

ANDRÉ DE SOUZA E SILVA

**CARRAPATICIDA DE *Melaleuca*
armillaris: PREVENÇÃO DE LESÕES
TECIDUAIS EM HUMANOS**

Trabalho Final do Mestrado Profissional,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Aplicadas à Saúde.

**POUSO ALEGRE
2021**

ANDRÉ DE SOUZA E SILVA

**CARRAPATICIDA DE *Melaleuca*
armillaris: PREVENÇÃO DE LESÕES
TECIDUAIS EM HUMANOS**

Trabalho Final do Mestrado Profissional,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Aplicadas à Saúde.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça

COORIENTADOR: Prof. Dr. José Dias da Silva Neto

**POUSO ALEGRE
2021**

Silva, André de Souza

Carrapaticida de *Melaleuca armillaris*: prevenção de lesões teciduais em humanos / André de Souza e Silva. -- Pouso Alegre: UNIVÁS, 2021.
x, 28f. : il.

Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade do Vale do Sapucaí, 2021.

Título em Inglês: *Melaleuca armillaris tick: prevention of tissue damage in humans.*

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça
Coorientador: Prof. Dr. José Dias da Silva Neto

1. Infestações por Carrapato. 2. Acaricidas. 3. Fitoterapia. 4. Óleos voláteis. 5. Melaleuca. I Título.

CDD - 615.321

UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAÍ

**MESTRADO PROFISSIONAL EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**

COORDENADORA: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, por tornar esta realização possível, sem Ele nada seria atingível. À minha família, que sempre foi meu refúgio e minha fonte de positividade. À minha mãe **ISAURA NISCH**, que é exemplo de hombridade, honestidade, amor, perseverança e determinação. Ao meu pai **IRINEU ERNANI DE SOUZA E SILVA**, por ser exemplo de persistência, dedicação e empenho no que se propõe a fazer. À minha irmã **CAROLINE DE SOUZA E SILVA**, por sua fraternidade e exemplo de coragem. À minha sogra **GUIOMAR DIAS PEREIRA MUNIZ**, pelo carinho e respeito maternal.

À minha amada esposa, **JAQUELINE JOICE MUNIZ**, que sempre esteve ao meu lado, segurou minha mão nos momentos difíceis, foi meu esteio quando precisei, incentivou-me a seguir em frente, a buscar mais conhecimento. À minha princesa **CECÍLIA MUNIZ DE SOUZA E SILVA**, que sabe ensinar com o olhar e o sorriso que o amor está nos gestos mais simples. Ao meu “filho de quatro patas” **BÓRIS**, meu companheiro de estripulias, que com sua doçura e sabedoria canina, torna minha vida mais alegre. Tenho plena convicção que esta conquista só foi possível porque vocês estavam comigo! Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. **JOSÉ DIAS DA SILVA NETO** PRÓ REITOR DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA DA UNIVÁS E CO-ORIENTADOR DESSE TRABALHO, profissional inovador e incentivador do MPCAS.

À PROF.^a DR.^a **ADRIANA RODRIGUES DOS ANJOS MENDONÇA**, COORDENADORA DO MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE (MPCAS) E ORIENTADORA DESSE TRABALHO pela sua dedicação, orientação, paciência, pelos exemplos de profissionalismo e ética.

A todos os DOCENTES do MPCAS da UNIVÁS que: através de seus conhecimentos e exemplos contribuíram para com este trabalho. Em especial à PROF.^a DR.^a **FIORITA GONZALES LOPES MUNDIM**, à PROF.^a DR.^a **BEATRIZ BERTOLACCINI MARTÍNEZ** e ao PROF. DR. **TAYLOR BRANDÃO SCHNAIDER** pela participação e grande colaboração na banca de qualificação do trabalho final.

Aos COLEGAS DE MESTRADO por compartilhar suas experiências e fomentar o crescimento mútuo.

À COLEGA **MAÍSA VILAS BOAS SILVA**, GRADUANDA EM BIOLOGIA DA UNIVÁS E ALUNA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA: que acompanhou e contribuiu com esse estudo, em todas as etapas.

Aos TÉCNICOS DE LABORATÓRIO **JOICE BALBINO E JOSÉ DONIZETI REIS**, pelos auxílios nos experimentos, esclarecimentos e paciência.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SECRETARIA DO MPCAS, LIDERADOS POR **GUILHERME OLIVEIRA SANTOS**, por toda atenção dispensada e profissionalismo.

Ao PROFESSOR **PAULO ROBERTO MAIA**: pelo apoio e suporte nas análises estatísticas.

Aos GERENTES E DONOS DAS FAZENDAS que abriram as porteiras de suas propriedades e disponibilizaram seus animais, para que esse estudo fosse possível.

A todos que de alguma maneira, fizeram parte dessa minha trajetória, meus sinceros agradecimentos.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.” John Ruskin (1819-1900)

SUMÁRIO

1 CONTEXTO.....	1
2 OBJETIVOS	5
3 MÉTODOS	6
3.1 Delineamento e Local do estudo.....	6
3.2 Obtenção do óleo essencial de <i>Melaleuca armillaris</i>	6
3.3 Coleta dos carrapatos.....	6
3.4 Avaliação <i>in vitro</i> da ação carrapaticida do óleo essencial de <i>Melaleuca armillaris</i> – Projeto piloto 1	7
3.5 Avaliação comparativa da ação carrapaticida <i>in vitro</i> do hidrolato e óleo essencial de <i>Melaleuca armillaris</i> – Projeto piloto 2	9
3.6 Desenvolvimento de produto à base de <i>Melaleuca armillaris</i>	9
3.7 Avaliação <i>in vitro</i> ação carrapaticida de produto a base de óleo essencial de <i>Melaleuca armillaris</i>	10
3.8 Análise estatística	11
4 RESULTADOS	12
4.1 Descrição dos resultados.....	12
4.2 Produto.....	16
5 DISCUSSÃO.....	17
5.1 Aplicabilidade.....	19
5.2 Impacto social.....	19
6 CONCLUSÃO.....	20
7 REFERÊNCIAS.....	21
NORMAS ADOTADAS	26
ANEXO	27
FONTES CONSULTADAS	28

RESUMO

Contexto: Carrapatos são causadores de lesões de pele e importantes vetores na transmissão de doenças infecciosas a animais e humanos. Seu controle tem sido dificultado pela resistência aos carrapaticidas sintéticos. **Objetivos:** Desenvolver fórmula farmacêutica à base de *Melaleuca armillaris* e avaliar sua ação carrapaticida *in vitro*. **Métodos:** Trata-se de um estudo experimental, *in vitro*, realizado no Laboratório de Fitoterapia da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS) Pouso Alegre-MG. Das folhas de *M. armillaris*, foram extraídos por hidrodestilação o óleo essencial e hidrolato. Foram coletados carrapatos de bovinos utilizando a técnica de rotação manual anti-horária e colocados em tubo de ensaio. Foram realizados quatro ensaios: o primeiro, avaliou-se a ação carrapaticida do óleo essencial de *M. armillaris*, quando aplicado diretamente (gotejamento no carrapato) e indiretamente (gotejamento em gaze de vedação do tubo de ensaio). A letalidade dos carrapatos foi avaliada utilizando lupa estereoscópica. No segundo ensaio, comparou-se a ação carrapaticida do óleo essencial e hidrolato de *M. armillaris*, pelas técnicas de imersão e aspensão. Já no terceiro ensaio, foram desenvolvidas duas fórmulas farmacêuticas à base de óleo essencial de *M. armillaris* (concentrações de 1 e 2,5%, solubilizadas em glicerina), testadas pela técnica de imersão dos carrapatos, onde a ação carrapaticida foi avaliada 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 e 72 horas após o contato com o produto. Em seguida, no quarto ensaio, para avaliar se a glicerina, que compõe os produtos possuía ação carrapaticida, a letalidade foi avaliada nos tempos 24, 48 e 72 horas. **Resultados:** o óleo essencial de *M. armillaris* possui ação carrapaticida quando aplicado diretamente sobre carrapatos; o hidrolato, independente se aplicado por aspensão ou imersão, não possui ação carrapaticida. Os produtos à base de *M. armillaris* possuem ação carrapaticida após 72 horas de aplicação, por imersão *in vitro* ($p=0,000$). **Conclusão:** Foram desenvolvidas duas fórmulas farmacêuticas à base de óleo essencial de *M. armillaris*, com ação carrapaticida *in vitro*.

