

**ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O CONTROLE SUSTENTÁVEL DE
CARRAPATOS: EFEITOS SOBRE DIFERENTES ESTÁGIOS DE**
Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Luciano dos Reis Silva Santos

Montes Claros - MG
Outubro- 2024

Mestrando: Luciano dos Reis Silva Santos

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Curso de Mestrado Acadêmico em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Viviane de Oliveira Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Aparecido de Sousa Xavier

Santos, Luciano dos Reis Silva.

S237o Óleos essenciais para o controle sustentável de carrapatos [manuscrito]: efeitos sobre diferentes estágios de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Luciano dos Reis Silva Santos – Montes Claros, 2024.

77 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada /PPGBOT, 2024.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane de Oliveira Vasconcelos.

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Aparecido de Sousa Xavier.

1. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. 2. Óleos essenciais. 3. Terpenos. 4. Formulações. 5. Estabilidade. I. Vasconcelos, Viviane de Oliveira. II. Xavier, Mauro Aparecido de Sousa. III. Universidade Estadual de Montes. IV. Título. V. Título: efeitos sobre diferentes estágios de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Mestrando: Luciano dos Reis Silva Santos

**ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O CONTROLE SUSTENTÁVEL DE
CARRAPATOS: EFEITOS SOBRE DIFERENTES ESTÁGIOS DE**
Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Curso de Mestrado Acadêmico em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de outubro de 2024.

Prof^a. Dr^a. Viviane de Oliveira Vasconcelos - UNIMONTES

Prof^a. Dr^a. Sonia Ribeiro Arrudas - UNIMONTES

Prof. Dr. Fábio Ribeiro - FIP/MOC

Prof. Dr. Carlos Eduardo D'Angelis - UNIMONTES

Prof. Dr. Otávio Cardoso Filho - PPGBot/FCO

Viviane de Oliveira Vasconcelos
Orientadora

Montes Claros - MG
Outubro- 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu mestre na caminhada mesmo com muitos desafios enfrentados durante essa jornada do mestrado estamos aqui na etapa final.

Aos meus pais, que contribuíram com muita paciência mesmo precisando de mim aceitaram minha ausência neste momento tão importante do mestrado.

A minha orientadora Prof. Dra. Viviane de Oliveira Vasconcelos pela oportunidade de ser seu orientando e por todas as orientações e conhecimentos que foram de suma importância para o trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Mauro Aparecido de Sousa Xavier, pelos momentos dedicados durante os experimentos e por seus conhecimentos cedidos a mim.

A equipe do Laboratório de Bioinformática e Bioprodutos (LaBio) que não mediram esforços durante o desenvolvimento dos experimentos deste trabalho.

Aos três anjos; Vilmar, Maria Luzia e Ivonete, que Deus colocou na minha vida, pois sem vocês eu jamais teria chegado até aqui.

A minhas amigas; Marta, Vera e Elisângela, pois aprendemos muito juntos não somente os conhecimentos durante o curso, mas também nossos laços de amizade.

A equipe do Noroeste Tarthesal Leilões por fazer parte desta pesquisa cedendo as teleóginas necessárias para obtenção das larvas de *R. (B.) microplus*.

A Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por cederem seus espaços para realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada (PPGBot) pela oportunidade de fazer parte deste curso que enriqueceu meus conhecimentos.

E aos membros presentes na banca de defesa, por concederem seu tempo e conhecimento para enriquecer este trabalho.

RESUMO

Óleos essenciais para o controle sustentável de carrapatos: efeitos sobre diferentes estágios de *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*

O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito presente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e constitui um grande problema para os pecuaristas pelo impacto econômico devido a aquisição de acaricidas sintéticos. Desta maneira, buscar novas alternativas sustentáveis como o uso de óleos essenciais (OEs) encontrados em plantas representa uma fonte promissora de novos acaricidas. Algumas famílias botânicas merecem destaque porque apresentam importantes compostos secundários com atividade acaricida e inseticida. O objetivo deste trabalho foi avaliar OEs de 8 espécies botânicas de diferentes famílias na busca do controle sustentável do carrapato bovino *R. (B.) microplus* aplicando em diferentes estágios do ectoparasito, bem como o desenvolvimento de formulações visando produtos de origem vegetal. Foram coletadas folhas de *Salvia officinallis* L. (sálvia), sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira) e frutos de *Cardiopetalum calophyllum* (imbira) de áreas típicas Cerrado do Rio Verde-GO submetidos à hidrodestilação por 4 horas em aparelho do tipo Clevenger. Também foram adquiridos OEs comerciais com grau de pureza de 100% das espécies de *Citrus reticulata* (mexerica), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Eugenia caryophyllus* (cravo) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto). Foram realizadas cromatografias qualitativas para avaliar os compostos secundários presentes nas espécies estudadas e se o possível efeito acaricida poderia estar ligado a eles, sendo testada em diferentes estágios do carrapato bovino pelos Testes do Pacote Larval (TPL) e de Imersão em Adultos (TIA). Foram preparados pacotes com papel filtro (Whatmann nº 1) tendo dimensões de 6 x 6 cm e testadas as concentrações de 0,5%; 2,5%; 5,0%; 10,0% e 20,0% (V/V) de cada OEs e após 24 horas foi avaliada a mortalidade e/ou motilidade; bem como controle positivo e negativo, sendo analisadas as diferenças estatísticas com $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey. Posteriormente, foi realizado o Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) para avaliar se o produto seria estável e eficaz, observando suas propriedades organolépticas (cor, odor, aspecto e pH). Os resultados permitiram observar que os compostos como eugenol, eucaliptol, D-limoneno e linalol podem ser destacados como majoritários em diferentes OEs estudados, sendo já descritos com atividade acaricida. Também foi possível observar que o óleo essencial de *C. reticulata* (tangerina) foi o mais eficaz com 100% em todas as concentrações testadas para o estágio larval de *R. (B.) microplus*. Já os demais OEs tiveram variações dependendo das concentrações testadas. Além disso, o OE de *C. zeylanicum* teve eficácia máxima (100%) em inibir as posturas nas concentrações de 2,5 e 5,0% diferente do observado com os demais OEs. A maior eficácia no TEA foi observada na formulação de OE/OS a 0,5% de *E. globulus* que provocou 97,41% e 71,0% de mortalidade em larvas *R. (B.) microplus* nas temperaturas de -20°C e 4°C, respectivamente. Portanto, estudos com OEs podem ser alternativas sustentáveis ao controle de diferentes estágios do *R. (B.) microplus* buscando novos produtos de origem vegetal sem aditivos sintéticos. No entanto, é preciso novos testes pensando na possibilidade de encapsulamento dos OEs para manter suas propriedades organolépticas visando uma maior eficácia.

Palavras-chave: Estabilidade. Formulações. Óleo Essencial. Terpenos. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*.

ABSTRACT

Essential oils for sustainable tick control: effects on different stages of *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an ectoparasite present in tropical and subtropical regions of the world and constitutes a major problem for livestock farmers due to the economic impact of the acquisition of synthetic acaricides. Thus, seeking new sustainable alternatives such as the use of essential oils (EOs) found in plants represents a promising source of new acaricides. Some botanical families deserve to be highlighted because they present important secondary compounds with acaricidal and insecticidal activity. The objective of this study was to evaluate EOs from 8 botanical species of different families in the search for sustainable control of the cattle tick *R. (B.) microplus* by applying it at different stages of the ectoparasite, as well as the development of formulations targeting products of plant origin. Leaves of *Salvia officinallis* L. (sage), seeds of *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira) and fruits of *Cardiopetalum calophyllum* (imbira) were collected from typical Cerrado areas of Rio Verde-GO and subjected to hydrodistillation for 4 hours in a Clevenger-type apparatus. Commercial EOs with a purity level of 100% were also purchased from the species of *Citrus reticulata* (tangerine), *Ocimum basilicum* (basil), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Eugenia caryophyllus* (clove) and *Eucalyptus globulus* (eucalyptus). Qualitative chromatography was performed to evaluate the secondary compounds present in the studied species and whether the possible acaricidal effect could be linked to them, being tested in different stages of the cattle tick by the Larval Package Test (LPT) and Adult Immersion Test (AIT). Filter paper packages (Whatmann n° 1) measuring 6 x 6 cm were prepared and concentrations of 0.5%; 2.5%; 5.0%; 10.0% and 20.0% (V/V) of each EO were tested. After 24 hours, mortality and/or motility were evaluated; as well as positive and negative controls, and statistical differences were analyzed with $p < 0.05$ by the Tukey test. Subsequently, the Accelerated Stability Test (AST) was performed to assess whether the product would be stable and effective, observing its organoleptic properties (color, odor, appearance and pH). The results allowed us to observe that compounds such as eugenol, eucalyptol, D-limonene and linalool can be highlighted as major in different EO studied, being already described with acaricidal activity. It was also possible to observe that the essential oil of *C. reticulata* (tangerine) was the most effective with 100% in all concentrations tested for the larval stage of *R. (B.) microplus*. The other EOs showed variations depending on the concentrations tested. In addition, the EO of *C. zeylanicum* had maximum efficacy (100%) in inhibiting postures at concentrations of 2.5 and 5.0%, different from that observed with the other EOs. The greatest efficacy in TEA was observed in the EO/OS formulation at 0.5% of *E. globulus*, which caused 97.41% and 71.0% mortality in *R. (B.) microplus* larvae at temperatures of -20°C and 4°C, respectively. Therefore, studies with EOs may be sustainable alternatives to the control of different stages of *R. (B.) microplus*, seeking new products of plant origin without synthetic additives. However, new tests are needed considering the possibility of encapsulating EOs to maintain their organoleptic properties, aiming for greater efficacy.

Keywords: Stability. Formulations. Essential Oil. Terpenes. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1. Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	10
1.2. Acaricidas químicos e o desenvolvimento da resistência	11
1.3. Óleos essenciais e suas propriedades biológicas.....	12
1.4. Espécies botânicas e sua diversidade de compostos de terpenos e fenólicos..	13
1.5. Desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas.....	15
1.6. Estabilidade versus instabilidade durante o armazenamento.....	16
1.7. Referências	17
CAPÍTULO 1	201
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. METODOLOGIA.....	25
2.1. Material vegetal.....	25
2.2. Obtenção dos óleos de essenciais	25
2.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)	26
2.4. Obtenção de larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	27
2.5. Testes do Pacote de Larvas (TPL) – Teste <i>in vitro</i>	27
2.6. Teste de Imersão em Adultos (AIT) – Teste <i>in vitro</i>	28
2.7. Análises Estatísticas.....	30
3. RESULTADOS.....	30
3.1. Composição química majoritária dos óleos essenciais obtidos por CG-EM...	30
3.2. Atividade acaricida de óleos essenciais em larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	32
3.3. Eficácia de inibição da eclodibilidade das larvas <i>R. (B.) microplus</i>	33
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2.....	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43

1. INTRODUÇÃO	44
2. METODOLOGIA.....	45
2.1. Obtenção dos óleos de essenciais	45
2.2. Teste de Estabilidade Acelerado (TEA) <i>in vitro</i>	46
2.3. Obtenção de larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	47
2.4. Testes do Pacote de Larvas (TPL) – Teste <i>in vitro</i>	48
2.5. Análises Estatísticas.....	48
3. RESULTADOS.....	49
3.1. Análise sensorial e parâmetros organolépticos durante TEA.....	49
3.2. Atividade acaricida dos OEs após TEA.....	50
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÃO.....	514
6. REFERÊNCIAS.....	54
CONCLUSÃO GERAL	58
ANEXO	59

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, popularmente conhecido como carrapato bovino, é um parasita monóxeno da subordem Ixodides, sendo o mais importante ectoparasita presente na América do Sul devido ser o principal hospedeiro de bovinos (Veríssimo *et al.*, 2015). Também pode ser o vetor de vários patógenos causadores de doenças, como *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale* provocando tristeza parasitária bovina (Díaz *et al.*, 2019). No Brasil, o ectoparasita é descrito por prejuízos anuais superiores a US\$ 3 bilhões pela aquisição de acaricidas químicos (Pereira *et al.*, 2022).

Os carrapatos, como todos os artrópodes, são revestidos externamente por um tegumento quitinoso, ao qual são atribuídas funções de cobertura do corpo, proteção contra perda de água, reserva energética e de exoesqueleto, permitindo a proteção mecânica contra danos físicos (Sonenshine, 1991). A cutícula é a porção mais externa do tegumento composta principalmente por lipídeos, polifenóis, proteínas e quitina, secretada pelas células epidérmicas. No entanto, há evidências de que esta se estende pelo interior do corpo em determinados pontos de comunicação com o sistema traqueal e com os ductos das glândulas dermais (Delmonte, 2017).

Além disso, a maior parte da perda de água nos carrapatos ocorre através da cutícula e a camada de lipídeos presente nesta estrutura desempenha importante função na regulação deste fenômeno. Já foi verificado que determinadas substâncias, como detergentes, quando aplicadas sobre a superfície da cutícula de carrapatos, podem aumentar a taxa de transpiração, levando a maior perda de água (Delmonte, 2017). As larvas e ninfas já foram citadas como sendo mais susceptíveis à perda de água do que adultos. Além das perdas de água que ocorrem através do tegumento corporal, há ainda aquela decorrente das trocas gasosas do processo de respiração (Sonenshine, 1991). Os carrapatos ixodídeos possuem sistema respiratório constituído por espiráculos e traquéia. Entretanto, as larvas não apresentam estas estruturas e realizam suas trocas gasosas exclusivamente através da cutícula (Delmonte, 2017).

O ciclo biológico dos ixodídeos é composto dos estágios de ovo, larva, ninfa e adultos. O carrapato *R. (B.) microplus* apresenta duas fases em seu ciclo, sendo uma de vida livre (em média dura 28 a 51 dias) e a outra a parasitária (18 a 26 dias). Para a fase de

vida livre é necessário em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura e de vinte e dois a trinta dias para a eclosão das larvas. Essa fase sofre interferências climáticas, especialmente da temperatura e umidade do ar (Furlong, 2007).

1.2. Acaricidas químicos e o desenvolvimento da resistência

O controle de carrapatos é um fator indispensável para assegurar produtividade, benefícios econômicos e tornar a pecuária bovina uma atividade competitiva. Os acaricidas químicos têm desempenhado um papel importante no controle das populações de carrapato *R. (B.) microplus*. No entanto, o uso inadequado e intensivo levou ao desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes em todo o mundo (Díaz *et al.*, 2019) e ameaçam a saúde humana devido aos resíduos tóxicos no leite e na carne (Kumar *et al.*, 2016). Deste modo, o controle de carrapatos se tornou um grande desafio visto que pesquisas têm mostrado o surgimento da resistência dos carrapatos aos produtos químicos (Veríssimo, 2015; Embrapa, 2019).

Os métodos de controle do *R. (B.) microplus* podem ser aplicados tanto na fase de vida livre, visto que a grande maioria dos carrapatos (95%) se encontra no ambiente, como na fase parasitária por meio do controle nos bovinos. Atualmente, o método mais utilizado se baseia principalmente na aplicação de quimioterápicos e estes se dividem em carrapaticidas de contato e sistêmicos (George *et al.* 2004, Embrapa, 2010). Os carrapaticidas que atuam por contato direto pertencem a cinco famílias: organofosforados, amidínicos, piretróides sintéticos, fenilpirazóis e spinosad. Neste grupo a penetração do produto ocorre através da cutícula levando a intoxicação e a morte do carrapato. Já os carrapaticidas sistêmicos são representados por dois grupos, as lactonas macrocíclicas e as benzofenilureas que são metabolizados, distribuídos pela circulação a todo corpo do animal, assim acabam atingindo os carrapatos (Furlong *et al.* 2007; Embrapa, 2010).

De forma geral, a ação destes compostos ocorre no sistema nervoso do carrapato, afetando os mecanismos de crescimento, neuropeptídeos e o sistema neuroendócrino (Taylor, 2001). Entretanto, alguns destes carrapaticidas não podem ser utilizados durante a lactação, nem nos bovinos de corte antes de seis semanas do abate (George *et al.* 2004; Furlong *et al.* 2007). Devido às dificuldades no controle de carrapatos em função da resistência às principais bases químicas disponíveis, outras estratégias vêm sendo utilizadas com potencial promissor buscando controlar os *R. (B.) microplus*.

1.3. Óleos essenciais e suas propriedades biológicas

Nesse sentido, os óleos essenciais (OEs) representam uma fonte promissora de novos acaricidas (Ellse e Wall, 2014), visando um controle sustentável sem aditivos químicos. Os OEs são produzidos por plantas aromáticas e desempenham um papel importante na proteção das plantas contra insetos (Díaz *et al.*, 2019). Estes têm merecido destaque, principalmente porque podem atuar causando à atração, a repelência, a toxicidade e/ou a mortalidade de insetos, microrganismos e parasitos (Santoro *et al.* 2007; Pasay *et al.* 2010). Além disso, geralmente apresentam dois ou três componentes que determinam suas propriedades biológicas; no entanto, componentes minoritários do óleo também podem contribuir para a atividade biológica desejada (Ellse e Wall, 2014; Díaz *et al.*, 2019).

É importante conhecer a biossíntese dos OEs nas plantas, onde podemos encontrar diversos compostos químicos que são produtos tanto do metabolismo primário quanto do secundário. Existem três grandes grupos (terpenos, compostos fenólicos e alcaloides), no entanto, apenas dois deles são destaques para o presente trabalho que são os terpenos e os compostos fenólicos. Deste modo, o estudo da biossíntese dos OEs permite conhecer cada rota dos componentes primários e secundários. Assim, os terpenos são oriundos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) (Buchanan *et al.*, 2020). Na rota do ácido mevalônico são necessárias três moléculas do Acetil-CoA para formar o ácido mevalônico. Esta molécula será pirofosforilada, descarboxilada e desidratada para produzir o isopentenil difosfato (IPP) que é a unidade básica para a formação dos terpenos (Borges e Amorim, 2020).

Já os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico (Buchanan *et al.*, 2020). Na rota do ácido chiquímico, a fenilalanina é um importante ponto de partida para a produção da maioria dos compostos fenólicos. Ela é produzida a partir da eritrose 4-fosfato (rota das pentoses fosfatadas) e do ácido fosfoenolpirúvico (glicólise). Além disso, a molécula de amônia (NH₃) é desassociada da fenilalanina por meio da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) originando o ácido cinâmico. A enzima PAL é a mais importante e estudada na formação do metabolismo dos fenóis, sendo sua atividade intensificada por fatores externos como: baixas temperaturas, nutrientes no solo e luz. Deste modo, as temperaturas baixas são responsáveis por aumentar a atividade das enzimas no metabolismo dos fenóis (Borges e Amorim, 2020).

Portanto, é importante destacar os terpenos que representam a classe mais abundante de bioativos isolados de plantas aromáticas (Delmonte, 2017). Algumas substâncias dos OEs têm sido empregadas para o controle de insetos e microrganismos, que são: limoneno (Armugam *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2023), o timol (Cruz *et al.*, 2013; Silva *et al.* 2023), eugenol (Pasay *et al.*, 2010; Monteiro *et al.* 2017; Silva *et al.* 2023) e eucaliptol (Lefcort *et al.* , 2020; Cardoso *et al.*, 2020).

1.4. Espécies botânicas e sua diversidade de compostos de terpenos e fenólicos

Deste modo, os estudos com espécies botânicas podem ser primordiais para identificar os compostos secundários presente para o desenvolvimento de produtos de origem vegetal que possam atuar com potencial acaricida, e assim reduzir e/ou eliminar os prejuízos ocasionados pelo ectoparasita, bem como das patologias visto que os carrapatos podem ser vetores de diversos patógenos, gerando danos econômicos e ecológicos. Além disso, as espécies botânicas estudadas são descritas por sua grande amplitude por atuarem em diversos fins medicinais.

