrativo e de menor impacto ambiental, não necessitando o uso de solventes orgânicos necessários para a obtenção do eugenol purificado (15).

A solução testada foi de fácil elaboração, utilizando produtos de ampla disponibilidade no mercado, o que facilita a repetição dessa solução em futuros ensaios.

De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial de cravo-da-índia, *S. aromaticum*, diluído em soluções hidroalcoólicas demonstrou ser uma alternativa promissora para o controle desse carrapato. Exercendo máxima ação acaricida sobre larvas não alimentadas de *R. sanguineus* em baixas concentrações, a partir de 0,5%. Restando ainda descobrir a menor dose efetiva sobre larvas de *R. sanguineus*, bem como estudos de repelência larval e tempo de ação residual desse óleo, bem como de ensaios de toxicidade do eugenol e dos demais componentes presentes no óleo essencial testado.

CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* em doses a partir de 0,5% de concentração, diluído em solução hidroalcoólica, demonstrou excelente ação acaricida sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus* em ensaios *in vitro*. Os resultados encontrados são importantes no campo da saúde única, podendo futuramente ser uma alternativa mais sustentável para o controle de infestações ambientais pelo carrapato-vermelho-do-cão.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao professor Martin Pereira de Pereira e ao Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica da UFPel pelo estudo cromatográfico, ao pesquisador Marcos Valério Garcia pelo apoio e orientações quanto aos testes e incubação de carrapatos, a todos os colaboradores que doaram as amostras de carrapatos e ao Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPel pela estrutura e equipamentos cedidos.

REFERÊNCIAS

1. Marusik YM, Böcher J, Makarova O, Gerecke R, Behan-Pelletier V. Arachnida. In: Saari S, Näreaho A, Nikander S. Canine Parasites and Parasitic Diseases. Cambridge: Academic Press; 2018. Chap. 9, p. 187-228. doi: 10.2307/2465.
2. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotou A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe Rickettsioses. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(11):1-8. doi: 10.1371/journal.pntd.0000338.
3. Aguiar CLG, Pinto DM, Pappen FG, Cunha Filho NA, Santos TRB, Faria NAR. Parâmetros da fase de vida livre de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): adaptado ao clima subtropical. Arq Inst Biol. 2013;80(4):375-80. doi: 10.1590/s1808-16572013000400001.
4. Becker S, Webster A, Doyle RL, Martins JR, Reck J, Klafke GM. Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, Latreille (Acari: Ixodidae). Ticks Tick Borne Dis. 2019;10(5):1046-50. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.05.015.
5. Borges MF, Soares SF, Fonseca IN, Chaves VV, Cristina C, Louly B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. Rev Patol Trop [Internet]. 2007 [cited 15 Mar 2022];36(1):87-95. Available from: <https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/166/1/ACARICIDE.pdf>
6. Mendes TM, Balbino JNF, Silva NCT, Farias LA. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*: uma revisão sobre as perspectivas, distribuição e resistência *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*: a review on the prospects, distribution and resistance. PUBVET. 2019;13(6):1-9. doi:10.31533/pubvet.v13n6a347.1-9
7. Lázaro SF, Fonseca LD, Fernandes RC, Tolentino JS, Martins ER, Duarte ER. Efeito do extrato aquoso do algodão de seda (*Calotropis procera* Aiton) sobre a eficiência reprodutiva do carrapato bovino. Rev Bras Plantas Med. 2012;14(2):302-5. doi: 10.1590/S1516-05722012000200008.
8. Melo MM, Oliveira NJF, Lago LA. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e gatos. Parte II: amitraz, estricnina, fluoracetado de sódio e fluoracetamida, rodenticidas anticoagulantes e avermectinas. Rev Educ Contin Med Vet Zootec CRMV-SP. 2002;5(3):259-67. doi: 0.36440/recmvz.v5i3.3292.