Palavras-chave: Infestações por Carrapato. Acaricidas. Fitoterapia. Melaleuca. Óleos Voláteis.

ABSTRACT

Context: Ticks cause skin lesions and are important vectors in the transmission of infectious diseases to animals and humans. Its control has been hampered by resistance to synthetic ticks. **Objectives:** To develop a pharmaceutical formula based on *Melaleuca armillaris* and evaluate its tick action *in vitro*. **Methods:** This is an experimental study, *in vitro*, carried out at the Phytotherapy Laboratory of University of Vale do Sapucaí (UNIVAS), Pouso Alegre-MG. Essential oil and hydrolate were extracted, by hydrodistillation technique, from *M. armillaris* leaves. Bovine ticks were collected using manual counterclockwise rotation technique, and placed in test tube. Four tests were carried out: the first, the tick action of the essential oil of *M. armillaris* was evaluated when directed (drip on the tick) and indirectly (drip in the test tube sealing glance). Tick lethality was assessed using a stereoscopic magnifying glass. In the second test, the tick action of the essential oil and hydrolate of *M. armillaris* was compared, using the techniques of immersion and spraying. In the third trial, two pharmaceutical formulas based on *M. armillaris* essential oil (concentrations of 1 and 2.5%, solubilized in glycerin) were developed, tested by the tick immersion technique, where the tick action was evaluated at 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 and 72 hours after contact with product. Then, in the fourth trial, to assess whether the glycerin, which compose the products had a tick action, lethality was assessed at 24, 48 and 72 hours. **Results:** The essential oil of *M. armillaris* has a tick action when applied directly to ticks; hydrolate, regardless of whether it is applied by spraying or immersion, has no tick action. Products based on *M. armillaris* have a tick action after 72 hours of application, by immersion *in vitro* ($p = 0.000$). **Conclusion:** Two pharmaceutical formulas based on *M. armillaris* essential oil have been developed, with *in vitro* tick action.

Keywords: Tick Infestations. Acaricides. Phytotherapy. Melaleuca. Oils Volatile

1 CONTEXTO

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos de animais vertebrados, podem ser encontrados em áreas de arbustos, árvores ou gramíneas (ESTRADA-PEÑA, 2015) e pertencem ao filo *Arthropoda* e a ordem Ixodida (DANTAS-TORRES *et al.*, 2019).

Existem aproximadamente 956 espécies de carrapatos descritas no mundo, distribuídas nas famílias *Ixodidae*, *Argasidae* e *Nuttalliellidae*. No Brasil são descritas 70 espécies, algumas, importantes para a Saúde Pública e Veterinária, como *Rhipicephalus* sp e *Amblyomma* sp (DANTAS-TORRES *et al.*, 2019).

Os carrapatos passam por diferentes fases de desenvolvimento: larva, ninfa e adulto (DANTAS-TORRES *et al.*, 2019). O ciclo biológico dos carrapatos da família *Ixodidae* inicia-se pela deposição de grande massa de ovos no solo pela fêmea após a cópula no hospedeiro. Então, as larvas eclodem e tem um período de adaptação de 5 a 6 dias. Estas ficam à espera do hospedeiro e depois de se alimentarem nos mesmos, tornam-se ninfas e em seguida chegam à fase adulta, no solo ou hospedeiro. As fêmeas morrem após terem encontrado lugar protegido para fazer oviposição e os machos podem permanecer no hospedeiro por 4 meses ou mais (MARTINS, 2019).

Os carrapatos são importantes vetores na transmissão de doenças infecciosas que afetam animais e o homem, podendo causar prejuízo na atividade pecuária, aumento de morbidade e mortalidade em pequenos animais e seres humanos (ESTRADA-PEÑA, 2015). Importante motivo a ser analisado em saúde humana e animal, por estarem intimamente relacionadas (SPRINGER *et al.*, 2021).

Dentre os patógenos transmitidos através de carrapatos estão: alguns vírus, bactérias, protozoários e helmintos (BENELLI, 2020; SPRINGER *et al.*, 2021), transmitindo a humanos, doenças como Anaplasmose, Babesiose e Febre Maculosa (FM) (ROCHLIN & TOLEDO, 2020).

Carrapatos do gênero *Amblyoma* sp são possíveis transmissores da doença de Lyme no Brasil, causada por *Borrelia burgdorferi*; são também transmissores de FM (*Rickettsia rickettsii*) e febre recorrente (*Borrelia recurrentis*). Já nos Estados Unidos a Doença de Lyme e FM (conhecida como febre das montanhas rochosas) é causada pelo carrapato do gênero *Ixodes*. O carrapato *Rhipicephalus* sp tem grande importância econômica, devido a

patogenicidade de transmissão de protozoários como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, que juntos causam a tristeza parasitária bovina (MARTINS, 2019).

Os carrapatos, ao fixarem à pele do hospedeiro, para ingerir sangue ou fluidos de tecidos, causam lesões teciduais. O hipostômio, estrutura de fixação, é utilizado como âncora para que o carrapato se fixe e seu aparelho bucal penetre na pele do hospedeiro, causando laceração de tecidos e vasos sanguíneos (ANDERSON, 2002). Então, o carrapato ingere sangue e outros líquidos tissulares do hospedeiro e regurgita saliva, inoculando o microorganismo no hospedeiro. Além disso, a saliva contribui para a fixação do carrapato ao hospedeiro (MASSARD & FONSECA, 2004).

A dilaceração de células e tecidos, a compressão de células, o hematofagismo e a inoculação de substâncias de alto peso molecular pela saliva do carrapato, causam danos diretos à pele do hospedeiro (ANDERSON, 2002).

No caso específico da Febre Maculosa Brasileira (FMB), após a picada do carrapato infectado com *Rickettsia rickettsi*, essa bactéria se dissemina através de vasos linfáticos e sanguíneos, ocorrendo assim disseminação para tecido endotelial de cérebro, pulmões, coração, fígado, baço, pâncreas e trato gastrointestinal, ocasionando lesões teciduais (DEL FIOLE *et al.*, 2010).

As lesões teciduais em doenças causadas por carrapato, como por exemplo: rickettsiose, são utilizadas como forma de diagnóstico diferencial de outras doenças, com sintomas sistêmicos em comum. Germanakis *et al.*, (2014), relata que: uma escara de inoculação característica, no local da picada do carrapato, pode ser ferramenta clínica útil para diagnóstico de rickettsioses.

Há diversas estratégias para controle de carrapatos, sendo que os carrapaticidas/acaricidas químicos, são os mais utilizados: dentre eles os carrapaticidas de contato, que são aplicados por meio de pulverização, imersão e *pour on* (aplicação no dorso do animal): organofosforados e piretróides deltametrina e cipermetrina, que atuam em canais iônicos alterando potencial de ação e conseqüentemente culminam em fibrilação, descargas espontâneas no sistema nervoso e no músculo, como também fenilpirazoles, que atuam sobre o sistema nervoso central dos carrapatos, bloqueando os impulsos nervosos (RAYNAL *et al.*, 2015).

Além dos carrapaticidas de contato, há também os de uso sistêmico, que são aplicados por meio de injeções ou *pour on*. Fazem parte desse grupo as lactonas macrocíclicas

avermectinas e milbemicinas, que atuam em canais dependentes de glutamato e canais de ácido gama amino butírico (GABA), e as benzofenilurétrias, que inibem o crescimento de carrapato ou impedem que os mesmos mudem de fase (RAYNAL *et al.*, 2015).