Salvia officinallis L. (Família: Lamiaceae), conhecida popularmente como sálvia, sendo uma espécie semi-arbustiva originária do mediterrâneo que difundiu principalmente na região Sul do Brasil (De Souza *et al.*, 2017). A espécie é uma planta aromática com folhas de coloração verde-acinzentada com superfície rugosa (Pimpão, 2007), sendo muito utilizada com fins medicinais e alimentícios por sua elevada expressão de compostos uteis, tais como: terpenóides e derivados fenólicos (Farhat *et al.*, 2013; Roby *et al.*, 2013). Seus OEs são renomados por suas atividades biológicas e são comumente usados em medicamentos, alimentos, perfumaria e cosméticos.

A espécie *Ocimum basilicum* L. (Família: Lamiaceae), conhecida popularmente como manjeriço, é um subarbusto aromático com muitas folhas carnosas, ovaladas, sem pêlos e de cor verde-brilhante, sendo originária da Índia, mas de ocorrência subespontâneo em todo o território brasileiro (Rodrigues e Gonzaga, 2001). Seu óleo essencial apresenta como principais compostos: linalol, estragol, farneseno, eugenol e 1,8-cineol e são descritos com atividade de repelência contra *R. (B.) microplus* (Martinez-Velazquez *et al.*, 2011) e *Ixodes scapularis* e *Dermacentor variabilis* (Wang *et al.*, 2022). Além disso, estudos com o OE de *Ocimum gratissimum* são obtidos principalmente das folhas e caules,

onde foram detectados os principais componentes como eugenol, timol, citral, geraniol e linalol e são descritos com atividade contra *R. (B.) microplus* (Benelli *et al.*, 2019).

A espécie *Citrus reticulata* Blanco (Família: Rutaceae) é uma árvore de porte alto, conhecida como tangerina, poncã ou mexerica. Os frutos apresentam casca grossa e pouca aderência com gomos secos o que restringe sua comercialização (De Souza *et al.*, 2019). Os OEs e extratos de cascas e folhas de frutas *C. reticulata* têm diversas aplicações biológicas, como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e inseticida. Os principais compostos encontrados no OE foram limoneno, terpineno e mirceno (Oliveira *et al.*, 2023). Além disso, OEs de diferentes espécies de *Citrus* são quimicamente semelhantes com predominância do monoterpene limoneno, características apontadas por Bozkurt *et al.* (2017).

Cardiophyllum calophyllum (Família: Annonaceae) é uma espécie semidecídua representada por árvores e arbustos, comumente conhecidos como imbirá ou imbirinha (Xavier *et al.*, 2016). A espécie é utilizada para tratar algumas doenças, como bronquite, sinusite, dismenorréia e febre (Coelho *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013). O estudo de Xavier *et al.* (2016) apresentou compostos em diferentes tecidos vegetais, mas os frutos foram identificados uma predominância de germacreno-D, germacreno-B e espatulenol. Deste modo, é observada a presença dos sesquiterpenos como a maioria dos compostos identificados em diferentes órgãos de *C. calophyllum*, como características químicas encontradas em outras espécies da família *Annonaceae*. Ainda não existem estudos com a espécie contra o carrapato *R. (B.) microplus*.

Pterodon emarginatus Vogel (Família: Fabaceae) é uma espécie brasileira, sendo conhecida como sucupira (Oliveira *et al.*, 2016), tendo reconhecimento na medicina popular e com potencial de uso madeireiro e ornamental (Bustamante *et al.*, 2010). No Brasil, a espécie é encontrada nas regiões sudeste, centro-oeste, norte e nordeste, incluindo os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais (Lima *et al.*, 2015). Os frutos são vagens tipo sâmara, arredondados, indeiscentes e alados contendo uma única semente fortemente protegida dentro de uma cápsula fibro-lenhosa, sendo está envolvida externamente por uma substância oleosa em uma estrutura esponjosa como favos de mel (Dutra, 2008). A composição química do OE evidenciou o predomínio de monoterpene e de sesquiterpenos, tais como: δ -elemeno, β -elemeno e trans-cariofileno (Dutra *et al.*, 2012).

Cinnamomum zeylanicum (Família: Lauraceae) é uma espécie de árvore perene nativa do Sri Lanka, Mianmar e Sudeste Asiático, e compreende quase 200 espécies, entre as quais 20 espécies ocorrem na Índia, sendo conhecida como canela. O óleo essencial de *C. zeylanicum* extraído da casca exibiu diversas eficácias, como propriedades antiinflamatórias, antidiabéticas, antioxidantes e antimicrobianas (Mohanty *et al.*, 2024). Além disso, a composição do OE da espécie é bastante variável; no entanto, estudos relatam principalmente o eugenol como o principal componente do OE das folhas. O eugenol é um composto fenólico que demonstrou atividade contra *R. (B.) microplus* e também é o principal composto do óleo essencial de plantas com atividade acaricida (Monteiro *et al.*, 2017)

A família Myrtaceae também apresenta potencial inseticida devido os componentes químicos presentes em suas espécies. A espécie *Eugenia caryophyllus* Spreng (*syn* *Syzygium aromaticum* L.) é originária da Indonésia, sendo conhecida como popularmente cravo da Índia (Santos *et. al.*, 2023). Este foi utilizado desde a antiguidade como condimento e agente aromatizante em alimentos, cosméticos e produtos farmacológicos. Além disso, a espécie contém o eugenol como principal componente do seu OE que é um composto fenólico que tem sido sugerido como um substituto para aditivos sintéticos devido às suas características antioxidantes, antibióticas, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Tarhan, 2021; Santos *et. al.*, 2023).

O *Eucalyptus globulus* (Família Myrtaceae) é nativo da Austrália, sendo uma planta cosmopolita e conhecida como eucalipto. São ricas em glândulas sebáceas e excelentes fontes de óleo comercialmente importante, tendo características fungicidas, antibacterianas e antissépticas (Desouky *et al.*, 2022). O óleo de eucalipto foi descrito na categoria GRAS (geralmente considerado seguro) pela *Food and Drug Authority* dos EUA e classificado como não tóxico (USEPA, 1993). Seu óleo essencial é utilizado como repelente de insetos e como agente pesticida, bem como repelente de carrapatos (Lefcort *et al.*, 2020). Muitos estudos revelaram que o óleo de eucalipto afeta a fertilidade de alguns insetos (Campolo *et al.*, 2018; Hategekimana e Erler, 2020).

1.5. Desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas

Os estudos de novas formulações são importantes, pois buscam estabelecer as características iniciais do produto e qual será a sua forma farmacêutica para

desevolvimento deste. Na busca de substâncias para fins terapêuticos, é preciso obter um produto estável, eficaz, de fácil aplicação e com características organolépticas que facilitem sua aceitação pelo consumidor. Este produto irá ser submetido a testes progressivos de ensaios pré-clínicos (testes *in vitro*) e clínicos (testes *in vivo*), visando à comprovação da eficácia e da segurança para que possa ocorrer o seu registro e a sua comercialização (Allen *et al*, 2007).

A escolha do tipo de formulação farmacêutica é de suma importância para o novo produto a ser testado e desenvolvido. Desta maneira, a utilização de emulsão como uma forma farmacêutica pode ser empregada para o desenvolvimento de novos produtos. Essa formulação constituída pela mistura de dois ou mais líquidos imiscíveis, de modo que há uma fase interna, dispersa na forma de glóbulos e outra externa, contínua. Essas emulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), sendo a primeira fase dispersa e a segunda contínua. Nas emulsões O/A, há gotículas de óleo dispersas em uma fase contínua de água; nas emulsões A/O, há gotículas de água dispersas em uma fase contínua de óleo (Delmonte, 2017).

Além disso, quando são observadas as vantagens desta forma farmacêutica, é preciso destacar a possibilidade de administração de princípios ativos insolúveis em outros veículos; permite disfarçar as características organolépticas de determinados fármacos, que melhora sua aceitação; aumenta a sua estabilidade e oferece a fácil aplicação e a remoção do produto da pele (Allen *et al*, 2007).

1.6. Estabilidade *versus* instabilidade durante o armazenamento de novos produtos

As espécies botânicas estudadas neste trabalho apresentam grande potencial para a formulação de novos produtos de origem vegetal pela sua ampla composição de terpenos como é a classe mais abundante de bioativos isolados de plantas aromáticas. Na busca do desenvolvimento de novos produtos é preciso analisar a estabilidade, que consiste na capacidade de um produto manter dentro de limites estabelecidos e por tempo determinado conservando, assim, as propriedades e características originais que apresentava no momento de sua fabricação (Delmonte, 2017). O conhecimento sobre a estabilidade possibilita estabelecer quais são as condições de armazenamento ideais, o prazo de validade do produto e a antecipação de interações do fármaco com os adjuvantes presentes na formulação. No entanto, alguns fatores como a incidência de luz, variações de

temperatura, presença de oxigênio e umidade podem atuar como catalizadores nas reações de degradação das formulações (Brasil, 2004; Allen *et al.*, 2007).

Quando ocorre a instabilidade das formulações farmacêuticas, estas podem ser detectadas por alterações de suas características organolépticas (Brasil, 2004; Allen *et al.*, 2007). Desta maneira, são fundamentais no desenvolvimento de novas formulações os testes de estabilidade preliminar (TEP) ou acelerada (TEA) que podem ser utilizados para uma triagem inicial diante de formulações propostas para um novo medicamento, de modo que se escolha a mais estável para dar seguimento aos estudos (Brasil, 2004). Além disso, os testes de estabilidade de longo prazo visam export as formulações farmacêuticas às condições usuais de transporte de armazenamento que ocorreriam durante a distribuição do produto (Delmonte, 2017). Portanto, estes são testes de suma importância para o desenvolvimento de novos produtos quando se almeja a busca de estabilidade para novos produtos a serem comercializados.

1.7. Referências

Allen Jr, L.V.; Popovich, N.G.; Ansel, H.C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

Benelli, G.; Pavela, R.; Maggi, F.; Wandjou, J. G. N.; Fofie, N. G. B. Y. ; Koné-Bamba, D. A; Sagratini, G.; Vittori, S.; Caprioli, G. Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. Industrial Crops and Products, 2019. Disponível em: <doi:10.1016/j.indcrop.2019.02.047>.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS. Revista Agrotecnologia, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020. Disponível em: <https://r.search.yahoo.com/_ylt=AwrFeMKgjHlnIwIAqWXz6Qt.;_ylu=Y29sbwNiZjEEcG9zAzUEdnRpZAMEc2VjA3Ny/RV=2/RE=1737228705/RO=10/RU=https%3a%2f%2fwww.revista.ueg.br%2findex.php%2fagrotecnologia%2farticle%2fview%2f9705%2f7289/RK=2/RS=cIZ_E0lUFaAzdmV8Xscho_GwaAs->

Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, 1250-1218p, 2000

Bustamante, K.G.L.; Lima, A.D.F.; Soares, M.L.; Fiuza, T.S.; Tresvenzol, L.M.F., Bara, M.T.F.; Pimenta, F.C.; Paula, J.R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.3, p.341-345, 2010

Campolo, O.; Giunti, G.; Russo, A.; Palmeri, V.; Zappalà, L. . Essential Oils in Stored Product Insect Pest Control. J of Food Quality Volume 2018. Disponível em: <doi.org/10.1155/2018/6906105>

Coelho, A. A. M. Efeitos de extratos de plantas do Cerrado em *Dipetalogaster máxima* (Uhler) (Hemíptera, Reduviidae). Revista Brasileira de Entomologia, Curitiba, v.53, n.3, p.444-451, 2009. Disponível em:< [10.1590/S0085-56262009000300020](https://doi.org/10.1590/S0085-56262009000300020)>

Costa, M. S.; Pereira, M. J. B.; Oliveira, S. S.; Souza, P. T.; Dall’oglio, E. L.; Alves, T. C. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v.11, n.2, p.184-190, 2013. Disponível em:<<https://seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/115527>>.

Delmonte, Camila de Carvalho. Avaliação Da Atividade Carrapaticida Do Timol Incorporado a Duas Formulações De Uso Tópico Sobre Estágios Imaturos De *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/5467/1/camiladecarvalhodelmonte.pdf>>

De Souza. Christian. Crescimento vegetativo e características físico-químicas de frutos cítricos do pomar da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Cerro Largo. Universidade Federal da Fronteira Sul Campus cerro largo – RS, Curso de agronomia, 2019. Disponível em: <<https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/3480>>.

De Souza, G. S.; Lima, J. C.; Santos, A. R.; Oliveira, U. C.; Bezerra, M. N. Produção de fitomassa de *Sálvia officinalis* L. cultivada sob malhas coloridas e doses de esterco avícola. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável V.12, Nº 2, p. 182-186, 2017. Disponível em:<DOI: <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v12i2.4213>>.

Desouky, M. M.A.; Mahmoud, S. Abd El-Atti; Ali, A. Elsheakh . Wesam, S. Elgohary. Effect of Eucalyptus globulus oil and Ricinus communis methanolic extract as potential natural molluscicides on the reproductive biology and some antioxidant enzymes of the land snail, *Theba pisana*. Heliyon 8, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12405>>

Díaz, E. L.; Camberos, E. P.; Herrera, G. A. C.; Espinosa, M. E.; Andrews, H. E.; Buelnas, N. A. P.; Ortega, A. G.; Velázquez, M. M. Development of essential oil-based phytoformulations to control the cattle tick *Rhipicephalus microplus* using a mixture design approach. Experimental Parasitology 201, 26–33, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.008>>

Dutra, R. C. Avaliações fitoquímica e farmacológica das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008

Ellse, L., Wall, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. Med. Vet. Entomol. 28, 233–243, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/mve.12033>>

- Embrapa. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- Furlong, J.; Martins, J. R.; Prata, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *Hora Veterinária*, n.159, p. 1-7, 2007. Disponível em:< <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65401/1/COT-36-Carrapato-dos-bovinos.pdf>>
- Hategekimana, A.; Erler, F. Fecundity and fertility inhibition effects of some plant essential oils and their major components against *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: bruchidae). *J. Plant Dis. Prot.* 127, 615–623, 2020. Disponível em:< <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00311-3>>
- Kumar, K.G.A.; Sharma, A.K.; Kumar, S.; Ray, D.D.; Rawat, A.K.S; Srivastava, S.; Ghosh, S. Comparative in vitro anti-tick efficacy of commercially available products and newly developed phyto-formulations against field collected and resistant tick lines of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Parasite. Dis.* 40, 1590–1596p, 2016. Disponível: < <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0736-3>>
- Lefcort, H.; Tsybulnik, D.Y.; Browning, R.J.; Eagle, H.P.; Eggleston, T.E.; Magori, K.; Andrade, C.C.. Behavioral characteristics and endosymbionts of two potential tularemia and rocky mountain spotted fever tick vectors. *J. Vector Ecol.* 45, 321, 2020. Disponível em: < [10.1111/jvec.12403](https://doi.org/10.1111/jvec.12403)>
- Martinez-Velazquez, M; Castilho-Herrera, G.A.; Rosario-Cruz, R.; Flores-Fernandez, J.M.; Lopez-Ramirez, J.; Hernandez-Gutierrez, R.; Lugo-Cervantes, E.C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 108: 108-481, 2011.
- Oliveira, A.E.M.F.M.; Duarte, J.L.; Amado, J.R.R.; Cruz, R.A.S.; Rocha, C.F.; Souto, R.N.P. Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. *PLoS ONE* 11, 2016. Disponível em:<[10.1371/journal.pone.0145835](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145835)>.
- Oliveira, A. C. S. D.; Fernandes, Santos, C. C.; L. S.; Candido, A. C. B. B.; Magalhães, L. G.; Miranda M. L. D. Chemical composition, in vitro larvicidal and antileishmanial activities of the essential oil from *Citrus reticulata* Blanco fruit peel. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 83, e247539, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.247539>>.
- Pasay, C.; Mounsey, K.; Stevenson, G.; Davis, R.; Arlian, L.; Morgan, M.; Vyszenski-Moher, D.; Andrews, K.; Mccarthy, J. Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. *PLoS ONE* 5: 1-9, 2010.
- Pereira, D.F.S; Ribeiro, H.S.; Gonçalves, A.A.M. *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. *Ticks Tick-Borne Dis* 13:101828, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101828>>
- Pimpão, R. B. Estudo fitoquímico da espécie vegetal *Salvia Officinalis*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007

Rodrigues, V. G. S.; Gonzaga, D. S. De O. M. Manjeriçã (Ocimum basilicum L.). Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2001. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100713/1/folder-manjericao.pdf>>

Santoro, G.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.L; Mendonça, L.Z.; Soares, M.J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 116: 283–290, 2007.

Sonenshine, D. E. Biology of ticks, v.1. New York, Oxford University Press, 1991.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention Pesticide and Toxic Substances Program. Thymol R.E.D Facts, 1993. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-080402_1-Sep-93.pdf>

Valente, P.P. Estudo da eficácia *in vitro* e *in vivo* de bioterápicos e produtos naturais no controle de *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) e sua relação com o bem-estar animal. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - BELO HORIZONTE - 2014

Veríssimo, C. J. Resistência e controle do carrapato-do-boi. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2015.

Vita, G. F.; Dumas, E.; Pereira, M. A. V. Da C.; Ferreira, I. Avaliação *in vitro* de carrapaticidas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), no norte do estado do Rio de Janeiro, Brazil, *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(2), p 1–6, 2012.

CAPÍTULO 1

Artigo formatado de acordo com a Revista *Brazilian Journal of Pharmacognosy*

Óleos essenciais para o controle sustentável de carrapatos: Efeitos sobre diferentes estágios de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Luciano dos Reis Silva Santos^{1*}, Elisangela Oliveira Desidério¹, Marta Cristina Pereira da Silva¹, Marcelo Nogueira Xavier², Juliana Pimenta Cruz³, Valdo Soares Martins Júnior⁴; Eduardo Robson Duarte⁴, Mauro Aparecido de Sousa Xavier⁵, Viviane de Oliveira Vasconcelos⁶

¹Pós-graduação em Botânica Aplicada, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

²Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde-GO

³Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

⁴Instituto de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Minas Gerais

⁵Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

⁶Pós-graduação em Botânica Aplicada, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

*lucianossantos89@gmail.com

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito presente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo um grande problema para os pecuaristas pelo impacto econômico pela aquisição de acaricidas. A busca de novas alternativas sustentáveis como os óleos essenciais (OEs) são uma fonte promissora de novos acaricidas, pois seus compostos podem apresentar atividade acaricida e inseticida. O objetivo deste trabalho foi avaliar OEs de espécies de diferentes famílias buscando o controle sustentável do *R. microplus*. Foram coletadas folhas de *Salvia officinallis* L., sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel e frutos de *Cardiopetalum calophyllum* do Cerrado do Rio Verde-GO submetidos à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger e também OEs comerciais de outras espécies. Também foi realizada análises cromatográficas buscando compostos com possível atividade acaricida através do Teste de Pacote Larval (TPL) e do Teste de Imersão em Adultos com as concentrações de 0,5%; 2,5%; 5,0%; 10,0% e 20,0% (V/V). Os resultados permitiram encontrar o eugenol, o eucaliptol, o D-limoneno e o linalol como compostos majoritários em diferentes OEs estudados. Também foi possível observar que o OE de *C. reticulata* foi o mais eficaz com 100% em todas as concentrações testadas para o estágio larval de *R. microplus*. Já os demais OEs tiveram variações dependendo da concentração testada. Também o OE de *C. zeylanicum* teve eficácia máxima (100%) em inibir as posturas nas concentrações de 2,5 e 5,0% diferente do observado dos demais OEs. Portanto, estudos com OEs podem ser alternativas sustentáveis ao controle de diferentes estágios do *R. (B.) microplus*.