9. Chagas ACS, Passos WM, Prates HT, Leite RC, Furlong J, Fortes ICP. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. Braz J Vet Res Anim Sci. 2002;39(5):247-53. doi: 10.1590/s1413-95962002000500006.
10. Salman M, Abbas RZ, Israr M, Abbas A, Mehmood K, Khan MK, et al. Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against *Rhipicephalus* ticks in cattle. VetParasitol [Internet]. 2020;283:109178. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109178.
11. Fernandes MJG, Pereira RB, Pereira DM, Fortes AG, Castanheira EMS, Gonçalves MST. New eugenol derivatives with enhanced insecticidal activity. Int J Mol Sci. 2020;21(9257):1-14. doi: 10.3390/ijms21239257.
12. Mendes EC, Mendes MC, Sato ME. Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. Exp Appl Acarol. 2013;61:357-69. doi:10.1007/s10493-013-9697-3.
13. Andreotti R, Koller WW, Garcia MV. Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo. Brasília: Embrapa; 2016.
14. Sabatini GA, Kemp DH, Hughes S, Nari A, Hansen J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. Vet Parasitol. 2001;95(1):53-62. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00406-4.
15. Ferreira FM, Delmonte CC, Novato TLP, Monteiro CMO, Daemon E, Vilela FMP, et al. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. Med Vet Entomol. 2018;32(1):41-7. doi: 10.1111/mve.12259.
16. Oliveira RA, Reis TV, Sacramento CK, Duarte LP, Oliveira FF. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. Rev Bras Farmacogn. 2009;19(3):771-5. doi: 10.1590/s0102-695x2009000500020.
17. Castro CC, Silva ARC, Franco CJP, Siqueira GM, Cascaes MM, Nascimento LD, et al. Caracterização química do óleo essencial das folhas, galhos e frutos de *Cinnamomum verum* J. Presl (Lauraceae). Braz J Dev. 2020;6(6):41320-33. doi: 10.34117/bjdv6n6-609.
18. Pereira CAM, Maia JF. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). Food Sci Technol. 2007;27(3):624-32. doi: 10.1590/S0101-20612007000300030.
19. Sousa PSA, Rodrigues MG, Alvarenga EM. Prospecção tecnológica com ênfase nas atividades biológicas nematocida e larvicida do óleo essencial do cravo-da-índia e do eugenol. Cad Prospeccao. 2020;13(1):154-70. doi: 10.9771/cp.v13i1.29624.
20. Coelho L, Paula LGF, Alves SGA, Sampaio ALN, Bezerra GP, Vilela FMP, et al. Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. Vet Parasitol. 2020;277:108989. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.108989.
21. De Monteiro CM, Maturano R, Daemon E, Catunda FEA, Calmon F, De Souza Senra T, et al. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and Segalla CC, Pinheiro NB, Ferraz A, Poletti T, Ongaratto RF, Ribeiro CM et al. Estudo in vitro da eficácia do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) sobre fase larval de *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. e Zootec. 2022 ; v29: 001-010.

- Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. Parasitol Res. 2012;111(3):1295-300. doi: 10.1007/s00436-012-2964-0.
22. Valente PP, Amorim JM, Castilho RO, Leite RC, Ribeiro MFB. *In vitro* acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol Res. 2014;113(1):417-23. doi: 10.1007/s00436-013-3670-2.
23. Senra TOS, Calmon F, Zeringóta V, Monteiro CMO, Maturano R, Matos RS, et al. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Parasitol Res. 2013;112(10):3471-6. doi: 10.1007/s00436-013-3527-8.
24. Lambert MM, de Almeida Chaves DS, de Avelar BR, Campos DR, Borges DA, Moreira LO, et al. *In vitro* evaluation of the acaricidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) essential oil and eugenol against non-fed larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. Rev Bras Med Vet. 2021;43(1):e002620. doi: 10.29374/2527-2179.BJVM002620

Recebido em: 30/03/2022

Aceito em: 10/08/2022