O uso constante de carrapaticidas sintéticos, resultou em carrapatos com resistência às principais classes de acaricidas (ADENUBI *et al.*, 2016). Além disso, a resistência a carrapaticidas sintéticos, leva ao aumento na frequência de aplicação do acaricida. Situação que pode causar a presença dos mesmos, em produtos animais como leite e carne (RAYNAL *et al.*, 2015); desencadeando-se grande problema para a pecuária, em regiões tropicais e subtropicais no planeta, devido às perdas econômicas (ADENUBI *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o uso de plantas medicinais com ação carrapaticida, tem despertado interesse de vários pesquisadores para reduzir os casos de agressão ao meio ambiente e resistência ao princípio ativo sintético (GOODE *et al.*, 2018; NWANADE *et al.*^a, 2020). A espécie de carrapato mais testada, frente a carrapaticidas de origem natural é o *Ripicephalus microplus* (NWANADE *et al.*^a, 2020).

De acordo com Benelli *et al.* (2016), as plantas medicinais mais frequentemente exploradas pelo efeito acaricida, pertencem às famílias *Asteraceae* (15%), *Lamiaceae* (10%), *Fabaceae* (9%), *Solanaceae* (6%), *Meliaceae* (5%) e *Verbenaceae* (5%). São exemplos dessas plantas: *Acmella oleraceae* (jambu), *Lavandula angustifolia* (lavândula ou alfazema), *Soja hispida* (soja), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Azadirachta indica* (nim) e *Lantana camara* (cambará), respectivamente.

O Brasil é o país que lidera as publicações sobre acaricidas e repelentes botânicos contra carrapatos (NWANADE *et al.*^a, 2020), porém até o momento, não há estudos sobre efeito carrapaticida da *Melaleuca armillaris* (*M. armillaris*), assim como outras espécies (*M. leucadendra* e *M. alternifolia*).

A *M. armillaris* pertence à família *Myrtaceae* e tem ampla distribuição mundial (BULDAIN *et al.*, 2018). O principal constituinte do óleo essencial de *M. armillaris* é 1,8 Cineol, seguido de Terpene-4-ol, com ações antimicrobiana, antioxidante e anti-histamínica (CHABIR *et al.*, 2011; RIZK *et al.*, 2012; BULDAIN *et al.*, 2018, PAULIELLO *et al.*, 2019). A maioria dos estudos utilizando o gênero *Melaleuca* foram realizados com a espécie *M. alternifolia*, que demonstra também efeito antimicrobiano (FALCI *et al.*, 2015) e é utilizada em soluções farmacológicas de uso tópico (KONG *et al.*, 2019).

Neste cenário, ciente que os carrapatos, através de suas picadas são causadores de lesões cutâneas e também são importantes vetores de microorganismos causadores de doenças, e que o controle do carrapato tem sido dificultado pela resistência de populações aos acaricidas sintéticos, torna-se de extrema importância, o desenvolvimento de agentes carrapaticidas com princípio ativo natural e de eficácia comprovada.

2 OBJETIVOS

Desenvolver fórmula farmacêutica à base de *Melaleuca armillaris* e avaliar sua ação carrapaticida, *in vitro*.

3 MÉTODOS

3.1 Delineamento e Local do estudo

Trata-se de um estudo experimental, *in vitro*, realizado no Laboratório de Fitoterapia da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS) Pouso Alegre-MG.

3.2 Obtenção do óleo essencial e hidrolato de *Melaleuca armillaris*

A coleta de galhos e folhas de *Melaleuca armillaris*, foi realizada no viveiro do Laboratório de Botânica da UNIVÁS (em processo de registro no herbário). Após a coleta, os galhos e folhas foram distribuídos em tabuleiros e colocados para secar à sombra, com temperatura ambiente e baixa umidade relativa, até o ponto das folhas se soltarem naturalmente dos galhos. As folhas foram então selecionadas e utilizadas para a extração do óleo e hidrolato.

As folhas de *Melaleuca armillaris* foram trituradas e submetidas à extração por hidrodestilação, utilizando autoclave 2549 Greco e condensador, como citado por FALCI *et al.*, 2015. A autoclave arrasta o vapor e óleo até o condensador; este é circundado por uma lâmina de água que faz os compostos saírem do estado gasoso e migrarem para o estado líquido. Os líquidos que não são solúveis entre si formam duas fases e o óleo, por apresentar densidade menor, fica na parte superior. Por essa técnica, foi obtido o óleo essencial e um segundo produto. O hidrolato, substância líquida que contém os constituintes mais solúveis do óleo essencial.

3.3 Cálculo do tamanho da amostra e Coleta dos carrapatos

A coleta dos carrapatos se deu em 3 momentos distintos: a primeira e a segunda coleta foram realizadas em propriedade rural, na localidade de Cachoeirinha, município de Cachoeira de Minas - MG. Os animais da propriedade eram bovinos com aptidão leiteira. A primeira coleta foi realizada no mês de agosto de 2019 e os carrapatos foram destinados ao estudo da ação do óleo essencial de *Melaleuca armillaris* (Projeto Piloto 1). A segunda coleta

foi realizada no mês de setembro de 2019 e os carrapatos foram destinados à avaliação comparativa do óleo essencial e do hidrolato de *Melaleuca armillaris* (Projeto Piloto 2).

A terceira coleta de carrapatos foi realizada em junho de 2020, em fêmeas bovinas adultas com aptidão para corte, da raça *Aberdeen Angus*, de propriedade rural denominada Casa Branca Agropastoril, localizada na zona rural do município de Silvianópolis - MG. Os carrapatos desta coleta, foram destinados ao estudo da ação do produto à base de óleo essencial de *Melaleuca armillaris*. Para esta coleta, foi realizado o cálculo do tamanho da amostra, com base no resultado do projeto piloto 1 e na eficácia de 95% necessária para carrapaticidas (BRASIL, 2019), sendo definido como 60 o número mínimo de carrapatos por grupo (Anexo 1).

A técnica empregada para as três coletas de carrapatos, foi manual: por rotação anti-horária após inspeção visual (GRUHN *et al.*, 2019). Foram coletados carrapatos somente dos bovinos que apresentaram período mínimo de 35 dias, sem contato com produto utilizado em controle de carrapatos.

Os carrapatos foram acondicionados em frascos de vidro com tampa de rosca e foi colocado capim picado no frasco, a fim de manter grau de umidade e assim, preservar por maior tempo, a integridade dos carrapatos. Este procedimento foi adotado durante o transporte do local da coleta até o laboratório de fitoterapia. Foram utilizadas somente fêmeas adultas (teleóginas) ingurgitadas, sendo que essas foram reconhecidas por seu tamanho maior que machos (MARTINS, 2019).

3.4 Avaliação *in vitro* da ação carrapaticida do óleo essencial de *Melaleuca armillaris* – Projeto Piloto 1

Os carrapatos foram verificados um a um, por meio de lupa estereoscópica no laboratório de Fitoterapia da UNIVÁS. Os carrapatos que apresentaram lesões no aparelho bucal e de patas foram descartados, assim como os que apresentaram peso inferior a 0,100 gramas.

Os carrapatos foram classificados e pesados em placas de petri (Figuras 1 e 2), utilizando balança semi-analítica (Marte AD330), e acondicionados individualmente em tubos de ensaio; a vedação dos tubos foi feita por gaze, a fim de manter o fluxo de oxigênio. Foram divididos em 2 grupos: 1 e 2. Para os carrapatos do grupo 1 foi administrado uma gota do óleo

essencial diretamente sobre eles. Para os carrapatos do grupo 2 foi administrado uma gota do óleo essencial na gaze, que fazia a vedação dos tubos.

Após 72 horas da aplicação do óleo essencial de *Melaleuca armillaris*, os carrapatos de ambos os grupos foram avaliados quanto à letalidade (número de carrapatos mortos, enrijecidos), com auxílio de lupa estereoscópica.