Palavras-chave: Acaricida. Óleo Essencial. Terpenos. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an ectoparasite present in tropical and subtropical regions of the world, being a major problem for livestock farmers due to the economic impact of the acquisition of acaricides. The search for new sustainable alternatives such as essential oils (EOs) are a promising source of new acaricides, as its compounds may have acaricidal and insecticidal activity. The objective of this study was to evaluate EOs of species from different families seeking the sustainable control of *R. microplus*. Leaves of *Salvia officinallis* L., seeds of *Pterodon emarginatus* Vogel and fruits of *Cardiopetalum calophyllum* from the Cerrado of Rio Verde-GO were collected and subjected to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus, as well as commercial EOs of other species. Chromatographic analyses were also performed searching for compounds with possible acaricidal activity through the Larval Pack Test (LPT) and the Adult Immersion Test with concentrations of 0.5%; 2.5%; 5.0%; 10.0% and 20.0% (V/V). The results showed that eugenol, eucalyptol, D-limonene and linalool were the major compounds in different EOs studied. It was also possible to observe that the EO of *C. reticulata* was the most effective with 100% in all concentrations tested for the larval stage of *R. microplus*. The other EOs showed variations depending on the concentration tested. The EO of *C. zeylanicum* also had maximum efficacy (100%) in inhibiting postures at concentrations of 2.5 and 5.0%, different from that observed for the other EOs. Therefore, studies with EOs may be sustainable alternatives to control different stages of *R. (B.) microplus*.

Keywords: Acaricide. Essential Oil. Terpenes. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) encontrados em plantas representam uma fonte promissora de novos acaricidas (Ellse e Wall, 2014). Os OEs são produzidos por plantas aromáticas e desempenham um papel importante na proteção das plantas contra insetos (Díaz et al. 2019). Estes têm um merecido destaque, principalmente porque podem causar atração, repelência, toxicidade ou mortalidade de insetos, microrganismos e parasitos (Santoro et al. 2007; Pasay et al. 2010). São misturas naturais complexas contendo vários componentes em diferentes concentrações, onde geralmente dois ou três que determinam suas propriedades biológicas; no entanto, componentes menores dos óleos também podem contribuir para a atividade biológica (Ellse e Wall 2014; Díaz et al. 2019).

Algumas famílias botânicas merecem destaque porque apresentam importantes compostos secundários com atividade acaricida e inseticida. Na família Lamiaceae encontra-se a *Salvia officinallis* L. (sálvia) e *Ocimum basilicum* L. (manjeriço). Seus OEs são obtidos principalmente das folhas e caules; e apresentaram como principais componentes: eucaliptol para *S. officinallis* (Cardoso et al. 2020); linalol, eugenol e 1,8-cineol para *Ocimum basilicum* (Martinez-Velazquez et al., 2011) com atividade descrita frente a diferentes estágios de *R. (B.) microplus*. Também estudos com *Cinnamomum zeylanicum* (canela, Família: Lauraceae) contém Eugenol que é um composto fenólico que demonstrou atividade contra *R. microplus* e é o principal composto do óleo essencial de plantas com atividade acaricida (Monteiro et al. 2017).

Outras espécies pertencentes ao gênero *Citrus* são quimicamente semelhantes com predominância do monoterpeno Limoneno. A espécie *Citrus reticulata* Blanco (Família: Rutaceae) já descrita com atividade acaricida frente às larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato de cães) (Armugam et al. 2016). Já a espécie *Cardiopetalum calophyllum* (Família: Annonaceae) é rica em germacreno-D (42,54%), que representa quase metade de sua composição química e a espécie *Pterodon emarginatus* Vogel (Família: Fabaceae) em germacreno-D (26,93%) e β -cariofileno (18,66%). A *Eugenia caryophyllus* Spreng (Família: Myrtaceae) contém o Eugenol como principal componente do seu OE que é um composto com atividade acaricida (Tarhan 2021; Santos et al. 2023). Também estudos com *Eucalyptus globulus* (Família Myrtaceae) onde seu OE foi descrito na categoria GRAS (Geralmente Considerado Seguro) pela *Food and Drug Authority* dos EUA e classificado como não tóxico (USEPA, 1993). Seu óleo essencial é utilizado como repelente de insetos e como agente pesticida, bem como repelente de carrapatos, principalmente pela presença de Eucaliptol (Lefcort et al., 2020). Muitos estudos revelaram que o óleo de eucalipto afeta a fertilidade de alguns insetos (Campolo et al., 2018; Hategekimana e Erler, 2020).

O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito e está distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e constitui um grande problema para os pecuaristas pelo notável impacto econômico. Uma vez que é o vetor de vários patógenos causadores de doenças, como *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale* levando a tristeza parasitária bovina (Díaz et al. 2019). No Brasil, o ectoparasito é descrito por prejuízos anuais superiores a US\$ 3 bilhões pela aquisição de acaricidas (Embrapa 2019; Pereira et al., 2022).

Os acaricidas químicos têm desempenhado um papel importante no controle das populações de carrapato *R. (B.) microplus*. No entanto, o uso inadequado e intensivo levou ao desenvolvimento de

populações de carrapatos resistentes em todo o mundo (Díaz et al. 2019) e ameaçam a saúde humana devido aos resíduos tóxicos no leite e na carne (Kumar et al. 2016). Deste modo, o controle de carrapatos se tornou um grande desafio visto que pesquisas tem mostrado o surgimento da resistência dos carrapatos aos produtos químicos (Vita *et al.*, 2012; Veríssimo 2015; Embrapa, 2019).

Portanto, o estudo objetivou o uso de óleos essenciais de 8 espécies botânicas de diferentes famílias na busca do controle sustentável do carrapato bovino *R. (B) microplus* aplicando em diferentes estágios do ectoparasito.

2. METODOLOGIA

2.1. Material vegetal

As folhas de *S. officinallis* L. (sálvia) e sementes de *P. emarginatus* Vogel (sucupira) foram coletadas de plantas adultas localizadas na zona rural do município de Rio Verde no mês de dezembro de 2019 e armazenadas em um recipiente plástico com tampa ao abrigo da luz e da umidade. Foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob os números UFG-4.300 e UFG-27.155, respectivamente. Já os frutos de *C. calophyllum* (imbitira) foram coletados de áreas típicas Cerrado do Rio Verde-GO, entre 05:00 e 08:00 horas, no mês de dezembro de 2019. Posteriormente, o material foi levado ao laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – campus Rio Verde, tendo identificação através do depósito de uma exsicata no herbário da Universidade Estadual de Montes Claros-MG, com o número de registro 3815. Foi realizado o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com registro de número AE877B9.

2.2. Obtenção dos óleos de essenciais

Para a extração dos óleos essenciais foram utilizadas as folhas frescas (*in natura*) de *S. officinallis*, sementes de *P. emarginatus* e frutos de *C. calophyllum*, sendo extraídos os óleos essenciais pelo processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Figura 1). Para extração do óleo de *S. officinallis*, o processo foi realizado logo após a colheita, para que a qualidade do material fosse mantida, onde as folhas foram higienizadas com água corrente, retirando-as do caule ou qualquer outro material indesejável. Foram pesados 500g das folhas acrescentado 400 mL de água e colocadas em balão de fundo redondo deixando-se em ebulição por 72 minutos (Porte e Godoy 2008).

As sementes de *P. emarginatus* foram secas a temperatura ambiente devido à sensibilidade dos compostos essenciais a temperaturas elevadas. Além disso, estas foram trituradas manualmente para aumentar a área superficial de contato, semente-água e em seguida submetidas à extração. Foram pesados 200g das sementes e acrescentado 1000 mL de água e colocadas em balão de fundo redondo deixando-se em ebulição por 4 horas controlando-se a temperatura em, aproximadamente, 100°C.

Para *C. calophyllum* foram pesadas 100 gramas do material vegetal e submetidos à hidrodestilação por 4 horas em aparelho do tipo Clevenger no IFGoiano Campus Rio Verde. O óleo essencial foi separado do hidrolato pelo método de extração líquido-líquido em funil de decantação, utilizando o diclorometano como

solvente eliminando os resquícios de água com sulfato desódio anidro. O solvente foi eliminado por evaporação a temperatura ambiente por um período de 24 horas. As amostras foram mantidas em geladeira até o momento da análise cromatográfica.

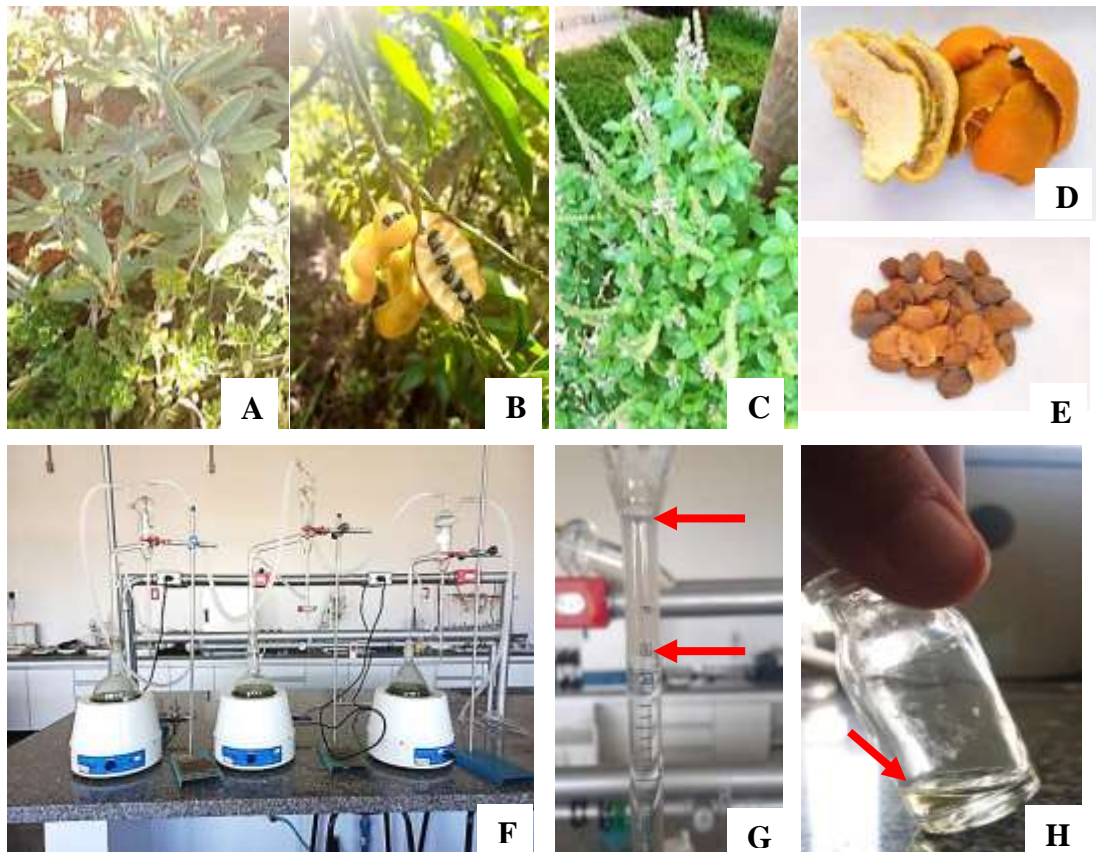


Figura 1. A. Espécie *S. officinalis*. B. Espécie *C. calophyllum*. C. *O. basilicum*. D. Espécie *C. reticulata*. E. Espécie *P. emarginatus*. F. O processo de hidrodestilação em aparelho do tipo *Clevenger*. G e H. Rendimento do OE durante e após o processo de extração (setas). Fonte: Arquivo dos autores, Rio Verde-GO e Unaí-MG, 2023.

Também foram adquiridos óleos essenciais comerciais com grau de pureza de 100% das espécies de *C. reticulata* (mexerica), *O. basilicum* (manjeriçom), *C. zeylanicum* (canela), *E. caryophyllus* (cravo) e *E. globulus* (eucalipto). O OE de *C. reticulata* foi extraído das cascas do fruto pelo método de expressão a frio; já os demais óleos comerciais foram extraídos de folhas pelo método de destilação por arraste a vapor.

2.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

A análise qualitativa dos OEs foi conduzida por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa acoplada (CG-EM, Shimadzu QP-2010, Kyoto, Japão). As amostras de OEs foram diluídas em metanol e separadas em uma coluna capilar DB-5 (30,0m x 0,25mm x 0,25mm) com gás hélio. A temperatura foi ajustada da seguinte forma: a 80°C por 2 minutos e, em seguida, foi aumentada em uma taxa de 10°C por minuto até a temperatura final de 280°C, sendo esta mantida por 5 minutos antes do resfriamento. Os componentes de cada OE foram identificados comparando seus Índices de retenção (IR) e a fragmentação em

massa padrão com os armazenados no banco de dados do espectrômetro (NIST05.LIB e NIST05s.LIB), sendo comparados seus Índice de Retenção Calculado (IC) com os relatados na literatura (IL) (Adams 2007).

2.4. Obtenção de larvas de *R. (B.) microplus*

As larvas de *R. (B.) microplus* foram obtidas a partir de teleóginas do Tathersal Noroeste Leilões de Unaí-Minas Gerais. As teleóginas foram coletadas de bovinos mestiços (Figura 2A), naturalmente infestados e sem contato com acaricidas por no mínimo 30 dias. Após a coleta manual os carrapatos foram acondicionados em recipientes plásticos e transportados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. As teleóginas foram lavadas em água corrente, secas em papel absorvente e transferidas para placas de *Petri* 90 x 120 mm (Leite1995), sendo acondicionadas em estufa a 27-28°C e umidade relativa do ar de 80-95% até a postura dos ovos.

Para a obtenção das larvas foram utilizadas as posturas do terceiro ao décimo segundo dia e acondicionadas em seringa descartável de 5 ml, previamente preparadas (Figura 2B), cortando a extremidade próxima do canhão e feito um orifício de aproximadamente 0,1 mm de diâmetro, na metade desta. O êmbolo foi posicionado de forma a fechar o orifício e a extremidade cortada e vedada com algodão hidrofílico e mantida em câmara climatizada nas mesmas condições acima até a eclosão das larvas.

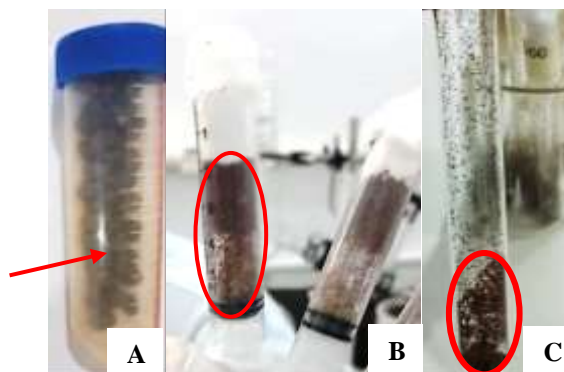


Figura 2. A - Teleóginas (seta) pertencentes à Fazenda Experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. B e C – Seringas cortadas ou tubos e vedados com algodão hidrofílico contendo larvas de *R. (B.) microplus* (círculo) após eclosão dos ovos. Fonte: Arquivo dos autores, Montes Claros, 2023.

2.5. Testes do Pacote de Larvas (TPL) – Teste *in vitro*

O TPL foi desenvolvido por Stone e Haydock (1962) que consiste na exposição de larvas do carrapato a papel filtro impregnado com o carrapaticida e óleo essencial a serem testados, sendo quantificada a mortalidade das larvas após 24 horas. Primeiramente, foram preparados pacotes com papel filtro (*Whatmann* nº 1) tendo dimensões de 6 x 6 cm. Foram testadas concentrações de 0,5%; 2,5%; 5,0%; 10,0% e 20,0% (V/V) de cada OEs; bem como controle positivo (controle químico com cipermetrina *pour on*) e controles negativos (com água e óleo de soja). Além disso, o processo de diluição dos óleos essenciais foi em óleo de soja nas seguintes condições conforme a tabela abaixo:

Tabela 1. Relação entre as concentrações com o óleo de soja e óleos essenciais das espécies estudadas em microlitros (μ l).

Concentrações (%)	Óleo de soja (mL)	Óleo essencial (μ l)
-------------------	-------------------	---------------------------

0,5	500	2,5
2,5	500	12,5
5,0	500	25,0
10,0	500	50,0
20,0	500	100,0

Em seguida, um volume de aproximadamente 200µL de cada diluição foi aplicado a um papel filtro de forma homogênea e secado. Após a secagem dos papéis tratados, as larvas (aproximadamente 60 larvas por pacote/3 repetições) foram inseridas em cada pacote por meio de um pincel fino e depois selado formando um pacote. Esses pacotes foram incubados a temperatura de 27-28°C e umidade relativa do ar de 80-95%.



Figura 3. A- Representação de pacotes de papel filtro *Whatmann* nº 1 para os Testes de Pacote Larval (TPL). B – Amostras dos óleos essenciais de *C. calophyllum*, de *O. gratissimum*, de *C. reticulata*, de *S. officinallis* e de *P. emarginatus*. C – Bioensaios nas concentrações de 0,5%; 2,5%; 5,0%; 10,0% e 20,0% frente às larvas de *R. (B.) microplus*. Fonte: Arquivo dos autores, Montes Claros, 2023.

2.6. Teste de Imersão em Adultos (AIT) – Teste in vitro

As teleóginas utilizadas neste experimento foram obtidas de infestações experimentais em bovinos mestiços da Fazenda Experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. As larvas utilizadas foram obtidas na mesma forma detalhada no item 2.4. Todo o experimento foi feito segundo aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFMG) sob o nº265/ 2017.

Após o preparo das teleóginas, estas foram distribuídas em grupos homogêneos quanto à motilidade, integridade física e grau de ingurgitamento. Em seguida, os grupos foram pesados em balanças analíticas e transferidos para placas de *Petri* 90x120mm, identificados com o peso total das teleóginas, local da coleta e dados do teste. As fêmeas ingurgitadas foram divididas em grupos, sendo um controle tratado com as diferentes concentrações de óleos essenciais, um grupo controle negativo com água destilada acrescida de *Tween 20* e um grupo com acaricida químico piretroide a base de cipermetrina a 6%. Para cada grupo experimental foram utilizadas 08 fêmeas ingurgitadas constituindo de 4 repetições por tratamento. A eficácia de diferentes concentrações de óleo essencial foi avaliada utilizando a técnica do biocarrapaticidograma (Drummond et al. 1973).

A técnica de biocarrapaticidograma constitui em um banho com a imersão das fêmeas ingurgitadas em copos descartáveis contendo 10 mL das soluções dos tratamentos em 03 concentrações diferentes, mantendo-se o líquido em constante movimento durante cinco minutos. Foram utilizados OEs de *O. basilicum*, *C. reticulata*, *E. globulus* e *C. Zeylanicum* nas concentrações de 5,0%; 2,5% e 0,5% (Figura 4). Após esse período, o excesso das soluções foi retirado utilizando papel absorvente, e as fêmeas foram alocadas para placas de Petri devidamente identificadas e incubadas em estufa BOD a $28^{\circ}\text{C} \pm 70\%$ por aproximadamente 15 dias. As teleóginas foram monitoradas diariamente até o início da postura com duração de aproximadamente três dias, período denominado pré-postura.



Figura 4. Teste de imersão em Adultos (TIA) realizado com OE de *Ocimum basilicum*, *Citrus reticulata*, *Eucalyptus globulus* e *Cinnamomum Zeylanicum* nas concentrações de 5,0%; 2,5% e 0,5, e controles de água

destilada + *Tweene* de piretroide a base de cipermetrina a 6%, Montes Claros - MG, 2024. Fonte: Arquivos dos autores.