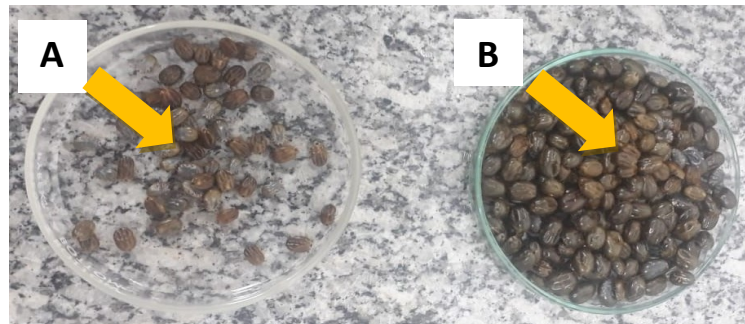


Figura 1. Carrapatos após classificação em lupa estereoscópica: carrapatos inaptos para o estudo (A), carrapatos aptos para o estudo (B).

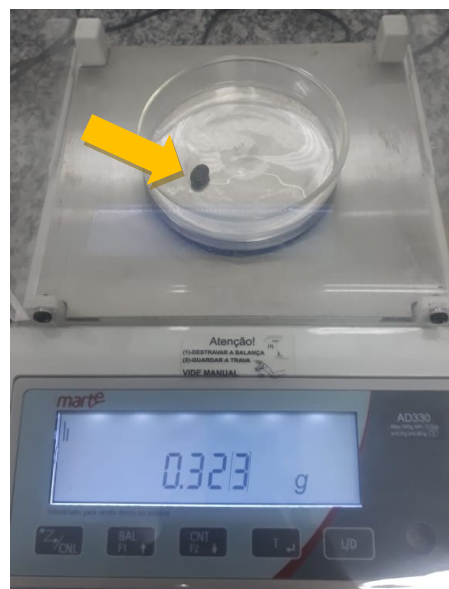


Figura 2. Pesagem dos carrapatos em balança semi-analítica Marte AD330.

3.5 Avaliação comparativa da ação carrapaticida *in vitro* do hidrolato e óleo essencial de *Melaleuca armillaris* – Projeto Piloto 2

Em laboratório, os carrapatos foram analisados individualmente, com auxílio de lupa estereoscópica. Os carrapatos que apresentaram lesões, foram descartados. Foram considerados aptos ao teste, cerca de 70 gramas de carrapatos (Figura 3). Tal montante foi dividido em 5 placas de Petri: óleo essencial por imersão (P1), hidrolato por imersão (P2), óleo essencial por aspersão (P3), hidrolato por aspersão (P4) e grupo controle (P5). Cada placa pesou cerca de 14 gramas de carrapatos.

Após 24 horas de aplicação do óleo essencial e do hidrolato de *Melaleuca armillaris*, por imersão e aspersão, os carrapatos dos cinco grupos foram avaliados quanto à letalidade, com auxílio de lupa estereoscópica. A mesma avaliação foi realizada 9 dias após aplicação inicial.



Figura 3. Exemplo de carrapatos classificados e aptos ao estudo.

3.6 Desenvolvimento de produto à base de *Melaleuca armillaris*.

Em farmácia de manipulação, foram desenvolvidas duas fórmulas à base de óleo essencial de *Melaleuca armillaris* e glicerina (excipiente sem ação farmacológica) em diferentes concentrações: 1% e 2,5%.

3.7 Avaliação *in vitro* da ação carrapaticida de produto à base de óleo essencial de *Melaleuca armillaris*

Foram coletadas 246 teleóginas; três teleóginas foram desclassificadas por apresentarem lesão no aparelho bucal e 59 foram desclassificadas por peso inferior a 0,100 gramas, restando 184 teleóginas aptas ao estudo.

Inicialmente, as teleóginas selecionadas, foram distribuídas em placas de Petri de acordo com os grupos: controle (n=60), produto 1% (n=60) e produto 2,5% (n=64) (Figura 4). As teleóginas do grupo controle não receberam nenhum tipo de tratamento. Foram avaliadas quanto à letalidade nos seguintes momentos: após a aplicação dos produtos, uma hora, duas horas, três horas, quatro horas, cinco horas, seis horas, 24 horas e 76 horas.

Posteriormente, as teleóginas do grupo controle (n=60), foram submetidas a segundo teste. Foram redistribuídas em quatro grupos, com 15 teleóginas cada: controle, glicerina, produto 1% e produto 2,5%. A avaliação quanto à letalidade foi realizada em: 24 horas, 48 horas e 72 horas, após aplicação dos produtos.

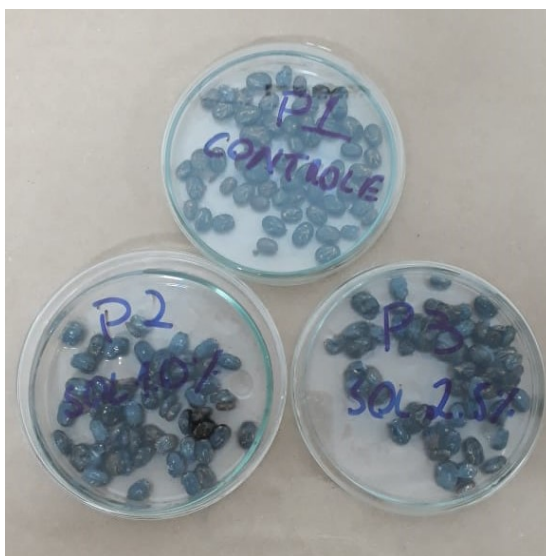


Figura 4. Carrapatos distribuídos nos três grupos de estudo: P1 (controle), P2 (produto 1%) e P3 (produto 2,5%).

3.8 Aspectos Éticos

Foi realizada consulta junto a Comissão de Ética para uso de Animais (CEUA), e por se tratar de estudo em carrapatos não se faz necessário o parecer da CEUA.

3.9 Análise estatística

Os dados foram tabulados no *Microsoft Excel* 2016 e submetidos à análise estatística. Foram utilizadas medidas de tendência central para variáveis quantitativas e frequência absoluta e relativa para variáveis categóricas. Foi utilizado o programa *Minitab* versão 18.1 e *Statistical Package for the Social Sciences, inc. (SPSS)* Chicago, USA, versão 22.0. O nível de significância utilizado como critério de aceitação ou rejeição nos testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$). Para análise dos resultados, foram aplicados: Teste Qui-Quadrado, utilizado quando ocorre mais de dois grupos independentes com respostas dicotômicas, para estudar a relação entre as respostas das variáveis com níveis categóricos; Teste Exato de Fisher, utilizado quando ocorrem dois grupos independentes, com respostas dicotômicas para estudar a relação entre as respostas das variáveis com níveis categóricos; Teste Q de Cochran, utilizado quando ocorrem mais grupos emparelhados, com respostas dicotômicas, para estudar a relação entre as respostas das variáveis com níveis categóricos.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição dos resultados

Para o projeto piloto 1, as teleóginas foram submetidas à classificação e pesagem. Foram consideradas aptas ao estudo, aquelas sem lesão e com peso superior a 0,100 gramas (n=31 por grupo) (Figura 5). Foi constatado que o óleo essencial de *Melaleuca armillaris*, possui ação carrapaticida quando em contato com as teleóginas (grupo 1). Esse resultado foi observado, ao realizar-se a contagem das teleóginas mortas no grupo 1 (n=31 teleóginas mortas, 100% de letalidade). Ao contrário, no grupo 2, no qual o óleo essencial de *M. armillaris* não teve contato direto com as teleóginas, não houve morte (n=0 teleóginas mortas, não houve mortes) (Figura 6).

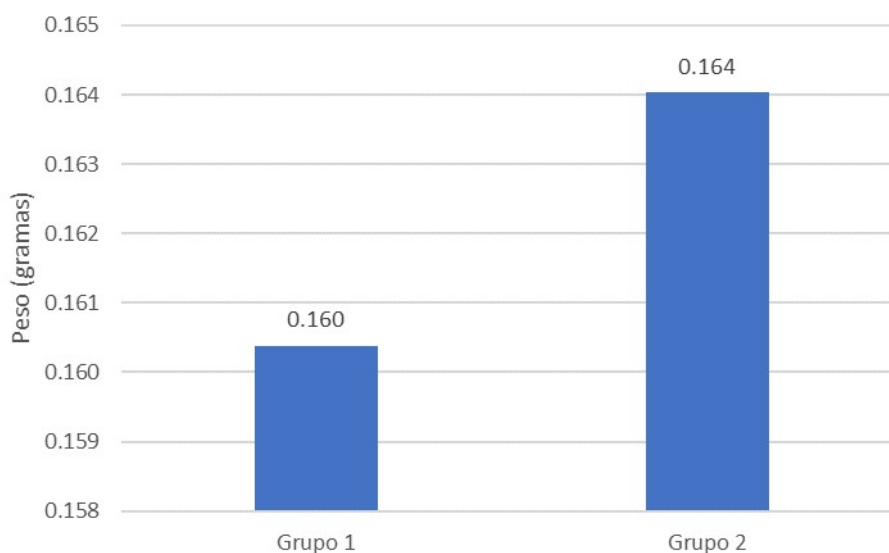


Figura 5. Peso (em gramas) das teleóginas do grupo 1 (aplicação direta do óleo essencial de *Melaleuca armillaris* sobre teleóginas; n=31) e do grupo 2 (aplicação indireta do óleo essencial de *Melaleuca armillaris* sobre teleóginas; n=31)

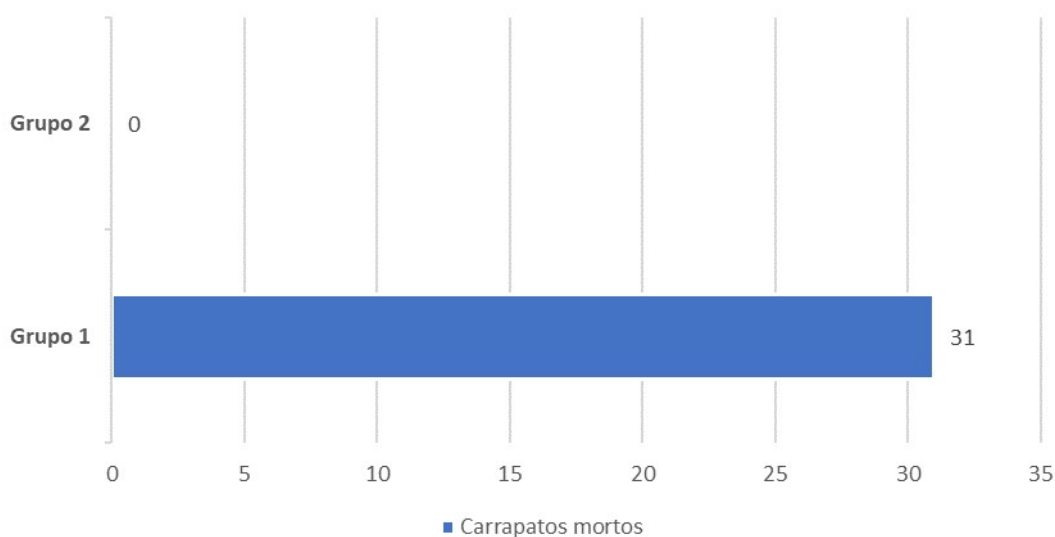


Figura 6. Ação carrapaticida do óleo essencial de *Melaleuca armillaris*, quando em contato com as teleóginas (grupo 1; n=31) e sem contato direto com as teleóginas (grupo 2; n=31).

No projeto piloto 2, as teleóginas foram distribuídas em 5 placas, que tiveram pesos equiparados (Figura 7). Constatou-se que o hidrolato de *M. armillaris* não foi eficaz quanto à ação carrapaticida (0% letalidade), tanto para aplicação através de imersão, quanto por aspersão. Já para o óleo essencial de *M. armillaris*, verificou-se que: tanto para as teleóginas submetidas à administração via imersão, quanto por aspersão, houve 100% de letalidade. As teleóginas do grupo controle continuaram seu ciclo natural e ocorreu ovopostura (Figura 8).

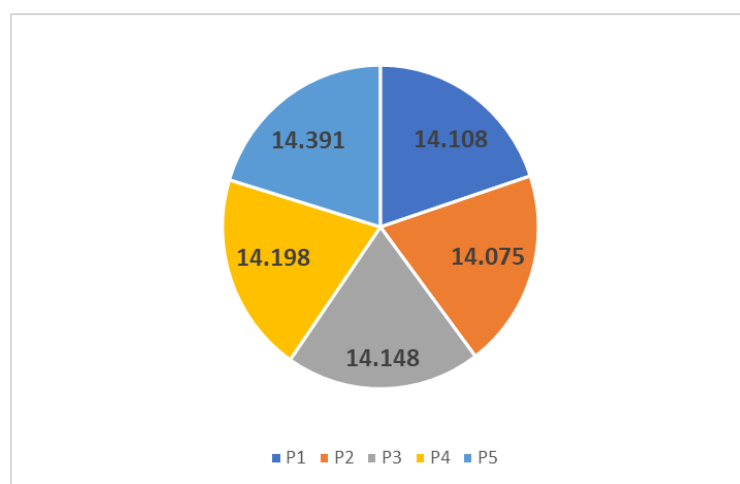


Figura 7. Peso (em gramas) das cinco placas do estudo piloto 2.

P1=Imersão em óleo essencial de *Melaleuca armillaris*. P2=Imersão em hidrolato de *Melaleuca armillaris*. P3=Aspersão em óleo essencial de *Melaleuca armillaris*. P4=Aspersão em hidrolato de *Melaleuca armillaris*. P5=Grupo controle.

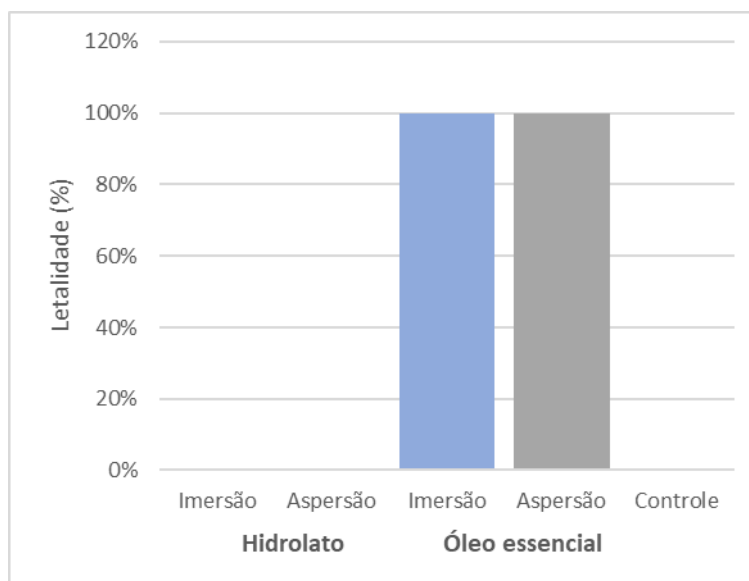


Figura 8. Letalidade de teleóginas do grupo controle e quando submetidas ao hidrolato e óleo essencial de *M. armillaris*, por imersão e aspersão.

Para avaliar a ação carrapaticida do produto à base de óleo essencial de *Melaleuca armillaris*, as teleóginas foram pesadas e divididas em três grupos: Controle (60 teleóginas na ausência de produto), 1% (60 teleóginas na presença de produto na concentração de 1%), 2,5% (64 teleóginas na presença de produto na concentração de 2,5%) (Figura 9). Em 72 horas, constatou-se letalidade de 100% das teleóginas do grupo 1% e do grupo 2,5% ($p=0,000$ versus grupo controle; Teste Qui-quadrado). Porém, não houve diferença estatística entre o grupo 1% e 2,5% ($p=1,000$; Teste de Fischer) (Figura 10).