Após o término do período de 15 dias de postura, as massas dos ovos foram removidas de cada placa de Petri, pesadas em balança analítica e movidas para seringas descartáveis de 2 mL. Essas seringas foram vedadas com algodão hidrófilo e mantidas nas condições de incubação citadas anteriormente. Após 20 dias de incubação, as larvas foram homogeneizadas em água e detergente, em placas de Petri, para análise da eclodibilidade. Foi demonstrada a contagem das larvas e ovos não eclodidos em estereomicroscópio com aumento de 10 vezes (Figura 4 – setas e círculos), sendo que todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Para a avaliação da eficácia dos produtos foram empregadas as fórmulas descritas por Drummond et al. 1973:

$$\text{Eficiência Reprodutiva (ER)} = \frac{\text{Peso da massa de ovos} \times \% \text{Ecloração} \times 20.000}{\text{Peso das fêmeas}} *$$

* corresponde ao número médio de larvas por grama de ovos.

$$\text{Eficiência do Produto (EP)} = \text{ER controle negativo} - \text{ER Produto} \times 100$$

2.7. Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas no software Sistema para Análises Estatísticas (SAEG versão 9.1). A significância das diferenças médias entre os tratamentos e o controle foi comparada usando a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de *Tukey*, sendo aplicada a partir de uma fórmula estatística usada para comparar as variâncias entre as médias de grupos diferentes. Deste modo, o teste permitiu determinar se houve alguma diferença entre as médias dos diferentes grupos para comparar com as diferenças estatísticas entre os tratamentos. A diferença obtida foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Composição química majoritária dos óleos essenciais obtidos por CG-EM

A composição química dos OEs permitiu identificar os compostos majoritários presente em cada óleo essencial (Tabela 2). Então, foram identificados 17 compostos, que representam 98,42% da composição total do óleo essencial de *C. calophyllum* (imbrira) que apresentou os seguintes compostos: germacreno-D e γ -elemeno (42,54% e 42,05% respectivamente). Porém o óleo essencial de *P. emarginatus* (sucupira) foi encontrado 21 compostos com 98,87% da composição total e apresentou germacreno-D, β -cariofileno, β -elemeno e elixeno (26,93%; 18,66%; 15,49% e 9,41% respectivamente). Entretanto, o óleo essencial de *S. officinallis* (sálvia) apresentou 22 compostos com 99,17% da composição total, sendo os compostos: cânfora, eucaliptol e isoborneol (33,77%; 27,49% e 9,25% respectivamente).

Tabela 2. Índice de retenção (IR) e contribuição relativa dos principais componentes químicos dos óleos essenciais de *C. calophyllum* (imbira), *P. emarginatus* (sucupira) e *S. officinallis* (sálvia) em relação a área relativa em %, Rio Verde-GO, 2023; e dos óleos essenciais comerciais de *C. reticulata* (mexerica), *O. basilicum* (manjeriço), *C. zeylanicum* (canela), *E. caryophyllus* (cravo) e *E. globulus* (eucalipto) Barra Bonita-SP, 2024.

. Compostos	IRL	IRC	Área relativa (%)							
			Imb	Suc	Salvia	Mex*	Manj*	Canela*	Cravo*	Euc*
D-Limoneno	1029	1036	--	--	--	88,98	--	--	--	--
G-Terpineno	1058	1063	--	--	--	4,77	--	--	--	--
Linalol	1096	1095	--	--	--	--	64,15	--	--	--
Eucaliptol	1026	1033	--	--	27,49	--	3,69	--	--	84,30
Cânfora	1141	1143	--	--	33,77	--	--	--	--	--
Isoborneol	1155	1163	--	--	9,25	--	--	--	--	--
β-Elemeno	1389	1391	0,86	15,49	--	--	--	--	--	--
β-Cariofileno	1423	1428	2,41	18,66	2,03	--	--	--	0,02	--
Germacreno-D	1484	1480	42,54	26,93	--	--	--	--	--	--
Elixeno	1492	1492	--	9,41	--	--	--	--	--	--
Eugenol	1356	1361	--	--	--	--	15,15	78,50	85,41	--
Espatuleno	1577	1575	4,39	1,95	0,54	--	--	--	--	--
Minoritários	--	--	48,22	28,38	26,63	6,25	17,01	21,50	14,57	15,70
Outros	--	--	1,58	1,13	0,83	--	--	--	--	--
Total			100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa acoplada (CG-EM, Shimadzu QP-2010) realizada no Laboratório do IFGoiano Campus Rio Verde, GO.

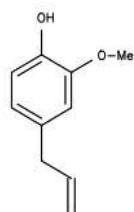
Cromatografia Gasosa-Espectrometria (Expressão a frio, Arrastre a vapor e Centrifugação) realizada no Laboratório RR Ind. E Com. De Óleos Essenciais Ltda, Barra Bonita, SP.

IRL: Índice de Retenção da Literatura; IRC: Índice de Retenção Calculado.

*indicador de cromatografia dos óleos essenciais adquiridos comercialmente.

Além disso, analisando os óleos essenciais comerciais foi possível observar a composição majoritária destes. Desta maneira, o OE *C. reticulata* (mexerica) apresenta D-Limoneno com uma área relativa de 88,98% da composição total. O OE *O. Basilicum* (manjeriço) apresenta como compostos majoritários o Linalol (64,15%) e o Eugenol (15,15%); já o OE *C. zeylanicum* (canela) e o OE *E. Caryophyllus* (cravo) também apresentam o Eugenol com uma área relativa de 78,50% e 85,41% da composição total, respectivamente; e o OE *E. globulus* (eucalipto) foi encontrado o Eucaliptol (1,8-Cineol) como composto majoritário com uma área relativa de 84,30% (Figura 5).

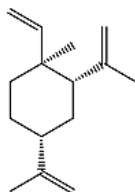
Figura 5. Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes nos OEs estudados.



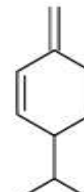
Eugenol



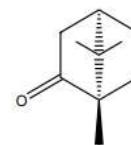
Eucaliptol



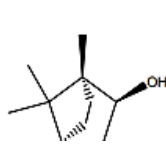
β -Elemeno



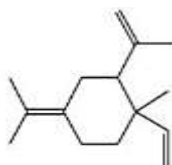
D-Limoneno



Cãnfora



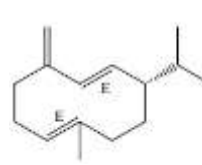
Isoborneol



Elixeno



β -Cariofileno



Germacreno-D



Espatulenol

3.2. Atividade acaricida de óleos essenciais em larvas de *R. (B) microplus*

Os resultados permitiram observar que o óleo essencial de *C. reticulata* (tangerina) foi o mais eficaz com 100% em todas as concentrações testadas (Tabela 3). Já os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (canela), *O. basilicum* (manjeriço) e *S. officinalis* (sálvia) apresentaram a eficácia de 100% em quase todas as concentrações, exceto na concentração de 0,5%, pois apresentou variações entre 74-76% na mortalidade das larvas. Em seguida, o OE de *E. globulus* (eucalipto) apresentou uma eficácia de 100% até a concentração de 5,0%, no entanto, as concentrações de 2,5 % e 0,5% foram de 98,0% e 77,0%, respectivamente. O óleo essencial de *P. emarginatus* (sucupira) teve eficácia de 100% nas concentrações de 2,5% e 20,0%. Por fim, o óleo de *C. calophyllum* (imbira) e *E. caryophyllus* (cravo) foram os que apresentaram os menores resultados. Além disso, é possível observar as principais diferenças estatísticas principalmente nas concentrações de 0,5% e 2,5%, principalmente nos OEs *C. calophyllum* (imbira) e *E. caryophyllus* (cravo) que foram os resultados menos expressivos com 60,0% e 0,0% na concentração de 0,5%, respectivamente.

Tabela 3. Médias percentuais de eficácia acaricida das soluções constituídas por diferentes concentrações dos óleos de *C. calophyllum*, *O. basilicum*, *S. officinalis*, *P. emarginatus*, *C. reticulata*, *E. globulus*, *E. caryophyllus* e *C. zeylanicum* aplicado sobre larvas de *R. (B.) microplus* pelo Teste do Pacote de Larvas (TPL), Montes Claros, MG, 2023 e 2024.

Concentrações (%)	Eficácia do produto (%)							
	Imb	Salvia	Suc	Manj*	Tang*	Euc*	Crav*	Can*
0,5	60,0 ^c	76,0 ^b	48,0 ^b	76,0 ^b	100,0 ^a	77,0 ^b	0,0 ^c	74,0 ^b
2,5	80,0 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	98,0 ^a	40,0 ^b	100,0 ^a
5,0	83,0 ^b	100,0 ^a	92,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
10,0	96,0 ^a	100,0 ^a	99,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
20,0	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
CQ	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
CH ₂ O	0,0 ^d	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c
COS	0,0 ^d	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c
CV	8,48	11,0	9,80	11,0	0	12,8	21,0	11,0

Médias com letras distintas, na coluna, indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo Teste de Tukey (ANOVA) realizado pelo SAEG estatística.

Óleos essenciais oriundos IF Goiano e comerciais*.

Imb = Imbira; Manj = Manjeriço*; Salv = Sálvia; Suc = Sucupira; Tang = Tangerina*; Euc = Eucalipto*; Crav = Cravo*; Can = Canela*; CQ = Controle químico cipermetrina *pour on*; CH₂O = Controle com água; COS = Controle com Óleo de Soja; CV= Coeficiente de Variação

3.3. Eficácia de inibição da eclodibilidade das larvas *R. (B.) microplus*

O óleo essencial de *C. zeylanicum* teve eficácia máxima (100%) em inibir as posturas nas concentrações de 2,5 e 5,0%. Demais OEs tiveram variação na eficácia entre 70-95% dependendo da concentração testada (Tabela 4). No entanto, nenhum dos OEs atingiu na concentração de 0,5% eficácia acima de 90%, sendo assim o OE de *E. globululus* foi que atingiu 38,91% de eficácia na inibição da eclodibilidade das larvas que ainda não é um percentual aceitável para um produto conforme a portaria nº 48, de 12 de maio de 1997, onde exige-se que o produto tenha um mínimo de 90% de eficácia (Brasil, 1997).

Tabela 4. Médias percentuais de eficácia acaricida das soluções constituídas por diferentes concentrações dos óleos essenciais testados aplicado sobre fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* pelo Teste de Imersão em Adultos (TIA), Montes Claros-MG, 2024.

OEs	Concentrações (%)	Média peso das fêmeas (g)	Média peso das posturas (g)	Eclosão (%)	Eficácia (%)
<i>C. zeylanicum</i>	0,5	1,89 ^a	0,52 ^a ±0,08	60,08 ^b ±10,97	10,09 ^{b,E} ±0,18
	2,5	1,84 ^a	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^c ±0,00	100,00 ^{a,A} ±0,00
	5,0	1,96 ^a	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^c ±0,00	100,00 ^{a,A} ±0,00
Controles	Água destilada + Tween	2,09 ^a	0,47 ^a ±0,07	100 ^a ±0,00	0,00 ^{b,F} ±0,00
	Químico	2,13 ^a	0,39 ^a ±0,03	100 ^a ±0,00	0,00 ^{b,F} ±0,00
<i>E. globululus</i>	0,5	1,91 ^a	0,53 ^a ±0,05	39,58 ^b ±16,01	38,91 ^{b,D} ±0,36
	2,5	1,74 ^a	0,00 ^c ±0,21	17,00 ^b ±3,60	91,92 ^{a,A} ±0,07
	5,0	1,85 ^a	0,33 ^b ±0,15	43,43 ^b ±5,77	89,78 ^{a,B} ±0,09
Controles	Água destilada + Tween	2,09 ^a	0,47 ^a ±0,07	100 ^a ±0,00	0,00 ^{c,F} ±0,00
	Químico	2,13 ^a	0,39 ^a ±0,03	100 ^a ±0,00	0,00 ^{c,F} ±0,00
<i>O. basilicum</i>	0,5	1,97 ^a	0,51 ^a ±0,09	53,99 ^b ±9,86	20,85 ^{c,D} ±0,36
	2,5	1,89 ^a	0,09 ^c ±0,04	47,79 ^b ±3,21	95,95 ^{a,A} ±0,03
	5,0	2,00 ^a	0,40 ^b ±0,18	63,48 ^b ±7,37	79,19 ^{b,C} ±0,08
Controles	Água destilada + Tween	2,09 ^a	0,47 ^a ±0,07	100 ^a ±0,00	0,00 ^{d,F} ±0,00
	Químico	2,13 ^a	0,39 ^b ±0,03	100 ^a ±0,00	0,00 ^{d,F} ±0,00
<i>C. reticulata</i>	0,5	1,86 ^a	0,62 ^a ±0,09	56,47 ^b ±5,00	0,00 ^{b,F} ±0,40
	2,5	1,78 ^a	0,45 ^b ±0,10	30,31 ^c ±7,2	85,92 ^{a,B} ±0,22
	5,0	1,93 ^a	0,48 ^b ±0,20	57,81 ^b ±5,77	70,33 ^{a,C} ±0,07

Controles	Água destilada + <i>Tween</i>	2,09 ^a	0,47 ^b ±0,07	100 ^a ±0,00	0,00 ^{b,F} ±0,00
	Químico	2,13 ^a	0,39 ^b ±0,03	100 ^a ±0,00	0,00 ^{b,F} ±0,00

Médias com letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo Teste de Tukey (ANOVA) realizado pelo SAEG estatística.

Estatisticamente podem ser observadas algumas diferenças significativas tanto para cada OE em relação aos tratamentos em suas diferentes concentrações quanto entre os diferentes OEs testados. Resumidamente, foi possível observar que os OEs mais eficazes em relação à concentração foram nos seguintes tratamentos: *C. zeylanicum*; *E. globululus* e *C. reticulata* na concentrações de 2,5% e 5,0% variando de 89,78%-100,0%, exceto OE *O. basilicum* que foi mais eficiente apenas na concentração de 2,5% com eficácia de 95,95%. Entretanto quando observados os diferentes OEs foi possível verificar que os tratamentos mais eficazes foram: OE *C. zeylanicum* com 100% de eficácia nas concentrações de 2,5% e 5,0%; OE *O. basilicum* e OE *E. globululus* com as eficácias de 95,95% e 91,92% nas concentrações de 2,5%, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

O controle do carrapato bovino *R. (B.) microplus* depende fortemente de acaricidas químicos. Atualmente muitas populações de carrapatos têm adquirido resistência as principais classes de acaricidas, sendo estes produtos descritos na literatura com altas taxas de resistência ao carrapato bovino, bem como consequências ao gado como perdas na produção do leite e couro; e danos ao meio ambiente. Além disso, prejuízos anuais têm sido descritos na aquisição de acaricidas químicos na tentativa de controle do ectoparasito (EMBRAPA, 2019). Consequentemente, diferentes estratégias de manejo com o objetivo de minimizar as consequências causadas pela resistência a acaricidas têm sido buscadas, sendo que uma delas é o uso combinado de acaricidas e sinérgicos (Díaz *et al.*, 2019). Desta forma, o estudo da botânica aplicada à parasitologia tem apresentado potencial promissor no controle sustentável do carrapato bovino, principalmente pelo uso dos OEs que tem sido descritos com efeitos positivos sobre diversos parasitos como no caso do *R. (B.) microplus*. É fundamental ressaltar a importância da botânica neste estudo, sendo destaque os compostos secundários presente nas plantas que tem apresentado o possível efeito acaricida no ectoparasito estudado.

A espécie de *O. basilicum* apresentou vários compostos, sendo a caracterização majoritária do constituinte linalol com 64,15 % e eugenol com 15,15%. No estudo de Oliveira *et al.* (2022), a espécie de *O. gratissimum* apresenta três compostos mais conhecidos que são: timol, geraniol e eugenol. Os estudos de Lima *et al.* (2017) mostraram as atividades larvicidas variando de 0,84 a 2,57 mg/mL (CL50) e 1,37 a 4,23 mg/mL (CL90) para o óleo de *O. gratissimum* contra larvas de *R. (B.) microplus*. Os principais compostos identificados foram timol (33,4 a 47,9%) e γ -terpineno (26,2 a 36,8%). Existem estudos desta espécie em *spray* à base de eugenol a 7,5% que atuou com mortalidade larval de 100% contra larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Oliveira *et al.*, 2022).

O óleo essencial de *S. officinallis* apresentou os compostos majoritários: eucaliptol e cânfora que segundo estudos possuem atividade acaricida (Tabela 2). Os estudos sobre a atividade inseticida do óleo

essencial de *E. globulus* foi associada ao alto teor de 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol frente às larvas de *R. (B.) microplus* tanto para cepa suscetível quanto para cepa resistente (Cardoso et al. 2020). Em estudo realizado com larvas de *R. (B.) microplus*, o eucaliptol apresentou maior inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) contra a cepa resistente (CI50 0,36 mg/mL) do que na cepa suscetível (CI50 3,41 mg/mL). As diferenças observadas na inibição da enzima recombinante (rBmAChE1) por óleos essenciais são fortemente sugestivas quanto ao seu papel na atividade total de AChE presente em larvas de carrapatos (Santos et al., 2021).

A espécie *C. calophyllum* é rica em germacreno-D (42,54%), que representa quase metade de sua composição química, e a espécie *P. emarginatus* em germacreno-D (26,93%). Este é o primeiro estudo com a espécie *C. calophyllum* que avaliou a atividade larvicida frente a *R. (B.) microplus*. No entanto, estudos biológicos da espécie têm mostrado diversas aplicações potenciais como em larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio de desenvolvimento e *Leishmania amazonenses* (Xavier et al., 2016). Também outros estudos apresentaram os principais componentes de *Lantana camara* como o hidrocarboneto sesquiterpênico biciclogermacreno (19,4%) e germacreno-D (12,3%) e para espécie *Lantana montevidensis* foram encontrados (E)- β -cariofileno (31,5%), germacreno-D (27,5%) e biciclogermacreno (13,9%), sendo que os OEs destas espécies botânicas apresentam altos percentuais de biciclogermacreno, germacreno-D e β -cariofileno com atividade significativa contra *R.(B.) microplus* com mais de 50% de morte em concentrações de 10, 15 e 20 mg/mL, também observado 95,06% e 99,27% de mortalidade larval nas maiores concentrações (Sousa et al., 2020).

Para a espécie de *Citrus reticulata* Blanco são destacados 13 compostos, que representam 97,8% de todos os componentes, sendo identificados no óleo da casca da fruta. Sendo o principal composto encontrado no OE foi limoneno (85,7%) em diversos estudos (Hamdan et al., 2016; Martins et al., 2017; Oliveira et al., 2023). Além disso, OEs de diferentes espécies de *Citrus* são quimicamente semelhantes com predominância do monoterpene limoneno, características apontadas por Bozkurt et al. (2017). A espécie de *Citrus reticulata* Blanco é rica em limoneno (85,7%) (Oliveira et al., 2023), assim, estudos com extratos da espécie *Citrus sinensis* (cascas de laranja) também contém uma maior concentração de limoneno. Este estudo apresentou mortalidade larval nas concentrações de 75,0% e 95,0% (prensa térmica) em 90,0% e 98,0%, respectivamente; e na concentração de 95,0% (prensa fria) em 92,0% para larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato de cães) (Armugam et al., 2016).

Também foi possível identificar a atividade acaricida e ovicida nos testes com as fêmeas ingurgitadas onde o OE de *C. zeylanicum* (canela) apresentou eficácia máxima (100%) ao inibir a eclosão das larvas tanto na concentração de 2,5% quanto 5,0%. Entretanto, os demais OEs *O. basilicum* (manjerição), *E. globulus* (eucalipto) e *C. reticulata* (tangerina) tiveram a eficácia ao inibir a eclosão de larvas em 95,95%; 91,92% e 85,92% na concentração de 2,5%; respectivamente. Possivelmente, a atividade acaricida no estágio adulto tenha sido causada pelos compostos Linalol, Eugenol, Limoneno e Eucaliptol presente nos diferentes OEs estudados. Já existem estudos com Timol e Eugenol que atuam na atividade contra fêmeas ingurgitadas ao inibir a oviposição e/ou eclosão de larvas de *R. sanguineus* (Silva et al. 2023). Também alguns estudos

revelaram que o óleo de eucalipto afeta a fertilidade de alguns insetos (Campolo et al., 2018; Hategekimana e Erler, 2020).

O óleo essencial de *Cymbopogon nardus* L. Rendle (citronela) apresenta eficácia máxima (100%) nas concentrações de 12,5%, 6% e 3% e mesmo na concentração de 1% obteve alta eficácia, 95,30% contra fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* (Nicolino et al., 2013). Os resultados apresentaram grande similaridade com os observados por tanto por Nicolino (2013) para *R. (B.) microplus* e Silva et al. para *R. sanguineus* (2023) quanto por Olivo et al (2008) que encontrou 92,1% de eficácia no óleo de citronela sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* na concentração de 1%. Deste modo, existe uma correlação entre o peso inicial de fêmeas ingurgitadas de carrapatos bovinos e os parâmetros referentes ao processo de oviposição (Borges et al. 2001; Santos e Furlong, 2002). Além disso, ao observar estudos com as combinações de Timol e Eugenol apresentaram controle de 99,9% a 5,0 mg/mL ao alterar a fertilidade causando alterações histopatológicas nos ovócitos das fêmeas de *R. sanguineus* (Silva et al. 2023), assim, inibindo a oviposição e/ou até a eclosão das larvas como possivelmente observado no estudo (Tabela 4).

Deste modo, analisando as concentrações testadas a mais eficaz foi a de 2,5%, sendo que *C. zeylanicum* (canela), *O. basilicum* (manjeriço) e *E. globulus* (eucalipto) tiveram as eficácias ao inibir a eclosão de larvas em 100,0%; 95,95% e 91,92%, respectivamente (Tabela 4). Além disso, quando se compara os óleos essenciais com os controles pode ser observado que os OEs apresentaram maior eficácia visto que o controle químico com piretróide a base de cipermetrina a 6% não teve nenhum efeito, assim, como o controle com água destilada + Tween, pois ambos apresentaram nenhuma eficácia em inibir a eclodibilidade das larvas de *R. (B.) microplus*.

Outro ponto importante para ser observado no estudo é que os óleos essenciais testados foram dose-dependente (Tabela 3), ou seja, foram bastante eficazes na mortalidade das larvas de *R. (B.) microplus*. Também não deve ser descartada a possibilidade o sinergismo e antagonismo dos compostos químicos encontrados uma vez que esta interação pode ter efeito positivo ou negativo, sendo que o estudo apresentou potencial positivo, assim é possível pensar em um efeito sinérgico dos compostos encontrados até mesmo daqueles em menor proporção aos componentes majoritários. Segundo Bakkalai et al (2008), a eficácia inseticida ou acaricida de muitos óleos essenciais já está bem documentada para uma variedade de pragas, no entanto, geralmente apresentam dois ou três principais terpenos ou componentes terpenoides, que constituem até 30% do óleo (Bakkalai et al., 2008). Além disso, essa eficácia é frequentemente atribuída ao(s) principal(ais) componente(s) do óleo; no entanto, também há evidências de que os vários componentes de cada óleo podem trabalhar em sinergia (Ellse e Wall, 2014).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre os artrópodes ainda é desconhecido, mas estudos sugerem que, por meio do contato, podem interagir com o tegumento do inseto agindo em enzimas digestivas e neurológicas, acarretando sinais tóxicos bem aparentes (Knaak e Fiuza, 2010). Algumas pesquisas apontam o eugenol, como um potente inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE), o que poderia justificar sua elevada atividade frente a *R. (B.) microplus*. Os estudos de Dohi e Makino (2009) revelaram a potente atividade inibitória de AChE do eugenol, um dos componentes do óleo de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae). No entanto, os componentes individuais dos óleos contribuíram com até 25% da atividade inibitória de AChE

observada no estudo (Dohi e Makino, 2009). Deste modo, a ação dos óleos essenciais sobre os insetos pode ser neurotóxica, dando sintomas semelhantes aos produzidos pelos inseticidas organofosforados e carbamatos ou inibição da AChE e paralisia de insetos associada, conforme relatado em experimentos com *Tribolium castaneum* (besouro castanho), que terpenóides como citral, linalol, acetato de bornila e cineol, paralisaram e mataram este inseto (Lopez e Pascual-Villalobos, 2010). Alternativamente, a natureza hidrofóbica dos óleos essenciais pode exercer efeitos mecânicos simultâneos, como a desregulação cuticular e bloqueio dos espiráculos, o que leva a morte dos parasitos por estresse hídrico ou asfixia (Ellse e Wall 2014).

Os resultados encontrados demonstraram que as larvas apresentaram maiores taxas de mortalidade quando comparado as teleóginas. Essa diferença pode ser relativa à composição da cutícula entre estas duas fases de desenvolvimento dos carrapatos (Chagas *et al.*, 2003). A camada cuticular externa dos carrapatos adultos é formada por ceras e proteínas, podendo ser observada uma maior quantidade de lipídeos na cutícula do *R. microplus* a partir da ecdise da ninfa para a fase adulta, sendo que as larvas não possuem esta camada de cera o que pode ter permitido uma maior ação dos compostos. Como as larvas de *R. microplus* possuem uma cutícula menos desenvolvida e sem a camada cerosa densa presente nos adultos, elas são mais suscetíveis aos efeitos dos óleos essenciais (Odhiambo, 1982). Desta forma, óleos essenciais são compostos hidrofóbicos que podem penetrar na camada lipídica da cutícula dos carrapatos adultos. Compostos como Linalol, Eugenol, Limoneno e Eucaliptol são conhecidos por sua alta afinidade por lipídeos e ao penetrar essa camada, eles podem dissolver ou desestabilizar os lipídeos da cutícula, comprometendo sua função protetora e levando à desidratação e morte do carrapato.

Deste modo, os estudos de espécies botânicas podem ser primordiais para identificar os compostos secundários presente para o desenvolvimento de produtos de origem vegetal e que possam atuar com potencial acaricida, e assim reduzir e/ou eliminar os prejuízos ocasionados pelo ectoparasita, bem como das patologias visto que os carrapatos podem ser vetores de diversos patógenos, gerando danos econômicos e ecológicos. Além disso, as espécies botânicas estudadas são descritas por sua grande amplitude por atuarem em diversos fins medicinais, sendo que este alta estudo apresentou eficácia nos resultados para atividade acaricida contra o *R. (B.) microplus* com os diferentes óleos essenciais testados. No entanto, poucos estudos foram encontrados com estas espécies vegetais frente aos carrapatos, raros os testes de toxicidade e a ausência de testes *in vivo* devido à dificuldade em transpor os testes a campo devido à degradação dos princípios ativos presentes no OEs.

5. CONCLUSÃO

Portanto, este estudo permitiu observar a existência de diversos metabolitos secundários presente nos OEs das espécies estudadas com eficácia na atividade com 100% de mortalidade contra o *R. (B.) microplus*, principalmente no estágio larval em quase todos os OEs testados. Através da utilização dos óleos essenciais é possível observar uma bioatividade que possa retardar o desenvolvimento de resistência devido à presença de várias moléculas ativas com diferentes modos de ação e afetando vários alvos ao mesmo tempo, o que reduziria a pressão seletiva através de estudos da botânica aplicada à parasitologia.

6. REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography Mass Spectrometry. Carol Stream: Illinois, 2007.
- Allen Jr, L.V.; Popovich, N.G.; Ansel, H.C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- Armugam V., Sundraraj Y.A., Saleh I. *The effect of Citrus sinensis peel extract against Rhipicephalus sanguineus (Dog Ticks)*. Malaysian Applied Biology, 2016. Disponível em:<http://journalarticle.ukm.my/11823/1/45_02_18.pdf>.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. Biological effects of essential oils—a review. Food and Chemical Toxicology, 46, 446–475, 2008. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>>
- Benelli, G.; Pavela, R.; Maggi, F.; Wandjou, J. G. N.; Fofie, N. G. B. Y. ; Koné-Bamba, D. A; Sagratini, G.; Vittori, S.; Caprioli, G. *Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from Ocimum gratissimum grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. Industrial Crops and Products*, 2019. Disponível em:<[doi:10.1016/j.indcrop.2019.02.047](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.047)>.
- Bozkurt, T.; Gulnaz, O.; Kaçar, Y.A. Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity. Journal of Environmental Science. Toxicology and Food Technology, vol. 11,29-33p, 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.9790/2402-1110032933>>.
- Brasil. Portaria n°48, de 12 de maio de 1997. MAPA. Brasília, 1997. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=72818869>
- Campolo, O.; Giunti, G.; Russo, A.; Palmeri, V.; Zappalà, L. . Essential Oils in Stored Product Insect Pest Control. J of Food Quality Volume 2018. Disponível em: <doi.org/10.1155/2018/6906105>
- Cardoso, A.S.; Santos, E.G.G.; Lima, A.D.S.; Temeyer, K.B.; Pérez, De León, A.A.;Costa, L.M.J. Terpenes on Rhipicephalus (Boophilus) microplus: acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. Vet Parasitol, 2020. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109090>>.
- Chagas, A. C. S.; Leite, R. C.; Furlong, J.; Prates, H. T.; Passos, W.M. Sensibilidade do carrapato Boophilus microplus a solventes. Ciência Rural, v. 33, n. 1, p. 109-114, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000100017> >
- Díaz, E. L.; Camberos, E. P.; Herrera, G. A. C.; Espinosa, M. E.; Andrews, H. E.; Buelnas, N. A. P.; Ortega, A. G.; Velázquez, M. M. Development of essential oil-based phyto-formulations to control the cattle tick Rhipicephalus microplus using a mixture design approach. Experimental Parasitology 201, 26–33, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.008>>
- Dohi, S.; Terasaki, M.; Makino, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. J Agric Food Chem. 2009 May 27;57(10):4313-8. doi: 10.1021/jf804013j. Epub 2009 Apr 9. PMID: 19358605.
- Ellse, L., Wall, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. Med. Vet. Entomol. 28, 233–243, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/mve.12033>>
- Embrapa. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- Hamdan, D.I.; Mohamed, M.E.; El-Shazly, A.M. Citrus reticulata Blanco cv. Santra leaf and fruit peel: a common waste products, volatile oils composition and biological activities. Journal of Medicinal Plants Research, vol. 10, no. 30, pp. 457-467p, 2016. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2016.6139>>.

Hategekimana, A.; Erler, F. Fecundity and fertility inhibition effects of some plant essential oils and their major components against *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: bruchidae). *J. Plant Dis. Prot.* 127, 615–623, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s41348-020-00311-3>>

Knaak, N., Fiuza, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Neotropical Biology and Conservation*, vol. 5, pp. 120-132, 2010. <http://dx.doi.org/10.4013/nbc.2010.52.08>

Kumar, K.G.A.; Sharma, A.K.; Kumar, S.; Ray, D.D.; Rawat, A.K.S.; Srivastava, S., Ghosh, S. Comparative in vitro anti-tick efficacy of commercially available products and newly developed phyto-formulations against field collected and resistant tick lines of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Parasite. Dis.* 40, 1590–1596p, 2016. Disponível: <<https://doi.org/10.1007/s12639-015-0736-3>>

Lefcort, H.; Tsybulnik, D.Y.; Browning, R.J.; Eagle, H.P.; Eggleston, T.E.; Magori, K.; Andrade, C.C.. Behavioral characteristics and endosymbionts of two potential tularemia and rocky mountain spotted fever tick vectors. *J. Vector Ecol.* 45, 321, 2020. Disponível em: <10.1111/jvec.12403>

Leite, R. C. Efficacy of doramectin against natural infestations of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 53-56, 1995. Disponível em: <http://cbpv.com.br/rbpv/documentos/411995/c4153_56.pdf>.

Lima, A.S.; Milhomem, M. N.; Monteiro, O. S.; Arruda, A. C. P.; Castro, J. A. M. S.; Fernandes, Y. M. L.; Maia, J. G. S.; Costa-Junior, L. M.. *Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of Ocimum gratissimum and its major constituents against Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae). Parasitology Research*, 2017. Disponível em: <[doi:10.1007/s00436-017-5662-0](https://doi.org/10.1007/s00436-017-5662-0)>

Lopez, M.D.; Pascual-Villalobos, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, 31, 284–288, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.005>>

Martins, M.H.G.; Fracarolli, L.; Vieira, T.M.; Dias, H.J.; Cruz, M.G.; Deus, C.C.H., Nicolella, H.D.; Stefani, R.; Rodrigues, V.; Tavares, D.C.; Magalhães, L.G.; Crotti, A.E.M. Schistosomicidal effects of the essential oils of *Citrus limonia* and *Citrus reticulata* against *Schistosoma mansoni*. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 14, no. 1, 2017 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600194>>.

Odhambo, T.R. *Current Themes in Tropical Science: physiology of ticks*. Pergamon, Oxford. 1982. 508p.

Oliveira, A. C. S. D.; Fernandes, Santos, C. C.; L. S.; Candido, A. C. B. B.; Magalhães, L. G.; Miranda M. L. D. *Chemical composition, in vitro larvicidal and antileishmanial activities of the essential oil from Citrus reticulata Blanco fruit peel*. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 83, e247539, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.247539>>.

Oliveira, L.M.; Chaves, D. S. A.; Jesus, I. L. R.; Miranda, F. R.; Ferreira, T. P.; Nunes-Silva, C; Alves, N. S.; Alves, M. C. C.; Avelar, B. R.; Scott, F. B.; Campos, D. R.; Cid, Y.P. *Ocimum gratissimum* essential oil and eugenol against *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*: In vitro activity and residual efficacy of a eugenol-based spray formulation. *Veterinary Parasitology*, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109771>>

Pasay, C.; Mounsey, K.; Stevenson, G.; Davis, R.; Arlian, L.; Morgan, M.; Vyszynski-Moher, D.; Andrews, K.; McCarthy, J. Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. *PLoS ONE* 5: 1-9, 2010.

Pereira, D.F.S; Ribeiro, H.S.; Gonçalves, A.A.M. *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. *Ticks Tick-Borne Dis* 13:101828, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101828>>

Santos, E.G.G., Bezerra, W.A.S., Temeyer, K.B., Leó, A.A.P., Costa-Junior, L.M., Soares, A.M.S. Effects of essential oils on native and recombinant acetylcholinesterases of *Rhipicephalus microplus*. *Braz J Vet Parasitol*, 2021. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/S1984-29612021024>>.

Santoro, G.F.; Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L.; Mendonça, L.Z. Soares, M.J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 116: 283–290, 2007.

Silva, I.S.; Vale, L.; Coutinho, A.L.; Sousa, L.J.M.P.E.; Marchesini, P.; Matos R. S.; Anholeto, L.A.; Mathias, M.I.C.; Ferreira, L.L.; Arruda, W.; Monteiro, C. Thymol and eugenol against *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* engorged females: Biological, histopathological and bioinformatic analysis. *Vet Parasitol*. 2023 Jul;319:109938., Epub 2023. Disponível em: <[10.1016/j.vetpar.2023.109938](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109938)>

Sousa, E. O.; Lima, A. S.; Lopes, S. G.; Costa-Junior, L. M.; Costa, J. G. M. *Chemical composition and acaricidal activity of <i>Lantana camara</i> L. and <i>Lantana montevidensis</i> Briq. essential oils on the tick <i>Rhipicephalus microplus</i>*. *Journal of Essential Oil Research*, 2020. Disponível em:<[doi:10.1080/10412905.2020.1752320](https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1752320)>.

Stone, B. F.; Haydock, K. P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.)', *Bulletin of Entomological Research*, 53(3), p. 563, 1962. Disponível em:< [doi: 10.1017/S000748530004832X](https://doi.org/10.1017/S000748530004832X)>.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention Pesticide and Toxic Substances Program. Thymol R.E.D Facts, 1993. Disponível em:<https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-080402_1-Sep-93.pdf>

Valente, P.P. Estudo da eficácia *in vitro* e *in vivo* de bioterápicos e produtos naturais no controle de *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) e sua relação com o bem-estar animal. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - BELO HORIZONTE - 2014

Veríssimo, C. J. Resistência e controle do carrapato-do-boi. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2015.

Vita, G. F.; Dumas, E.; Pereira, M. A. V. Da C.; Ferreira, I. Avaliação *in vitro* de carrapaticidas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), no norte do estado do Rio de Janeiro, Brazil, *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(2), p 1–6, 2012.

Xavier, M.N.; Alves, C.C.F.; De Melo, C.C.; Santos, N.H. Chemical composition of the volatile oil of *Cardiopetalum calophyllum* collected in the Cerrado area. *Cienc Rural*. 46(5):937–942, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150371>>

CAPÍTULO 2

Artigo formatado de acordo com a Revista *Brazilian Journal of Pharmacognosy*

Desenvolvimento de formulação à base de óleo essencial usando uma abordagem sustentável ao controle de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Luciano dos Reis Silva Santos^{1*}, Elisangela Oliveira Desidério¹, Marta Cristina Pereira da Silva¹, Marcelo Nogueira Xavier², Juliana Pimenta Cruz³, Valdo Soares Martins Júnior⁴; Eduardo Robson Duarte⁴, Mauro Aparecido de Sousa Xavier⁵, Viviane de Oliveira Vasconcelos⁶

¹Pós-graduação em Botânica Aplicada, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

²Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde-GO

³Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

⁴Instituto de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

⁵Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

⁶Pós-graduação em Botânica Aplicada, Universidade Estadual de Montes Claros, MG

*lucianossantos89@gmail.com

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias lipofílicas e odoríferas derivadas do metabolismo secundário de diversas plantas. Durante o desenvolvimento de novas formulações é preciso observar mudanças significativas no processo de fabricação, sendo a estabilidade importante para manter o produto dentro de limites estabelecidos. O estudo objetivou avaliar o desenvolvimento de formulações oleosas sem aditivos sintéticos ao carrapato bovino *R. (B.) microplus* na busca de encontrar alternativas sustentáveis. Foram coletadas sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel de plantas adultas localizadas na zona rural do município de Rio Verde-GO submetidos à hidrodestilação por 4 horas em aparelho do tipo Clevenger e também OEs comerciais de outras espécies. As amostras com óleos essencial e soja (OE/OS) foram preparadas a 0,5% e armazenadas durante Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) por 30 dias nas temperaturas de -20°C, -4°C, 25°C e 37°C. Também foram preparados pacotes com papel filtro (Whatmann nº 1) e testada a concentração de 0,5 % (V/V) de cada OEs, sendo analisado após 24 horas a mortalidade e/ou motilidade, sendo analisadas as diferenças estatísticas pelo Teste de *Tukey*. Os resultados destacam a formulação de OE/OS a 0,5% de *Eucalyptus globulus* que provocou 97,41% e 71,0% de mortalidade em larvas *R. (B.) microplus* nas temperaturas de -20°C e -4°C, respectivamente. Portanto, os OEs podem ser alternativas sustentáveis ao controle de larvas do *R. (B.) microplus* buscando produtos de origem vegetal sem aditivos. No entanto, é preciso novos testes pensando na possibilidade de encapsulamento dos OEs para manter suas propriedades organolépticas visando uma maior eficácia.

Palavras-chave: Estabilidade. Formulações. Óleo Essencial. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) are lipophilic and odorous substances derived from the secondary metabolism of several plants. During the development of new formulations, it is necessary to observe significant changes in the manufacturing process, and stability is important to maintain the product within established limits. The study aimed to evaluate the development of oily formulations without synthetic additives for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* in the search for sustainable alternatives. Seeds of *Pterodon emarginatus* Vogel were collected from adult plants located in the rural area of the municipality of Rio Verde-GO and subjected to hydrodistillation for 4 hours in a Clevenger-type apparatus, as well as commercial EOs of other species. The samples with essential oils and soybean (EO/OS) were prepared at 0.5% and stored during the Accelerated Stability Test (AST) for 30 days at temperatures of -20°C, -4°C, 25°C and 37°C. Filter paper packets (Whatmann n° 1) were also prepared and a concentration of 0.5% (V/V) of each EO was tested. After 24 hours, mortality and/or motility were analyzed, and statistical differences were analyzed using the Tukey test. The results highlight that the EO/OS formulation at 0.5% of *Eucalyptus globulus* caused 97.41% and 71.0% mortality in *R. (B.) microplus* larvae at temperatures of -20°C and -4°C, respectively. Therefore, EO can be sustainable alternatives for controlling *R. (B.) microplus* larvae, seeking products of plant origin without additives. However, further tests are needed considering the possibility of encapsulating EO to maintain its organoleptic properties for greater efficacy.

Keywords: Stability. Formulations. Essential Oil. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias lipofílicas e muitas vezes odoríferas derivadas do metabolismo secundário de diversas plantas que apresentam uma composição complexa de líquidos voláteis (Alves *et al.*, 2022; Kuzey, 2021). Para que uma substância possa ser utilizada com fins terapêuticos, muitas vezes faz-se necessária sua incorporação a uma formulação farmacêutica e até mesmo a inclusão de outros componentes; visando um produto estável, eficaz, de fácil aplicação e com características organolépticas que facilitem sua aceitação pelo consumidor (Delmonte, 2017).