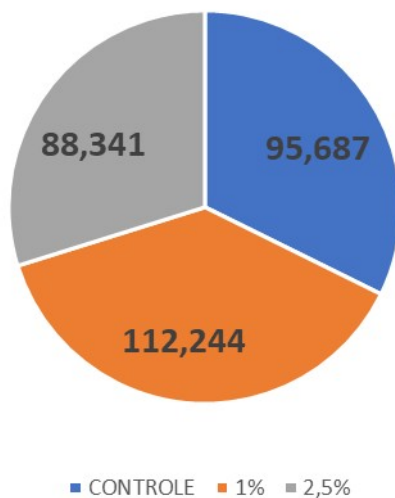


Figura 9. Peso (em gramas) do total de teleóginas de cada grupo:
 Controle= ausência de produto (n=60); 1%= presença de produto na concentração de 1% (n=60);
 2,5%=presença de produto na concentração de 2,5% (n=64)

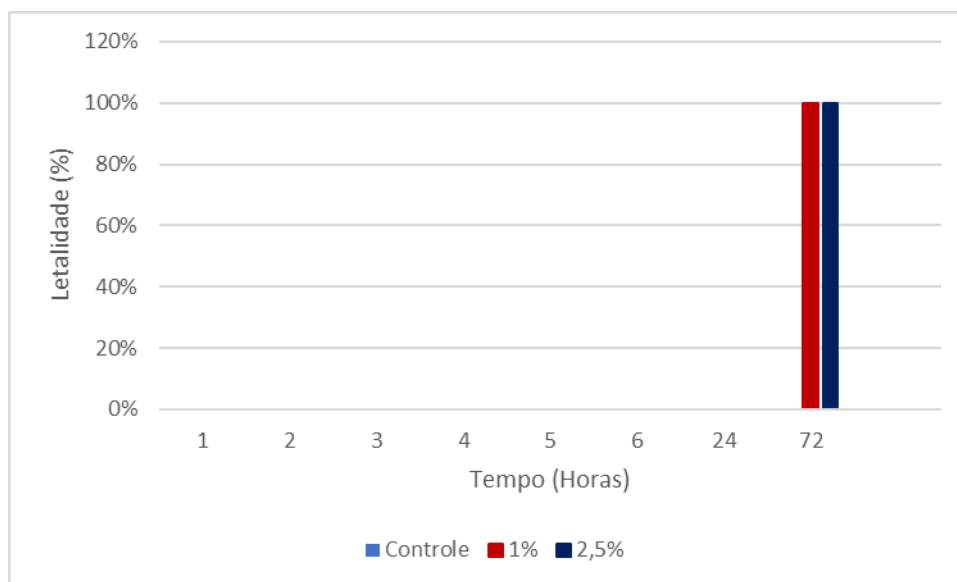


Figura 10. Letalidade de teleóginas dos três grupos em diferentes momentos.
 Controle= ausência de produto (n=60); 1%= presença de produto na concentração de 1% (n=60);
 2,5%=presença de produto na concentração de 2,5% (n=64)

A glicerina mostrou-se sem efeito carrapaticida, assim como o controle. Somente o produto a 2,5% após 72 horas, mostrou-se com eficácia carrapaticida de 100% (n=15 carrapatos por grupo) (Figura 11).

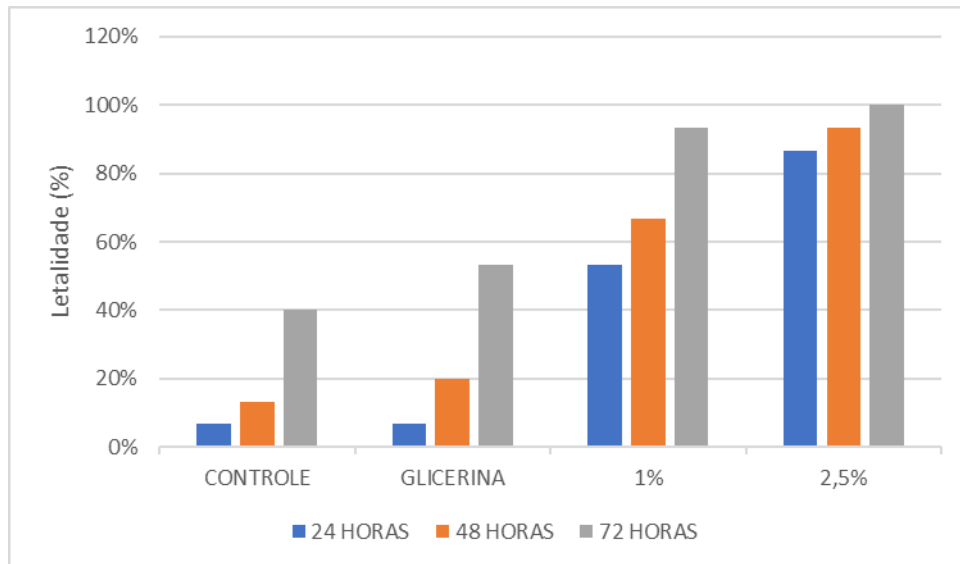


Figura 11. Letalidade de carrapatos no grupo controle, glicerina, produto a 1% e produto a 2,5% nos tempos 24, 48 e 72 horas (n=15 carrapatos por grupo).

4.2 Produto

No presente estudo, foi desenvolvido e testado *in vitro*, duas fórmulas à base de óleo essencial de *Melaleuca armillaris*, nas concentrações de 1 e de 2,5%. Demonstrou-se efeito após 72 horas da aplicação. O produto desenvolvido foi encaminhado para registro junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi desenvolvido carrapaticida à base de *M. armillaris*, que demonstrou efeito *in vitro* em carrapatos. É de grande importância a criação de novos carrapaticidas, devido ao aumento na incidência de lesões teciduais e doenças transmitidas por carrapatos (ESTRADA-PEÑA, 2015). Até o momento, não foram realizados estudos epidemiológicos precisos, sobre as doenças Anaplasmose, Babesiose e FM. A FM apresenta maior importância em Saúde Pública (DANTAS-TORRES, 2008; MAGGI e KRAMER, 2019).

As desvantagens no uso de acaricidas sintéticos incluem: aumento da resistência ao princípio ativo e a possibilidade de presença de resíduos de acaricida no ambiente e nos produtos de origem animal, trazendo riscos à saúde humana e ao ambiente (ABBAS *et al.*, 2014). Dessa maneira, alternativas ao uso de carrapaticidas sintéticos, vem sendo buscadas para controlar os carrapatos, sem causar danos à saúde dos animais e perdas econômicas. Alternativa relevante é a utilização de carrapaticidas à base de fitoterápicos, a exemplo do produto desenvolvido nesse trabalho.

Yim *et al.* (2016) relatou que óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, possui ação repelente à larva do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Porém, até o momento, a avaliação da espécie *M. armillaris* e seu potencial carrapaticida não havia sido realizado. Situação que demonstra o ineditismo da presente pesquisa.

Para desenvolver o carrapaticida à base de *M. armillaris*, foi realizado inicialmente projeto piloto: com o objetivo de verificar se a aplicação direta do produto nos carrapatos, teria resposta diferente da aplicação indireta (em gaze que vedava tubo de ensaio), sendo constatado que a aplicação direta do produto sobre os carrapatos foi eficaz e que a realizada de modo indireto não apresentou efeito carrapaticida.

O hidrolato de *M. armillaris* não exerceu efeito carrapaticida *in vitro*, independentemente da forma de aplicação (aspersão ou imersão). Da mesma maneira, Ferreira *et al* (2018), ao avaliar o efeito do *Syzygium aromaticum* (cravo), em estudo *in vitro* com carrapatos *R. microplus* observou que o óleo essencial dessa planta, produziu efeito carrapaticida, enquanto que o hidrolato não obteve resultados satisfatórios. O hidrolato é um dos produtos obtidos na extração de óleo essencial de diferentes plantas. Estudos anteriores, demonstram que os constituintes e efeitos do hidrolato de plantas medicinais, podem ser diferentes do óleo essencial (WAJS-BONIKOWSKA *et al.*, 2015; FERREIRA *et a.*, 2018;

LEI *et al.*, 2018; SAINZ *et al.*, 2019). Constatações que explicam o resultado observado neste trabalho. Acredita-se que a substância ativa responsável pela ação carrapaticida observada, esteja presente no óleo essencial de *M. armillaris* e ausente no hidrolato, obtido dessa planta. Visto que: quando testado o óleo essencial puro de *M. armillaris*, houve efeito carrapaticida *in vitro*.