Durante o desenvolvimento de novas formulações é preciso observar mudanças significativas no processo de fabricação (Brasil, 2004). As formulações farmacêuticas possibilitam o uso do princípio ativo buscando as doses mais adequadas, proteção do fármaco das influências ambientais, ocultam características indesejáveis como odor ou sabor, permite a veiculação de substâncias que possam ser pouco solúveis ou instáveis e permitem a ação controlada do fármaco, bem como a sua aplicação de acordo com o local de ação desejado (Allen *et al.*, 2007).

Os carrapaticidas, medicamentos utilizados no controle de infestações de carrapatos, são produtos feitos à base de compostos químicos que atuam de diferentes maneiras no organismo dos parasitas, levando à sua morte ou impedindo seu desenvolvimento. A escolha do carrapaticida ideal deve ser feita através de carrapaticidograma ao verificar a eficácia do produto. Deste modo, é importante observar as principais formas dos produtos carrapaticidas bovinos que podem ser utilizadas como: a pulverização, os banhos de imersão, a aspersão, o *pour-on* e/ou de forma injetável (Furlong *et al.*, 2007; Chiebao *et al.*, 2006). Quando uma substância passa a ser estudada para determinada aplicação terapêutica, são aplicados estudos de formulação para estabelecer as características iniciais do produto, e qual será sua forma farmacêutica mais adequada (Delmonte, 2017). Na sequência, o produto é submetido a testes progressivos de ensaios pré-clínicos (testes *in vitro*) e clínicos, de modo que este tenha eficácia e segurança comprovadas antes de seu registro e comercialização (Allen *et al.*, 2007).

Durante a preparação destas formulações podem ser utilizados agentes emulsificantes ou surfactantes, que são substâncias com propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, e constituirão a interface responsável pela manutenção da estabilidade da formulação estudada. As emulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), sendo que as emulsões O/A apresentam gotículas de óleo dispersas em uma fase contínua de água; já as emulsões A/O são destacadas por suas gotículas de água dispersas em uma fase contínua de óleo (Delmonte, 2017). Dentre as vantagens destas formas farmacêuticas destacam-se a possibilidade de administração de princípios ativos insolúveis em outros veículos, disfarçar das características organolépticas de determinados fármacos, melhorando sua aceitação, aumentar a sua estabilidade e oferecer fácil aplicação e remoção do produto da pele (Allen *et al.*, 2007).

Entretanto, os estudos de estabilidade têm por objetivo avaliar a capacidade de um produto manter as características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas e de segurança e eficácia (Brasil, 2004). A estabilidade permite manter dentro de limites estabelecidos e por tempo determinado, as propriedades e características originais que apresentava no momento de sua fabricação (Brasil, 2012). Essas observações são importantes, pois determinam as condições de armazenamento ideais e o prazo de validade do produto. No

entanto, alguns fatores como a incidência de luz, as variações de temperatura, a presença de oxigênio e a umidade podem atuar como catalizadores nas reações de degradação das formulações (Delmonte, 2017). Os processos de instabilidade das formulações farmacêuticas podem ser detectados, muitas vezes, por alterações de suas características organolépticas (Brasil, 2004; Allen *et al*, 2007). Desta maneira, o uso dos testes de estabilidade preliminar (TEP) ou acelerada (TEA) é utilizado como triagem inicial de formulações para o desenvolvimento de novos produtos, de modo que se escolha a mais estável para dar seguimento aos estudos (Allen *et al*, 2007).

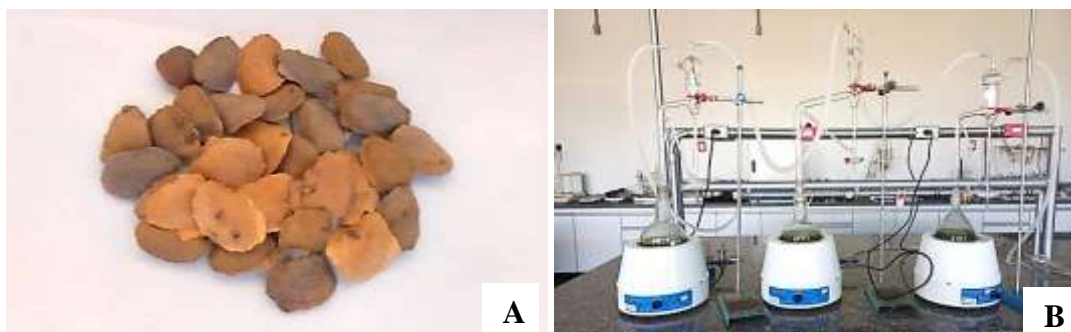
Portanto, o estudo objetivou avaliar o desenvolvimento de formulações oleosas sem aditivos sintéticos com efeito acaricida ao carrapato bovino *R. (B) microplus* na busca de encontrar alternativas sustentáveis através de produtos de origem vegetal.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção dos óleos de essenciais

As sementes de *P. emarginatus* Vogel (sucupira) foram coletadas de plantas adultas localizadas na zona rural do município de Rio Verde e armazenadas em um recipiente plástico com tampa ao abrigo da luz e da umidade. Foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob o número UFG-27.155 e realizado o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com registro de número AE877B9.

Para a extração do óleo essencial foram utilizadas sementes de *P. emarginatus*, sendo extraídos os óleos essenciais pelo processo de hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger* (Figura 1). As sementes de *P. emarginatus* foram secas a temperatura ambiente devido à sensibilidade dos compostos essenciais a temperaturas elevadas. Além disso, estas foram trituradas manualmente para aumentar a área superficial de contato, semente-água e em seguida submetidas à extração. Foram pesados 200g das sementes e acrescentado 1000 mL de água e colocadas em balão de fundo redondo deixando-se em ebulição por 4 horas controlando-se a temperatura em, aproximadamente, 100°C. Também foram adquiridos óleos essenciais comerciais com grau de pureza de 100% das espécies de *C. reticulata* (tangerina), *O. basilicum* (manjerição), *C. zeylanicum* (canela), *E. caryophyllus* (cravo) e *E. globulus* (eucalipto). O OE de *C. reticulata* foi extraído das cascas do fruto pelo método de expressão a frio; já os demais óleos comerciais foram extraídos de folhas pelo método de destilação por arraste a vapor.



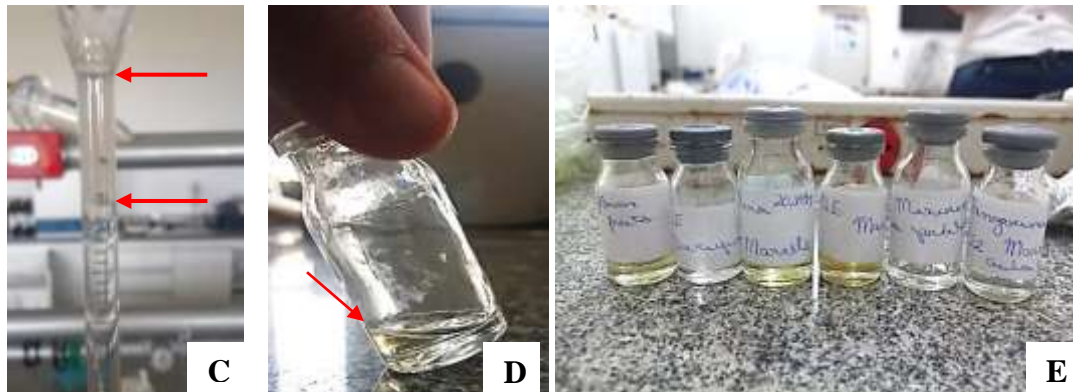


Figura 1. A. Sementes da espécie *P. emarginatus*. B. O processo de hidrodestilação em aparelho do tipo *Clevenger*. C e D. Rendimento do OE durante e após o processo de extração (setas). E. Óleos essenciais utilizados durante os bioensaios com TPL. Fonte: Arquivo dos autores, Rio Verde-GO e Unaí-MG, 2024.

2.2. Teste de Estabilidade Acelerado (TEA) *in vitro*

Para avaliação da estabilidade das formulações foram adotadas as diretrizes do teste de estabilidade preliminar cujo objetivo é acelerar o envelhecimento de um produto por aquecimento ou congelamento, também conhecido como Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) ou de curto prazo (Brasil, 2004). As formulações foram armazenadas durante 30 dias expostas a diferentes condições de estresse a fim de acelerar eventuais processos de instabilidade e foi realizada a avaliação sensorial e medição do pH para cada amostra, 24 horas após o preparo (1º dia do teste, antes de serem submetidas às condições de estresse) e ao 15º dia de exposição. As condições de armazenagem adotadas foram: temperatura elevada (em estufa a $37\pm 2^\circ\text{C}$), temperatura baixa (em geladeira a $-20\pm 2^\circ\text{C}$ e $4\pm 2^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) conforme proposto por Brasil (2004) com modificações.

Foram armazenadas 15 ml de cada formulação contendo óleos essenciais (OE) seguindo o preparo de 500 mL de óleo de soja para 2,5µL de cada OE, sendo mantidos por 30 dias nas temperaturas de -20°C , 4°C , 25°C e 37°C para a realização do TEA. Foi selecionada a concentração de 0,5%, sendo a menor concentração aplicada com atividade carrapaticida satisfatória para as larvas de *R. (B.) microplus* em quase todos OE testados. Todos os testes foram realizados em tubos de polipropileno graduados, transparentes e devidamente tampados. Para avaliação sensorial, as formulações foram avaliadas quanto a alterações na cor, odor e aspecto de cada formulação e também do pH que foi verificado por potenciômetro (modelo 86505) devidamente calibrado com soluções-tampão pH = 4 e pH = 7, buscando avaliar se a acidez ou basicidade poderia alterar a presença dos compostos secundários. As amostras foram avaliadas em temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) após o preparo da formulação (dia 0), após 24h (2º dia) e depois de 30 dias de armazenamento (Figura 2). Para a avaliação sensorial e interpretação dos testes foi adotada a seguinte nomenclatura para tradução dos resultados (Brasil, 2004): Normal, sem alteração (N); Levemente modificado (LM); e Intensamente modificado (IM).

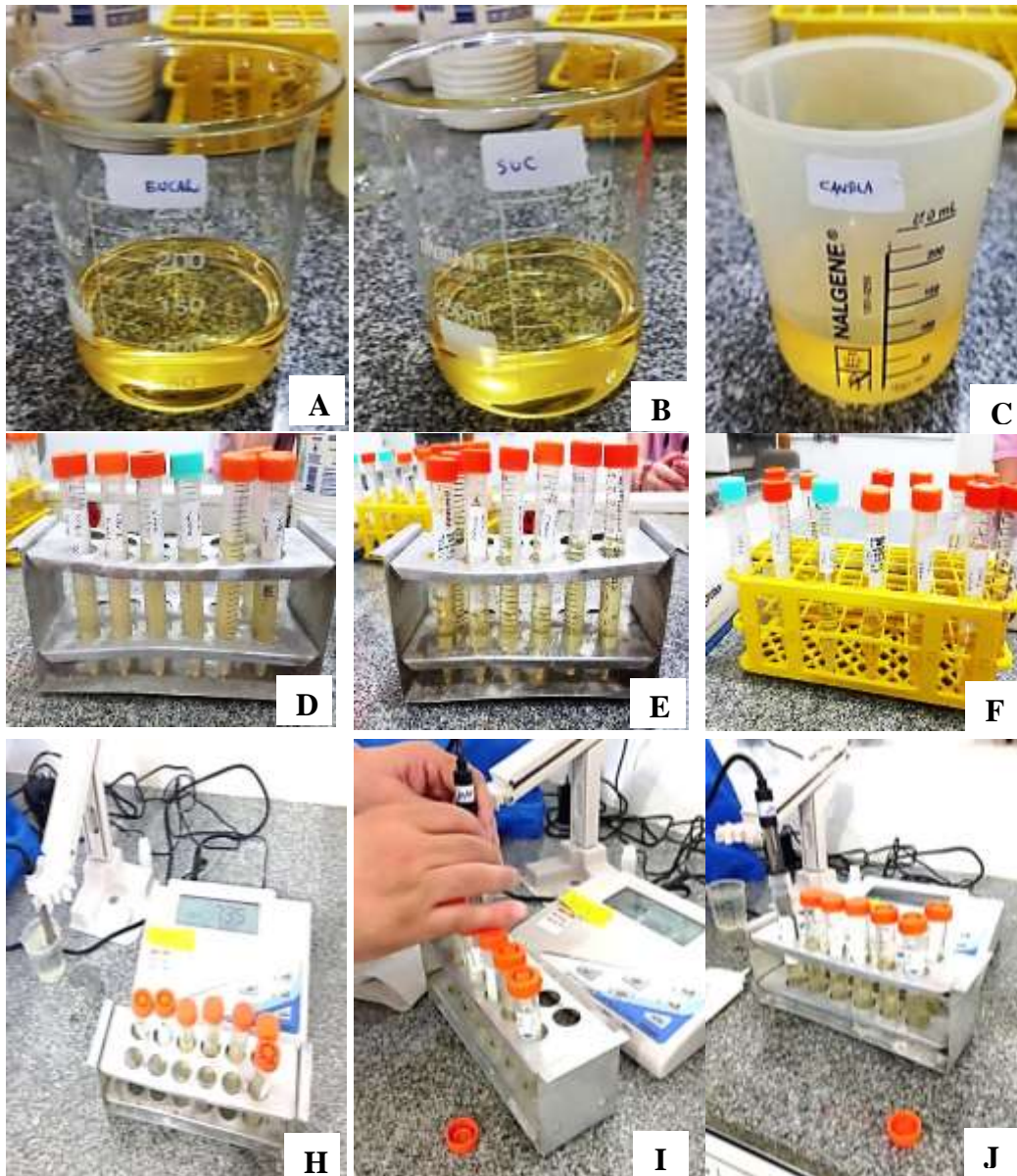


Figura 2. Procedimentos durante os Testes de Estabilidade Acelerada (TEA) das formulações. A-C: Preparação das formulações dos OEs na concentração de 0,5%. D-F: Armazenamento das amostras e identificação para separação nas temperaturas -20° C, 4°C, 25°C e 37°C. H-J: Verificação do pH pelo potenciômetro. Arquivo dos autores, Montes Claros-MG, 2024.

2.3. Obtenção de larvas de *R. (B.) microplus*

As larvas de *R. (B.) microplus* foram obtidas a partir de teleóginas do Tathersal Noroeste Leilões de Unaí-Minas Gerais. As teleóginas foram coletadas de bovinos mestiços (Figura 2A), naturalmente infestados e sem contato com acaricidas por no mínimo 30 dias. Após a coleta manual os carrapatos foram acondicionados em recipientes plásticos e transportados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. As teleóginas foram lavadas em água corrente, secas em papel absorvente e transferidas para placas de *Petri* 90 x 120 mm (Figura 3A) (Leite, 1995), sendo acondicionadas em estufa a 27-28°C e umidade relativa do ar de 80-95% até a postura dos ovos.

Para a obtenção das larvas foram utilizadas as posturas do terceiro ao décimo segundo dia e acondicionadas em seringa descartável de 5 ml, previamente preparadas (Figura 3B), cortando a extremidade próxima do canhão e feito um orifício de aproximadamente 0,1 mm de diâmetro, na metade desta. O êmbolo foi posicionado de forma a fechar o orifício e a extremidade cortada e vedada com algodão hidrofílico e mantida em câmara climatizada nas mesmas condições acima até a eclosão das larvas.

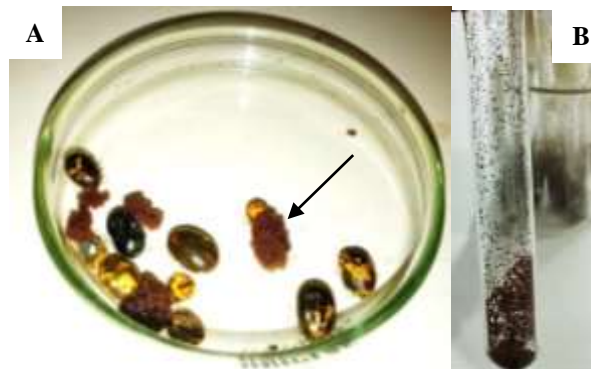


Figura 3. A – Teleóstegins após posturas (seta) coletadas do Tathersal Noroeste Leilões de Unai-Minas Gerais. B e C – Tubos vedados com algodão hidrofílico contendo larvas de *R. (B.) microplus* após eclosão dos ovos. Fonte: Arquivo dos autores, Montes Claros, 2023.

2.4. Testes do Pacote de Larvas (TPL) – Teste *in vitro*

O TPL foi desenvolvido por Stone e Haydock (1962) que consiste na exposição de larvas do carrapato a papel filtro impregnado com o carrapaticida e óleo essencial a serem testados, sendo quantificada a mortalidade das larvas após 24 horas. Primeiramente, foram preparados pacotes com papel filtro (*Whatmann* n° 1) tendo dimensões de 6 x 6 cm. Foi testada apenas a concentração de 0,5% (V/V) de OE; bem como controle positivo (controle químico com cipermetrina *pour on*) e controles negativos (com água e óleo de soja) (Figura 4).

Além disso, o processo de diluição do óleo essencial (OE) em óleo de soja (OS) foi de 500mL de OS com 2,5 μ L de OE. Em seguida, um volume de aproximadamente 200 μ L de cada diluição foi aplicado a um papel filtro de forma homogênea e secado. Após a secagem dos papéis tratados, as larvas (aproximadamente 60 larvas por pacote/4 repetições) foram inseridas em cada pacote por meio de um pincel fino e depois selado formando um pacote. Esses pacotes foram incubados a temperatura de 27-28°C e umidade relativa do ar de 80-95%.

2.5. Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas no software Sistema para Análises Estatísticas (SAEG versão 9.1). A significância das diferenças médias entre os tratamentos e o controle foi comparada usando a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de *Tukey*, sendo aplicada a partir de uma fórmula estatística usada para comparar as variâncias entre as médias de grupos diferentes. Deste modo, o teste permitiu determinar se houve alguma diferença entre as médias dos diferentes grupos para comparar

com as diferenças estatísticas entre os tratamentos. A diferença obtida foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Análise sensorial e parâmetros organolépticos durante TEA

As formulações de óleo essencial e óleo de soja (OE/OS) a 0,5% não apresentaram alterações nos parâmetros organolépticos de cor e aspecto no dia 0 (zero) e 24 horas após o preparo com alterações do pH de acordo com cada OE (Tabela 01). Após os 30 dias de exposição a diferentes condições de temperatura, todas as amostras testadas permaneceram com cor e aspecto normal (N) com variações do pH ao longo do período avaliado.

As formulações de OE/OS a 0,5% permaneceram aparentemente estáveis nas condições de temperatura testadas, sem exposição à luz em estufa e geladeira. No entanto, algumas das formulações OE/OS apresentaram alterações significativas em relação ao odor e ao pH. O OE de *E. caryophyllus* (cravo) e OE de *P. emarginatus* (sucupira) apresentaram alteração no odor em intensamente modificado (IM) para todas as temperaturas testadas. Já o OE de *C. zeylanicum* (canela), o OE de *O. basilicum* (manjeriço) e o OE de *C. reticulata* (tangerina) apresentaram variações entre normal (N), levemente modificado (LM) e intensamente modificado (IM) dependendo da temperatura e tempo de armazenamento analisado no 1º dia e 30º dia. Entretanto, o OE de *E. globulus* (eucalipto) e OS (soja) foram os únicos que não apresentaram alterações no odor. Desta maneira, os resultados da análise sensorial e análise do pH estão demonstrados detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1. Análise sensorial e de pH realizada em Testes de Estabilidade Acelerado (TAA) preliminar em três etapas, sendo dia 0; dia 1 (24h) e após 30 dias avaliando parâmetros organolépticos (odor, cor e aspecto) e físico-químicos (pH), Montes Claros-MG, 2024.