A imersão dos carrapatos em óleo essencial puro de *M. armillaris*, mostrou efeito carrapaticida semelhante à aplicação deste produto por aspersão. Desta maneira, no presente estudo foram testadas duas diluições do óleo essencial de *M. armillaris*, aplicadas por imersão. Adenubi *et al.* (2018), em um estudo que avaliou várias publicações sobre carrapaticidas fitoterápicos, verificou-se que o método mais utilizado para testar ação carrapaticida à base de produtos naturais é por imersão.

A Portaria nº 88 de 6 de novembro de 2015 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta todos os ensaios clínicos, *in vitro*, *in vivo*, parâmetros de eficácia, de duração e de período de carência de produtos antiparasitários, no capítulo 5, item 9.2, recomenda que: os produtos antiparasitários classificados como carrapaticidas tenham eficácia de 95%. O produto desenvolvido no presente estudo demonstrou, em ambas concentrações: eficácia recomendada pelo MAPA, quando avaliado após 72 horas de aplicação. Em segundo momento, quando avaliou-se a ação carrapaticida da glicerina, também para os grupos do produto a 1% e 2,5%, observou-se que a concentração de 1% não atingiu eficácia de 100%, em 72 horas. Demonstra-se uma das limitações do estudo, pois nesse teste, os carrapatos permaneceram *in vitro* por mais tempo que nos testes anteriores. Dessa maneira, esse teste foi utilizado para descartar ação carrapaticida da glicerina, sendo que a ação carrapaticida do produto à base de óleo essencial de *M. armillaris*, ocorreu com 1% e 2,5%, em 72 horas de aplicação.

No presente trabalho, não foi estudado o mecanismo de ação do óleo essencial da *M. armillaris* como carrapaticida. Óleos essenciais geralmente não apresentam mecanismo de ação específico, devido à complexidade de sua composição (SALMAN *et al.*, 2020). Porém, Nwanade *et al.*^b. (2020), ao avaliar estudos de carrapaticidas à base de fitoterápicos, observou que: muitos deles causam mudança de estrutura do carrapato, em glândula salivar e reprodutiva, de extrema importância para fixação e atividade do carrapato. Apesar de não ter sido realizado estudo diretamente com o óleo essencial de *M. armillaris*, acredita-se que: 1,8 cineol, principal componente desse óleo, apresentou efeito tóxico ao carrapato. Dessa

maneira, acredita-se que o produto aqui desenvolvido, tenha efeito carrapaticida devido ao 1,8 cineol, presente no óleo de *M. armillaris*.

Neste estudo não foram avaliadas a ação do carrapaticida em animal e também não avaliou-se sua presença nos produtos como leite e carne. Despontando-se perspectivas para futuros estudos *in vivo* em animais e humanos.

5.1 Aplicabilidade

Devido à resistência apresentada pelos carrapatos aos produtos presentes no mercado, o presente estudo apresenta perspectiva para utilização como alternativa aos carrapaticidas sintéticos.

O produto à base de *M. armillaris* desenvolvido no presente estudo, desponta perspectiva para ser ferramenta preventiva à infestação de animais e também para doenças humanas; com possibilidades de ser testado e apresentar-se com menor risco à saúde de diversos tipos de animais, sem determinar ameaça ao ambiente.

5.2 Impacto Social

O carrapaticida à base de *M. armillaris* pode reduzir o impacto ambiental causado pelo uso de carrapaticidas sintéticos, reduzir também os casos de presença de componentes sintéticos em produtos animais como: carne e leite. Apresentar menor toxicidade que os carrapaticidas sintéticos e prevenir lesões teciduais e doenças em humanos transmitidas por carrapatos. O fator impactante do produto desenvolvido no presente estudo está vinculado à possibilidade de apresentar-se em duas concentrações diferentes e custo menor que os produtos sintéticos disponíveis no mercado.

6 CONCLUSÃO

Foi identificado que o óleo essencial de *M. armillaris* quando em contato direto com carrapatos possui ação carrapaticida. Já o hidrolato de *M. armillaris* não possui ação carrapaticida mesmo quando em contato direto com carrapatos.

Foram desenvolvidas duas fórmulas farmacêuticas à base de óleo essencial de *M. armillaris* com ação carrapaticida *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS

Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Vet Parasitol.* 2014 Jun 16;203(1-2):6-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.006. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24709006.

Adenubi OT, Fasina FO, McGaw LJ, Eloff JN, Naidoo V. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. *South African Journal of Botany.* 2016 July; 105: 178-93

Adenubi OT, McGaw LJ, Eloff JN, Naidoo V. In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. *Vet Parasitol.* 2018 Apr 30; 254: 160-71. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.03.008. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29657003.

Anderson JF. The natural history of ticks. *Med Clin North Am.* 2002 Mar;86(2):205-18. doi: 10.1016/s0025-7125(03)00083-x. PMID: 11982298.

Benelli G, Pavea R, Canale A, Mehlhorn H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? *Parasitol Res.* 2016 Jul;115(7):2545-60. doi: 10.1007/s00436-016-5095-1. Epub 2016 May 5. PMID: 27146901.

Benelli G. Pathogens Manipulating Tick Behavior-Through a Glass, Darkly. *Pathogens.* 2020 Aug 17;9(8):664-76. doi: 10.3390/pathogens9080664. PMID: 32824571; PMCID: PMC7459789.

BRASIL. Portaria nº 88 de 6 de novembro de 2015 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2015-2017/consulta-publica-portaria-sda-no-88-2015-e-projeto-de-instrucao-normativa-aprovando-regulamento-tecnico-dos-produtos-antiparasitarios-de-uso-veterinario>

Buldain D, Buchamer AV, Marchetti ML, Aliverti F, Bandoni A, Mestorino N. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. *Front Vet Sci*. 2018 Aug 2; 5 (177): 1-8. doi: 10.3389/fvets.2018.00177. PMID: 30116728; PMCID: PMC6082948.

Chabir N, Romdhane M, Valentin A, Moukarzel B, Marzoug HN, Brahim NB, Mars M, Bouajila J. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *J Med Food*. 2011 Nov;14(11):1383-8. doi: 10.1089/jmf.2010.0168. Epub 2011 Apr 10. PMID: 21476932.

Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*. 2008 Aug 8;1(25): 1-17. doi: 10.1186/1756-3305-1-25. PMID: 18691408; PMCID: PMC2533296.

Dantas-Torres F, Fernandes Martins T, Muñoz-Leal S, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019 Oct;10(6):101252. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.06.012. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31255534.

Del Fiol FS, Junqueira FM, Rocha MCP, Toledo MI, Barberato Filho S. A febre maculosa no Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2010;27(6):461–6.

Estrada-Peña A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev Sci Tech*. 2015 Apr;34(1):53-65. doi: 10.20506/rst.34.1.2345. PMID: 26470449.

Falci SP, Teixeira MA, Chagas PF, Martinez BB, Loyola AB, Ferreira LM, Veiga DF. Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Cir Bras*. 2015; 30 (7): 491-6.

Ferreira FM, Delmonte CC, Novato TLP, Monteiro CMO, Daemon E, Vilela FMP, Amaral MPH. 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 Mar;32(1):41-7. doi: 10.1111/mve.12259. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28833280.

Germanakis A, Chochlakis D, Angelakis E, Tselentis Y, Psaroulaki A. Skin lesions and inoculation eschars at the tick bite site in spotted fever group rickettsioses: experience from a patient series in eastern crete, Greece. *Dermatology*. 2014;228(4):332-7. doi: 10.1159/000360525. Epub 2014 Apr 30. PMID: 24800649.