Concentração 0,5%	Parâmetros	Temperaturas								
		0 dia	1º dia				30º dia			
			-20°C	-4°C	25°C	37°C	-20°C	-4°C	25°C	37°C
Eucalipto	Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	7,58	7,0	5,12	5,58	5,58	5,75	6,01	6,44	6,02
Cravo	Odor	N	IM	LM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	7,58	6,91	5,33	5,64	6,00	5,98	5,68	6,48	6,47
Sucupira	Odor	LM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	7,56	6,34	5,39	5,94	6,04	7,09	6,07	6,88	6,64
Canela	Odor	N	LM	N	LM	IM	IM	IM	LM	IM
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	6,62	6,40	5,35	5,59	6,23	7,09	5,75	7,03	6,80
Tangerina	Odor	N	IM	IM	LM	IM	LM	IM	LM	IM

	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	6,48	6,83	5,35	5,79	6,22	5,21	5,54	6,61	6,41
Manjeriç�o	Odor	LM	N	N	N	N	LM	IM	N	LM
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	6,59	6,56	5,37	5,73	6,29	5,99	5,71	6,70	6,57
Soja	Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	6,67	6,18	5,56	5,41	6,44	5,59	5,87	7,62	6,14
�gua destilada	Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50

N = normal; LM = levemente modificado; IM = intensamente modificado.

3.2. Atividade acaricida dos OEs após os Testes de Estabilidade Acelerado (TEA)

A maior eficácia no TEA foi observada na formula o de OE/OS a 0,5% de *E. globulus* que provocou 97,41% e 71,0% de mortalidade em larvas *R. (B.) microplus* nas temperaturas de -20 C e -4 C, respectivamente. Outros resultados observados foram em *C. reticulata* e *O. basilicum* com 68,8% e 58,4% na temperatura de -20 C, respectivamente. No entanto, a maioria dos resultados apresentou eficácia abaixo de 90% de mortalidade, valor considerado baixo para que haja um controle efetivo de carrapatos, pois   exigido que o produto tenha um mínimo de 90% de eficácia somente sendo observada na formula o de *E. globulus* (BRASIL, 1997). Os resultados dos bioensaios com as formula es de OE/OS estão demonstrados na íntegra na Tabela 2.

Tabela 2. Médias percentuais de eficácia acaricida das solu es na concentra o de 0,5% do teste de estabilidade aplicado após 30 dias sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pelo Teste de do Pacote de Larvas (TPL), Montes Claros, MG, 2023 e 2024.

Tratamentos	Eficácia do produto (%)			
	-20�C	4�C	25�C	37�C
Eucalipto	97,4 ^{Aa}	71,0 ^{Bb}	0,0 ^{Dd}	20,7 ^{Dc}
Cravo	17,7 ^{Eb}	27,9 ^{Da}	0,0 ^{Dc}	2,0 ^{Fc}
Sucupira	1,2 ^{Fd}	26,5 ^{Db}	19,0 ^{Cc}	32,4 ^{Ca}
Canela	27,2 ^{Db}	30,6 ^{Ca}	0,0 ^{Dc}	0,0 ^{Fc}
Tangerina	63,8 ^{Ba}	34,9 ^{Cb}	0,0 ^{Dd}	13,2 ^{Ec}
Manjeriço	58,4 ^{Ca}	39,6 ^{Cc}	25,0 ^{Dd}	48,6 ^{Bb}
COS	0,0 ^{Ga}	0,0 ^{Ea}	0,0 ^{Da}	0,0 ^{Fa}
CH ₂ O	0,0 ^{Ga}	0,0 ^{Ea}	0,0 ^{Da}	0,0 ^{Fa}
CQ	100,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

As principais diferenças estatísticas podem ser observadas no OE de *E. globulus* na temperatura de -20°C que apresentou quase a mesma eficácia acaricida do controle químico à base de cipermetrina *pour on* a 6%. Já as menores eficácias podem ser observadas para os OEs de *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *C. zeylanicum* e *C. reticulata* na temperatura de 25°C que tiveram os mesmo resultados comparados aos controles com COS e CH₂O que foi mortalidade de 0,0% (Tabela 2).

No entanto, foi possível observar, mesmo não atingindo a eficácia mínima de 90% exigida pela portaria nº 48 de 12 de maio de 1997 para um produto, foram observadas diferentes motilidade nas larvas de *R. (B.) microplus* a depender da temperatura e OEs testado (Brasil, 1997). A leitura ocorreu após 24 horas de contato com as formulações OE/OS a 5%, sendo que a contagem foi realizada visualmente, diferenciando larvas vivas e mortas por meio da motilidade através da sensibilidade das larvas ao TPL sobre papel impregnado com as formulações sem aditivos.

Deste modo, uma baixa motilidade foi observada nas larvas de *R. (B.) microplus* em todos os OEs nas temperaturas de -20°C e -4°C. Entretanto, quando observado os testes com a temperatura de 25°C; as larvas apresentaram baixa motilidade para os OEs de eucalipto, sucupira e manjeriço; mas os OEs de cravo, canela e tangerina, as larvas apresentam motilidade intermediária. Por fim, os testes na temperatura de 37°C foram observados uma alta motilidade para os OEs cravo, sucupira, canela e tangerina e uma baixa motilidade apenas nos OEs de eucalipto e manjeriço. Todos os OEs foram comparados com a alta motilidade observada nos controles negativos (COS e CH₂O) e com o controle positivo com cipermetrina *pour on* (CQ) que apresentou a mortalidade de 100% (Tabela 2).

4. DISCUSSÃO

No Brasil, o carrapato *R. (B.) microplus* tem apresentado uma elevada resistência às classes de acaricidas. Estudos realizados nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso detectaram múltiplas ocorrências de resistência a acaricidas envolvendo todas as classes químicas. Estes estados brasileiros são os maiores produtores de carne bovina e laticínios e têm laboratórios de diagnóstico de referência para resistência a acaricidas. Desta maneira, foi observado que as populações de *R. microplus* foram resistentes à cipermetrina, clorpirifós, amitraz e ivermectina (Zaldivar et al., 2024). Segundo Carneiro et al. (2015) foi observada a resistência das populações de *R. microplus* aos princípios amitraz ou deltametrina ou associação de cipermetrina, clorpirifós e citroneal. Para os autores, esse dado é preocupante para a escolha dos produtos a serem indicados no controle do carrapato na região Norte de Minas Gerais, uma vez que a resistência foi constatada a mais de uma classe de carrapaticida para cinco dos seis rebanhos avaliados (Carneiro et al., 2015).

Os carrapaticidas podem atuar por contato direto e pela ação sistêmica. Deste modo, os carrapaticidas por contato direto pertencem a cinco famílias: organofosforados, amidínicos, piretróides sintéticos, fenilpirazóis e spinosad. Neste grupo, a penetração do produto ocorre através da cutícula para que possa haver a intoxicação e a morte do carrapato. Já os carrapaticidas sistêmicos são representados por dois grupos, as lactonas macrocíclicas e as benzofenilureas que são metabolizados, distribuídos pela circulação a todo corpo do animal, atingindo os carrapatos (Furlong et al. 2007; Embrapa, 2010). De forma geral, a ação

destes compostos ocorre no sistema nervoso do carrapato, afetando os mecanismos de crescimento, neuropeptídeos e o sistema neuroendócrino (Taylor, 2001). Entretanto, alguns destes carrapaticidas não podem ser utilizados durante a lactação, nem nos bovinos de corte antes de seis semanas do abate (George *et al.* 2004; Furlong *et al.*, 2007).

Os OEs apresentam características como o baixo peso molecular, volatilidade e lipossolubilidade e são ideais para maior absorção na pele, Sistema Nervoso Central (SNC), Sistema respiratório e Trato gastrointestinal (TGI) (Alves *et al.*, 2022). Dentre estas substâncias presente nos OEs destaca-se o timol (Matos *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2015; Novato *et al.*, 2015), eugenol (Monteiro *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2023) e eucaliptol (Cardoso *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021), que já são bem descritos por sua atuação acaricida e tem apresentado resultados promissores quanto a sua atividade acaricida em diversos estudos.

O desenvolvimento de formulações contendo óleos essenciais sem aditivos sintéticos para o controle de carrapatos tem ganhado destaque por várias razões, especialmente no contexto de saúde animal, sustentabilidade ambiental e segurança humana. Formulações que contêm apenas óleos essenciais sem aditivos são vistos como uma alternativa natural aos pesticidas químicos tradicionais com baixa toxicidade para o ambiente e animais, a ausência de aditivos químicos sintéticos minimiza o risco de toxicidade tanto para os animais tratados quanto para o meio ambiente. Alguns aditivos podem ter efeitos colaterais indesejáveis, enquanto os óleos essenciais, sendo naturais, tendem a ser mais seguros, especialmente quando usados em especificações específicas (Benelli *et al.*, 2016; Vangchhia *et al.*, 2024).

Deste modo, o aumento de toxicidade em tratamentos com formulações a base de óleo essencial sem aditivos pode estar relacionado ao uso de promotores de permeação com propriedades lipofílicas (Delmonte, 2017). Ao observar a lipossolubilidade de alguns compostos como o timol, eugenol e eucaliptol pode-se suspeitar que formulações contendo estes compostos possuíssem uma maior interação com a camada de gordura da cutícula do parasito, facilitando sua entrada no organismo, e pela possibilidade de formação de um filme ao redor do tegumento. Além de auxiliar na permeação do princípio ativo, a deposição de substâncias oleosas sobre a cutícula pode ter gerado um efeito oclusivo, impedindo as trocas gasosas e de água através da mesma que, nesta fase, naturalmente já contém maior quantidade de cera pela atividade aumentada das glândulas dermais (Delmonte, 2017).

Deste modo, é importante destacar os efeitos ocorridos com a espécie de *E. globulus* (eucalipto) que apresentou 97,4% de mortalidade no estágio larval do *R. (B.) microplus*, submetidos a várias temperaturas diferentes. É importante observar que a eficácia dos estudos com o óleo essencial de *E. globulus* está associado ao alto teor de eucaliptol quando observadas atividades inseticidas, principalmente frente às larvas de *R. (B.) microplus* tanto para cepa suscetível quanto para cepa resistente (Cardoso *et al.*, 2020). Em estudo realizado com larvas de *R. (B.) microplus*, o eucaliptol apresentou maior inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo uso de óleos essenciais que são fortemente sugestivas quanto ao seu papel na atividade total de AChE presente em larvas de carrapatos (Santos *et al.*, 2021).

Entretanto, os OEs apresentados tiveram alterações no pH durante o teste de estabilidade. A alteração do pH pode afetar as propriedades carrapaticidas dos óleos essenciais, pois o pH pode influenciar a estabilidade, solubilidade e atividade dos compostos bioativos presentes nesses óleos. Uma alteração no pH pode provocar reações químicas, como oxidação e hidrólise, que degradam os compostos bioativos presentes nos óleos essenciais (Das e Prakash, 2024). Compostos como terpenos e aldeídos são particularmente sensíveis às variações de pH, o que pode reduzir sua eficácia acaricida (Ribeiro *et al.*, 2018; Chaudhari *et al.*, 2020). O estudo de Nicaretta *et al.* (2023) analisou o pH de diferentes acaricidas químicos. De acordo seus experimentos em TIA, as fêmeas de *R. (B.) microplus* imersas em soluções de controle negativo de água com pH 4,5; apresentaram menor taxa de eclosão de larvas, e por isso a hipótese de que somente o pH poderia interferir na eficiência reprodutiva das larvas. No ensaio de campo, também se observou que maiores eficácias (>80%) foram obtidas com acaricidas que apresentaram o pH 4,5 e 5,5 (Nicaretta *et al.*, 2023).

Desta maneira, poderia ser a explicação do pH de 5,75 na temperatura de -20°C ter a maior eficácia (97,4%) no OE de *E. globulus*, no entanto, *C. reticula* apresentou o pH de 5,21 e uma eficácia de 63,8% na mortalidade larval causando diferenças estaticamente, mas um resultado consideravelmente maior em comparação ao testes que os pH eram maiores em alcalinidade e basicidade. Entretanto, o pH mais alcalino a básico como observados *C. zeylanicum* (canela) com pH de 7,03 na temperatura 25°C poderia ser comparado ao controle OS com pH de 7,62; onde ambos apresentam nenhuma eficácia para mortalidade das larvas de *R. (B.) microplus* (Tabelas 1 e 2).

Em relação aos estudos de estabilidade preliminar, Delmonte (2017) verificou que as soluções hidroalcoólicas nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL mantiveram-se estáveis em todas as condições de armazenagem testadas. Entretanto, a emulsão a 2,5 mg/mL demonstrou sinais aparentes de instabilidade apresentando uma cremeação quando submetida ao calor excessivo e aos ciclos de congelamento e descongelamento. No entanto, segundo Brasil (2004), pequenas alterações nestas condições são aceitáveis, frequentes e até mesmo esperadas; também não houve variação significativa nos seus valores de pH. Por ser um estudo inédito envolvendo o desenvolvimento de novos produtos a base de OEs sem aditivos sintéticos com efeito acaricida para uso tópico, os resultados apresentados têm valor considerável para o OE de *E. globulus* e podem subsidiar novas pesquisas em relação a essa temática tão importante ao controle sustentável do *R. (B.) microplus*.

Também avaliar a questão do tempo (24 horas) de exposição das larvas de *R. (B.) microplus* aos OEs seria interessante. Os estudos de Fernandes *et al.* (2008) demonstrou melhor potencial larvicida em uma menor concentração, sendo capaz de causar uma mortalidade de 99% das larvas *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato-vermelho-do-cão) com óleo-resina de *Copaifera langsdorfii* (copaíba-do-cerrado) a 2,7 mg/mL e com extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* L. (saboeiro) a 3,9 mg/mL. No entanto, os testes foram avaliados após 48 horas permitindo a alta eficácia acaricida (Fernandes *et al.*, 2008). Assim, novos testes com uma avaliação após 48 horas poderiam apresentar resultados mais eficazes, uma vez que a motilidade das larvas de *R. (B.) microplus* já estavam reduzidas após 24 horas de exposição através do Teste de Pacote Larval (TPL), principalmente com as soluções de OE/OS a 5% nas temperaturas de -20°C e -4°C.

Para melhor entendimento da ação das formulações testadas no presente trabalho, são necessários mais estudos acerca dos compostos presentes em cada óleo essencial, bem como investigações sobre as alterações observadas no odor, visto que essa característica pode levar a perda do composto com atividade acaricida e as modificações do pH (Nicaretta, 2023). Desta maneira, o pH desempenha um papel crítico não apenas na eficácia dos produtos pesticidas, mas em todas as etapas de processamento na indústria de alimentos e cosméticos (Yousef *et al.* 2019; Kkadan *et al.*, 2020; Lukiř *et al.*, 2021).

Uma solução seria o processo de nanoencapsulação dos OEs que protege os compostos ativos (como terpenos e fenóis) de manipulação, prolongando sua estabilidade e eficácia acaricida. A encapsulação em nanopartículas permite uma liberação gradual dos compostos ativos, aumentando a duração do efeito acaricida (Chaudhari *et al.*, 2020). Isso é especialmente importante no controle de carrapatos, pois permite uma ação contínua, não havendo a necessidade de reaplicações frequentes.

Desta forma, futuros estudos poderão explorar novas estratégias de formulações contendo óleos essenciais sem aditivos sintéticos para melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e liberação prolongada de compostos bioativos. Além disso, será fundamental investigar a eficácia *in vivo* dessas formulações em diferentes espécies de carrapatos e ambientes, assim como avaliar o impacto ambiental e a segurança dessas soluções em sistemas de produção animal.

5. CONCLUSÃO

Portanto, é possível observar um grande potencial acaricida presente no OEs, principalmente de *E. globulubus* que obteve um eficácia de 97,4% de mortalidade no estágio larval do *R. (B.) microplus* no temperatura de -20° C. No entanto, novos estudos precisam ser realizados buscando soluções como o nanoencapsulação dos OEs com intuito de proteção dos compostos ativos (como terpenos e fenóis), assim prolongando sua estabilidade e eficácia acaricida das formulações sem aditivos sintéticos, uma vez que estes podem causar efeito colaterais, visando novos produtos de origem vegetal para o controle sustentável do carrapato bovino.

6. REFERÊNCIAS

Allen Jr, L.V.; Popovich, N.G.; Ansel, H.C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

Alves, N. V.; Castro, I. P. M.; Gellen, L. F. A.; Panontin, J. F.. Potencial farmacológico dos óleos essenciais: uma atualização. Práticas Integrativas e Complementares: visão holística e multidisciplinar - Volume 2, 2022

Anand Kumar Chaudhari, Vipin Kumar Singh, Somenath Das, Deepika, Jitendra Prasad, Abhishek Kumar Dwivedy, Nawal Kishore Dubey. Improvement of *in vitro* and *in situ* antifungal, AFB1 inhibitory and antioxidant activity of *Origanum majorana* L. essential oil through nanoemulsion and recommending as novel food preservative, Food and Chemical Toxicology, 143,2020, 111536. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111536>>

Araújo, L.X.; Novato, T.P.L.; Zeringóta, V.; Matos, R.S.; Senra, T.O.S.; Maturano, R.; Prata, M.C.A.; Daemon, E.; Monteiro, C.M.O. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. Parasitology Research, v. 114, n. 9, p. 3271-3276, 2015.

Benelli, G., Pavela, R., Canale, A. *et al.* Repelentes de carrapatos e acaricidas de origem botânica: um roteiro verde para controlar doenças transmitidas por carrapatos?. *Parasitol Res* **115** , 2545–2560 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5095-1>

Berny, P.; Caloni, F.; Croubels, S.; Sachana, M.; Vandenbrouke, V.; Davanzo, F.; Guitart, R. Animal poisoning in Europe. Part 2: companion animals. *The Veterinary Journal*, v. 183, n. 3, p. 255-259, 2010.

Brasil. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1 ed, 52 p., ANVISA. Brasília, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Formulário nacional da farmacopeia brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. , 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012. Disponível em:< <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-nacional/arquivos/8065json-file-1>

Brasil. Portaria nº48, de 12 de maio de 1997. MAPA. Brasília, 1997. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=72818869>>

Cardoso, A.S., Santos, E.G.G., Lima, A.D.S., Temeyer, K.B., Pérez, De León, A.A., Costa, L.M.J. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. *Vet Parasitol*, 2020. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109090>>.

Carneiro, J. C.; Costa, E. G. L.; Vasconcelos, V. O.; Oliveira, N. J. F.; Duarte, E. R. Diagnóstico do controle e eficácia de acaricidas para o carrapato bovino no Semiárido do Norte de Minas Gerais. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2015.

Corta, E.; Bakkali, A.; Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F. Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS. *Talanta* 48:189–199, 1999. Disponível: <[https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(98\)00237-9](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(98)00237-9)>

Das, S.; Prakash, B. Effect of Environmental Factors on Essential Oil Biosynthesis, Chemical Stability, and Yields. In: Prakash, B., Dubey, N.K., Freitas Brilhante de São José, J. (eds) *Plant Essential Oils*. Springer, Singapore, 2024. Disponível em:<https://doi.org/10.1007/978-981-99-4370-8_10>

Delmonte, Camila de Carvalho. Avaliação Da Atividade Carrapaticida Do Timol Incorporado a Duas Formulações De Uso Tópico Sobre Estágios Imaturos De *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/5467/1/camiladecarvalhodelmonte.pdf>

Eiden, A.L.; Kaufman, P.E.; Allan, S.A.; Miller, R.J. Detection of permethrin resistance and fipronil tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *Journal of Medical Entomology*, v. 52, n. 3, p. 429- 436, 2015.

Farias, N.A.; Ruas, J.L.; Santos, T.R.B. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. *Cienc Rural* 38: 1700-1704, 2008.