Goode P, Ellse L, Wall R. Preventing tick attachment to dogs using essential oils. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018 May;9(4):921-6. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.029. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29606618.

Gruhn KD, Ogrzewalska M, Rozental T, Farikoski IO, Blanco C, de Souza Freitas L, de Lemos ERS, Ribeiro VMF. Evaluation of rickettsial infection in free-range capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) (Rodentia: Caviidae) and ticks (Acari: Ixodidae) in the Western Amazon, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019; 10 (5): 981-6.

Kong Q, Zhang L, An P, Qi J, Yu X, Lu J, Ren X. Antifungal mechanisms of α -terpineol and terpene-4-alcohol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. *Journal of Applied Microbiology* 2019; 126 (4): 1161-74

Lei G, Li J, Zheng T, Yao J, Chen J, Duan L. Comparative Chemical Profiles of Essential Oils and Hydrolate Extracts from Fresh Flowers of Eight *Paeonia suffruticosa* Andr. Cultivars from Central China. *Molecules*. 2018 Dec 10;23(12):3268. doi: 10.3390/molecules23123268. PMID: 30544771; PMCID: PMC6321490.

Maggi RG, Krämer F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasit Vectors*. 2019 Mar 28;12(1):145-82. doi: 10.1186/s13071-019-3407-x. PMID: 30917860; PMCID: PMC6438007.

Martins, IVF. Parasitologia veterinária [recurso eletrônico]. Vitória: EDUFES, 2019. 2º ed: 65-69.

Massard CL, Fonseca AH. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. A Hora Veterinária. 2004. 135(1): 15-23.

Nwanade CF, Wang M, Wang T, Yu Z, Liu J. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. Exp Appl Acarol. 2020 May;81(1):1-35. doi: 10.1007/s10493-020-00489-z. Epub 2020 Apr 14. PMID: 3229155 (a)

Nwanade CF, Yu Z, Liu J. Botanical acaricides induced morphophysiological changes of reproductive and salivary glands in tick: A mini-review. Res Vet Sci. 2020 Oct; 132 (1):285-91. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.008. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32707419 (b)

Pauliello KE, Souza DMST, Filho MM, Teixeira MA, Mendonça ARA. Journal of Medicinal Plants Research: Antihistaminic action of Melaleuca armillaris ointment.2019,13(10):236-41

Raynal, JT; Souza BC, Silva AB, Bahiense TC, Silva HC, Meyer R, Portela RW. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (RPCV). 2015, 110 (593-594): 23-9

Rizk M, Ibrahim N, El-Rigal N. Comparative in vivo antioxidant levels in *Schistosoma mansoni* infected mice treated with praziquantel or the essential oil of *Melaleuca armillaris* leaves. Pak J Biol Sci. 2012 Oct 15;15(20):971-8. doi: 10.3923/pjbs.2012.971.978. PMID: 24199475.

Rochlin I, Toledo A. Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review. J Med Microbiol. 2020 Jun;69(6):781-91. doi: 10.1099/jmm.0.001206. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32478654; PMCID: PMC7451033.

Sainz P, Andrés MF, Martínez-Díaz RA, Bailén M, Navarro-Rocha J, Díaz CE, González-Coloma A. Chemical Composition and Biological Activities of *Artemisia*

pedemontana subsp. *assoana* Essential Oils and Hydrolate. *Biomolecules*. 2019 Oct 2;9(10):558-80. doi: 10.3390/biom9100558. PMID: 31581691; PMCID: PMC6843530.

Salman M, Abbas RZ, Israr M, Abbas A, Mehmood K, Khan MK, Sindhu ZUD, Hussain R, Saleemi MK, Shah S. Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against *Rhipicephalus* ticks in cattle. *Vet Parasitol*. 2020 Jul; 283: 109178. doi: . 10.1016/j.vetpar.2020.109178. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32652458.

Springer A, Glass A, Probst J, *et al.* Tick-borne zoonoses and commonly used diagnostic methods in human and veterinary medicine. *Parasitol Res*. 2021. Online ahead of print. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-07033-3>

Wajs-Bonikowska A, Sienkiewicz M, Stobiecka A, Maciąg A, Szoka Ł, Karna E. Chemical composition and biological activity of *Abies alba* and *A. koreana* seed and cone essential oils and characterization of their seed hydrolates. *Chem Biodivers*. 2015 Mar;12(3):407-18. doi: 10.1002/cbdv.201400167. PMID: 25766914.

Yim WT, Bhandari B, Jackson L, James P. Repellent effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against cattle tick larvae (*Rhipicephalus australis*) when formulated as emulsions and in β -cyclodextrin inclusion complexes. *Vet Parasitol*. 2016 Jul 30;225:99-103. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.06.007. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27369582.

NORMAS ADOTADAS

Normas para formatação do Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde. Disponível em: <http://pos.univas.edu.br/mestrado-saude/docs/uteis/aluno/formatacaoMpcas.pdf>

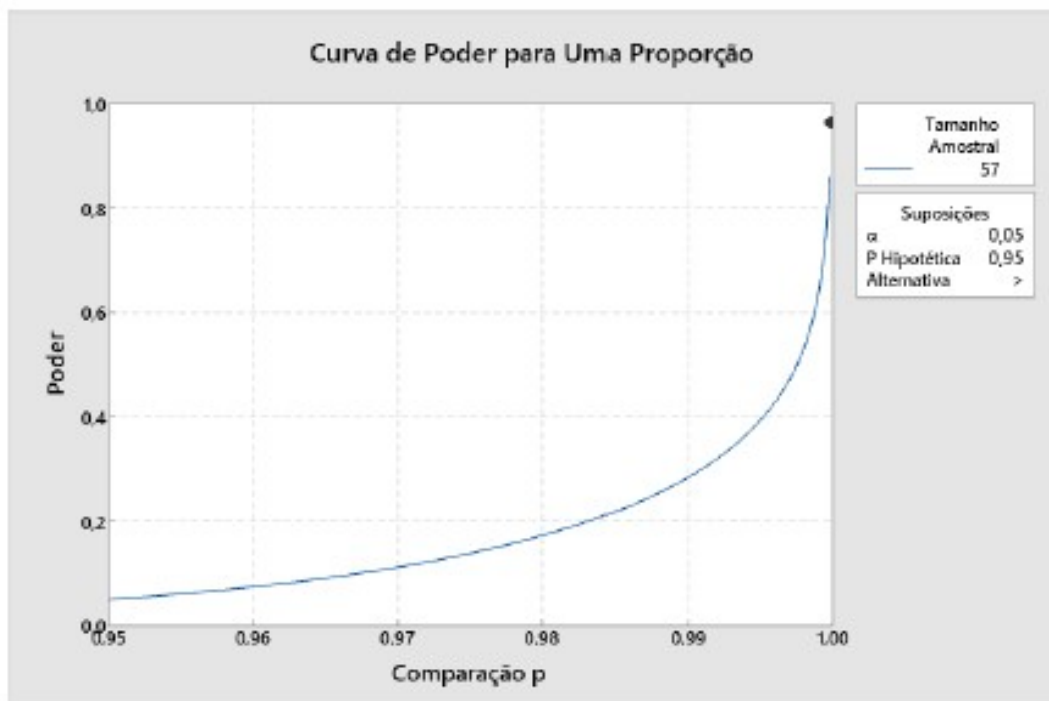
ANEXO

Anexo 1: Cálculo amostral

Teste para Uma Proporção
Teste de $p = 0.95$ (versus > 0.95)
 $\alpha = 0.05$

Resultados

Comparação p	Tamanho Amostral	Poder Alvo	Poder Real
1.00	57	0.95	0.966000



FONTES CONSULTADAS

DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: <http://www.decs.bvs.br>

Brasil. Portaria nº 88 de 6 de novembro de 2015 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/acao-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2015-2017/consulta-publica-portaria-sda-no-88-2015-e-projeto-de-instrucao-normativa-aprovando-regulamento-tecnico-dos-produtos-antiparasitarios-de-uso-veterinario>