Fernandes, F. F.; D'alessandro, W. B.; Freitas, E. P. Toxicity of extract of *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) substâncias extraídas das plantas Timbó-do-cerrado e Pau-d'óleo sobre larvas do Carrapato-do-boi. In: SANTOS, M. E. M. (Org.). *Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas: trabalhando ensino, pesquisa e extensão*. São Luís, MA: Editora UEMA. p. 147-156, 2008. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/328342104>>

Fishel, F. M.; Ferrell, J.A. Water pH and the effectiveness of pesticides. IFAS Extension. University of Florida. PI-156, pp 1–3, 2019

Furlong, J. Martins; J. R.; Prata, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?. *A Hora Veterinária – Ano 27, nº 159, 2007*. Disponível em:< <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/595316/1/O-carrapato-dos-bovino-e-a-resistencia.pdf>>

George, J.E.; Pound, J.M.; Davey, R.B. *Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides*. Parasitol, 2004. Disponível em: <doi: 10.1017/S0031182003004682>.

Kkadan, S.K.; Duran, A.; Wijaya, R.; Sinulingga, N.G.H.; Tavares, W.S.; Tarigan, M.; Wong, C.Y.; Sharma, M. Impact of water quality on insecticide efficacy. Special feature: pest of crop & amenity trees, 2020. Disponível: <https://www.researchgate.net/publication/348992582_Impact_of_water_quality_on_insecticide_efcacy>

Kuzey, Camila de Abreu. Óleos Essenciais: Aspectos Gerais E Potencialidades. Instituto Federal Farroupilha – Campus Santo Ângelo. Disponível em: <<https://arandu.iffarroupilha.edu.br/bitstream/itemid/157/1/CAMILA%20TCC%207.pdf>>

Lee, S.J., Mulay, P., Diebolt-Brown, B., Lackovic, M.J., Mehler, L.N., Beckman, J., Waltz, J.; Prado, J.B.; Mitchell, I.A.; Higgins, S.A.; Schwartz, A.; Calvert, G.M. Acute illnesses associated with exposure to fipronil—surveillance data from 11 states in the United States, 2001–2007. *Clinical Toxicology*, v. 48, n. 7, p. 737-744, 2010.

Leite, R. C. Efficacy of doramectin against natural infestations of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 53-56, 1995. Disponível em: <http://cbpv.com.br/rbpv/documentos/411995/c4153_56.pdf>.

Lukić, M.; Pantelić I; Savić, S.D. Towards optimal pH of the skin and topical formulations: from the current state of the art to tailored products. *Cosmetic*, 2021. Disponível: <<https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069>>.

Miller, R.J.; George, J.E.; Guerrero, F.; Carpenter, L.; Welch, J.B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille)(Acari: Ixodidae) collected from the Corozal army veterinary quarantine center, Panama. *Journal of Medical Entomology*, v. 38, n. 2, p. 298-302, 2001.

Monteiro, I.N.; Monteiro, O.D.S.; Costa-Junior, L.M.; Da Silva, A.L.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S.; Mouchrek-Filho, V.E. Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.*, Apr 30;238:54-57, 2017. Disponível em: < 10.1016/j.vetpar.2017.03.016>.

Nicaretta, J.E., Ferreira, L.L., de Cavalcante, A.S.; Zapa, D. M. B.; Heller, L. M. H.; Trindade, A. S. N.; Morais, I. M. L.; Salvador, V. F.; Leal, L. L. L.L.; Silva, F. L. V.; Aquino, L. M.; Couto, L. F. M.; Soares, V. E.; Monteiro, C. M. O.; Lopes, W. D. Z. Influence of the acaricide emulsion pH on the effectiveness of spray products to control the cattle tick: laboratory and field investigations. *Parasitol Res* 122, 2267–2278, 2023. Disponível em:< <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07927-y>>

Novato, T.P.L.; Araújo, L.X.; Monteiro, C.M.O.; Maturano, R.; Senra, T.D.O.S.; Matos, R.D.S.; Gomes, G.A.; 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*, 2015.

Ribeiro, S. M.; Bonilla, O. H.; Lucena, E. M. P. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton spp.* da Caatinga. *Iheringia, Série Botânica*, 73 (1), 31-38 , 2018. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.21826/2446-8231201873104>>.

Santos, E.G.G., Bezerra, W.A.S., Temeyer, K.B., Leó, A.A.P., Costa-Junior, L.M., Soares, A.M.S. Effects of essential oils on native and recombinant acetylcholinesterases of *Rhipicephalus microplus*. *Braz J Vet Parasitol*, 2021. Disponível em:< <https://doi.org/10.1590/ S1984-29612021024>>.

Santos, I. C.; Schlesner, S. K.; De Moraes, D. P.; Ferreira, D. F. ; Voss, M.; Giacomelli, S. R.; Barin, J. S. Barin. Smartphone-based rapid and low-cost method for the determination of eugenol content of clove essential oil. *Cienc. Rural* 53 (10), 2023. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220498>>

Stone, B. F.; Haydock, K. P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.), *Bulletin of Entomological Research*, 53(3), p. 563, 1962. Disponível em: < doi: 10.1017/S000748530004832X >.

Taylor, M.A. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J* 161: 253- 268, 2001.

Vangchhia, L., *et al.* Assessment of synergism in combinations of essential oils against cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* **93**, 473–484 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10493-024-00937-0>

Valente, P.P. Estudo da eficácia in vitro e in vivo de bioterápicos e produtos naturais no controle de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) e sua relação com o bem-estar animal. Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG) - Belo Horizonte - 2014

Whitford, F.; Penner, D.; Johnson, B., Bledsoe, L.; Wagoner, N.; Garr, J.; Wise, K.; Oberneyer, J.; Blessing, A.. The impact of water quality on pesticide performance. Purdue University Extension, 2016. Disponível em: <<https://www.extension.purdue.edu/extmedia/ppp/ppp-86.pdf>>

Yousef, H.; Su, H.M.; Imani, S.M.; Alkhaldi, K.; Filipe, C.D.; Didar, T.F. Intelligent food packaging: a review of smart sensing technologies for monitoring food quality. *ACS Sens* 4:808–821, 2019. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00440>

Zaldivar, M. F.; Bastianetto, E.; Filho, A. A. P.; Rodrigues, D. S.; Júnior, V. S. M.; Morais-Costa, F.; Vasconcelos, V. O.; Duarte, E. R.; Araujo, R. N. Acaricide effect of plants from the Brazilian savanna on a population of *Rhipicephalus microplus* with phenotypic resistance to cypermethrin and trichlorfon, *Veterinary Parasitology*, Volume 331, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110281> >.

CONCLUSÃO GERAL

Portanto, este estudo permitiu observar a existência de diversos componentes provenientes do metabolismo secundário presente nos OEs estudados com eficácia na atividade acaricida. Através da utilização dos óleos essenciais se espera uma bioatividade que possa retardar o desenvolvimento de resistência devido à presença de várias moléculas ativas com diferentes modos de ação e afetando vários alvos ao mesmo tempo, o que reduziria a pressão seletiva através de estudos da botânica aplicada à parasitologia. Além disso, buscar o desenvolvimento formulações visando novos produtos com origem vegetal podem apresentar uma alternativa sustentável ao controle do *R. (B.) microplus* em diferentes estágios devido a eficácia observada, principalmente no controle de estágio larval.

ANEXO

Instructions for Authors

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

Types of articles

The Brazilian Journal of Pharmacognosy accepts for publication original scientific work, reviews and communication articles written only in English.

- Original papers: Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Graphical abstract, Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Authors’ contributions, Acknowledgements, References, Figures with Legends, Tables, Structural Formulae and Supplemental files (if applicable). Results and Discussion sections may appear as a combined ‘Results and Discussion’ section. The normal length of the main text of an Original Paper (excluding references, tables, figures and figure legends) is approximately 3,000 words. Longer manuscripts may be accepted only in exceptional and well justified cases.

- Short communications: This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical sources, or complementary results of on-going work. The text should be arranged as follows: Graphical abstract, Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, Authorship, References (up to 20 citations) and Figures and/or Tables (up to 3). The text should not exceed 2,000 words.

- Reviews: Authors are invited to submit a review article that provides concise and critical updates on a subject, and with around 100 references. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in the field. Review articles should be designed to give an interesting insight into a hot topic in Pharmacognosy, focusing on the key developments that have shaped a field rather than giving a very comprehensive overview of a very specific topic. They should be concise and include details of the search strategy used, such as time frame, search terms, used databases. A review should be an article that produces knowledge and not just a survey of the existing literature. The review must be a response to an initial question. Reviews of a particular herbal drug will be considered if they contain the newest issue and a perspective on future directions.

Authors are strongly recommended to prepare a manuscript using a A4-sized paper, double-spaced, with Times New Roman size-12 font, fully justified, with margins of 2 cm.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure the following:

- One author has been designated as the corresponding author with contact details: Institutional e-mail address; full postal address;
- [ORCID ID](#) for all authors;
- Authors' contributions;
- All authors, with their respective email addresses, should be entered into the system.
- All necessary files have been uploaded: Graphical abstract, Manuscript; Include keywords; All figures with Legends; All tables (including titles, description, footnotes); and Supplemental files (if applicable).
- All figure and table citations in the text match the files provided;
- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked';
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa;
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet);
- Relevant declarations of interest have been made;
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed.

Additional information

- All plant, microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological material and the location of the voucher specimen.
- Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights.
- The journal will not accept responsibility for research works that do not comply with the legislation of the country of residence of the author.
- We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, in vitro assays or in vivo tests using animals.
- The Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy strongly encourages the submission of original works in which the experimental procedures were conducted taking into consideration green chemistry principles, such as by employing green solvents and environmental resource saving experimental designs in any step of the investigation.
- Evaluations using animal models to provide evidences for the pharmacological efficacy of plants do not fall into the areas of interest of the journal when polyphenol-rich plant extracts are involved and, therefore, making the results predictable.
- For the pharmacological studies to explore the therapeutic roles of polyphenols, such as antioxidant activity, antibacterial, antiviral, hepatoprotective, anti-inflammatory, antipyretic, anti-obesity, cardioprotective, neuroprotective, anti-hypertension, free radicals scavenger, and central nervous system stimulators, the journal will give preference to articles that make use of molecular tools over animal models for the characterization of the mechanism(s) of action of isolated pure compounds.
- For the pharmacobotanical studies, the use of DNA barcodes combined with chemical profile analysis (TLC and HPLC) would be the required approach to solve the problems of quality control of medicinal plants.
- The use of HPLC or UHPLC coupled to hybrid state-of-the-art mass spectrometers are becoming a key tool for the rapid and accurate analysis and dereplication of substances in complex plant matrices to rapidly estimate their pharmacological potential, making unnecessary the use of in vivo models to validate it where polyphenols are the major constituents.
- The Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy explicitly encourages the submission of chemically characterized extracts by GC (volatile oils), HPLC and/or NMR.
- It is a mandatory requirement for authors to include copies of NMR spectra for all new compounds and tested bioactive compounds from a natural source in the Supporting Information.
- For works describing the structural elucidation of novel natural products, it is mandatory to include evidences for the absolute configuration.

The following immediate rejection criteria apply

- i. the manuscript does not fall into the areas of interest of the journal;
- ii. manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal, e.g., papers requiring English proof-reading can be refused without further editorial inspection.
- iii. the manuscript results are preliminary, e.g., chemical analysis using different reagents for the identification of classes and types of secondary metabolites; pharmacobotanical studies without the use of DNA barcodes combined with chemical profile analysis;
- iv. results not presenting chemically characterized extracts;
- v. experimental work based on preliminary biological and pharmacological analysis for extracts without the identification of the active constituent(s) or dereplication of major constituents by GC (volatile compounds), HPLC or NMR.
- vi. manuscripts reporting activity data without comparison with a reference, without a positive control/appropriate control or not based on adequate statistics;
- vii. the biological source (e.g. plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated and documented;
- viii. experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds; phenolic compounds are widely spread in nature and fully recognized as antioxidants or scavengers;
- ix. experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ($\mu\text{g/ml}$) for antimicrobial activity ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$ for plant extracts and $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ for pure compounds) and without appropriate identification of culture collections/strain designation codes;
- x. experimental work on volatile oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without appropriate statistical analyses; without oil yield (%) and characterization and component quantification not undertaken using GC-MS-FID. Analyses of the retention indices of the components not calculated using n-alkane homologous series together with analyses of some of the isolated natural components. Biological activity of essential oil without chemical characterization;
- xi. too preliminary data using in vitro or in vivo assays will not be acceptable if (i) no information on the type of activity is given; (ii) single dose or very high concentrations (must show dose–response studies); (iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); (iv) lack of appropriate controls (solvents; positive or negative substances according to the study); (v) no IC₅₀ values (if applicable); (vi) predictable bioactivity is described (e.g., therapeutic roles of polyphenols);
- xii. pharmacological efficacy of plants in animal models when the results involved polyphenol-rich plant extracts;
- xiii. use of only the brine shrimp assay (*Artemia salina*) to access the toxicity of extracts;
- xiv. isolation and bioassay of well-known compounds with small or no relationship to the activity, or to the medicinal use of the plant without clear justification;
- xv. manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts or phytopharmaceuticals without chemical and technical standardization. Standardization of the plant extracts is considered to be the complete description of manufacturing parameters such as granulometry, solvent-plant ratio, time of extraction, solvent composition etc., together with marker quantification and chromatographic fingerprint analyses by HPLC.
- xvi. structural elucidation of novel natural products without complete spectroscopic and spectrometric analyses (NMR and HRMS) and evidences for the absolute configuration.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise and simple pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. This graphical abstract should capture the reader's attention and, in conjunction with the manuscript title, should give the reader a quick visual impression of the essence of the manuscript without providing specific results. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 x times; 1328 pixels (h & w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. *BJP does not accept Graphical abstract using images of animals.*

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit [ORCID](#) of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as [ChatGPT](#), do not currently satisfy our [authorship criteria](#). Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript. The use of an LLM (or other AI-tool) for "AI assisted copy editing" purposes does not need to be declared. In this context, we define the term "AI assisted copy editing" as AI-assisted improvements to human-generated texts for readability and style, and to ensure that the texts are free of errors in grammar, spelling, punctuation and tone. These AI-assisted improvements may include wording and formatting changes to the texts, but do not include generative editorial work and autonomous content creation. In all cases, there must be human accountability for the final version of the text and agreement from the authors that the edits reflect their original work.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration, followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.

- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "https://doi.org/abc").

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- Book

- South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London
- Book chapter
- Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
- Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
- Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

Tables

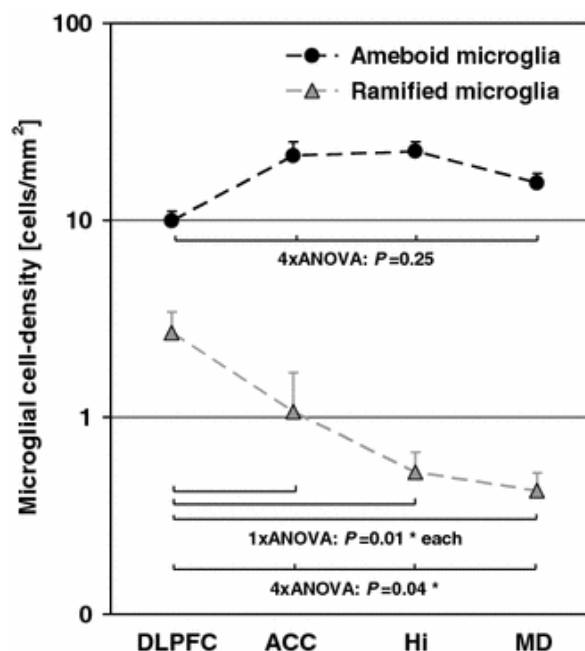
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

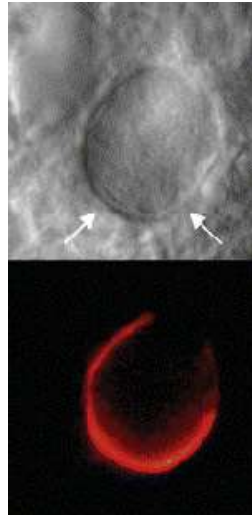
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



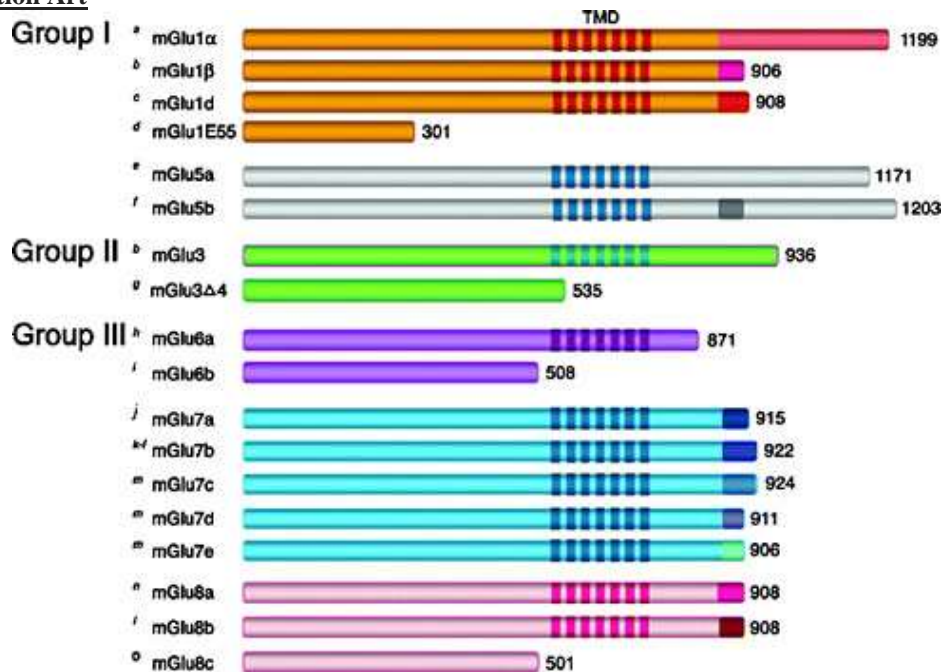
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

After Acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Shortly after this you will receive two e-mails. One contains a request to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article, as well as to arrange rights and payment of any associated publication cost. A second e-mail containing a link to your article's proofs will be sent once typesetting is completed.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Funding and Support pages

Copyright

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under a Creative Commons license. Details of the OA licences offered to authors can be found on the individual journal website, in the journal's **How to publish with us** guide.

Research Data Policy

This journal operates a [type 1 research data policy](#). The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are data repositories that can assist with this and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our Author Support portal for additional guidance.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Competing Interests

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Editorial Board Members and Editors are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list we recommend they declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under ‘summary of requirements’ (see below) funding information should be included in the ‘**Declarations**’ section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on a **title page that is separate from the manuscript** with a section entitled “**Declarations**” when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data, Materials and/or Code availability and Authors’ contribution statements. **Please use the title page for providing the statements.**

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) competing interests and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].

- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company W and owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.
Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.
- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.
Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.
- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.
Non-financial interests: none.
- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.
Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Research involving human participants, their data or biological material:

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the [1964 Declaration of Helsinki](#) and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the

law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on **Informed Consent**.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1^{tm1a(KOMP)Wtsi}* **RRID:MMRRC_055641-UCD**

Cell Line: RST307 cell line **RRID:CVCL_C321**

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, **RRID:AB_2722109**

Plasmid: mRuby3 plasmid **RRID:Addgene_104005**

Software: ImageJ Version 1.2.4 **RRID:SCR_003070**

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found [here](#). (Download docx, 36 kB)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Consent to participate' and/or 'Consent to publish'. Other declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Sample statements for "**Consent to participate**":

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

Sample statements for "**Consent to publish**":

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at al, PNAS February 27, 2018](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not accepted after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their [ORCID](#) ID when submitting an article for consideration or acquire an [ORCID](#) ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Editorial procedure

Single-blind peer review

This journal follows a single-blind reviewing procedure.

This journal also publishes special/guest-edited issues. The peer review process for these articles is the same as the peer review process of the journal in general.

Additionally, if a guest editor authors an article in their issue/collection, they will not handle the peer review process.