



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BALSAS - CESBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE - PPGAA

JOELSON GOMES DE OLIVEIRA

Atividade acaricida, repelente e anti-helmíntica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth "Quimiotipo Cânfora" sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haemonchus contortus* e *Caenorhabditis elegans*.

BALSAS-MA
2022

JOELSON GOMES DE OLIVEIRA

Atividade acaricida, repelente e anti-helmíntica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth "Quimiotipo Cânfora" sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haemonchus contortus* e *Caenorhabditis elegans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente - PPGAA/ CESBA/ UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Pereira de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior

Oliveira, Joelson Gomes de.

Atividade acaricida, repelente e anti-helmíntica do óleo essencial de *Lippia organoides* Kunth “Quimiotipo Cânfora” sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haemonchus contortus* e *Caenorhabditis elegans* / Joelson Gomes de Oliveira. – Balsas, MA, 2022.

43f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, Centro de Estudos Superiores de Balsas, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Pereira de Sousa.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior.

1. Óleo essencial. 2. *Lippia organoides*. 3. Carrapatos. 4. Helmintos. 5. Cânfora. I. Título.

CDU: 665.52/.54:[595.42:616.995.1]

JOELSON GOMES DE OLIVEIRA

Atividade acaricida, repelente e anti-helmíntica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth "Quimiotipo Cânfora" sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haemonchus contortus* e *Caenorhabditis elegans*.

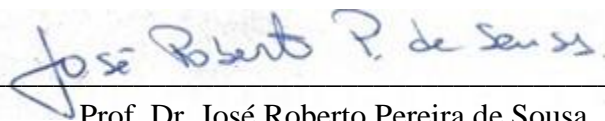
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente - PPGAA/CESBA/ UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Pereira de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior

Aprovada em 10 / 03 / 2022


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Roberto Pereira de Sousa
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA
(Orientador)



Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB



Profa. Dra. Queli Cristina Fidelis
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dedico este trabalho a minha esposa Tássila e meu filho John Magnus por serem minha fonte de inspiração e motivação e a todos que contribuíram direta ou indiretamente com minha caminhada.

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida”.

Sócrates

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem nesses momentos difíceis que estamos enfrentando.

A minha esposa Tássila Falcão Santos Gomes, pelo apoio e incentivo em todas as etapas desse trabalho, além do suporte emocional para dar continuidade a pesquisa.

Aos meus pais, Joel Santana de Oliveira e Alzirene Gomes de Oliveira, pela educação, apoio e incentivo para que continuasse seguindo nos estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Pereira de Sousa (UEMA), pela confiança, orientação e paciência na execução deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior (UEMASUL) pela coorientação, auxílio na execução deste trabalho (identificação da composição química do óleo essencial) e também na busca pela parceria firmada com a UFMA.

Ao Prof. Dr. José Fábio França Orlanda (UEMASUL), pelo apoio e espaço para execução deste trabalho no Laboratório de Biotecnologia Ambiental – LABITEC da UEMASUL.

Ao Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior (UFMA) pelo apoio e espaço para execução deste trabalho no Centro de Pesquisa do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Maranhão – São Luís e aos seus Bolsistas de Doutorado, Caio Pavão Tavares, Dauana Mesquita Sousa, Tássia Lopes do Vale, Geovane Ferreira Silva e Jhone Robson da Silva Costa pelos ensinamentos e auxílio na execução dos testes.

A Márcia Aldeany Almeida de Sousa pela contribuição essencial na coleta do Alecrim e ao Gabriel Sousa Brito pelo ensino da técnica de extração.

A Universidade Estadual do Maranhão – UEMA e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA, pelo incentivo e suporte para realização desse trabalho.

A Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão - UEMASUL, pelo acolhimento e disponibilidade da infraestrutura para realização desse trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, pela bolsa concedida.

Aos amigos e colegas da turma de mestrado de 2019.1 e todos que não foram citados, mas que contribuíram direta ou indireta na elaboração e finalização deste trabalho.

RESUMO

Um dos maiores desafios para os pecuaristas da atualidade está associada a busca de produtos eficazes no controle de parasitos em rebanhos de bovinos, caprinos e ovinos. Porém, o uso constante e indiscriminado de produtos químicos tem levado à seleção de mutações e ao desenvolvimento de resistência em parte das populações de ectoparasitos e endoparasitos, como também influenciam na qualidade dos produtos derivados dos animais. Nesse sentido, a busca de novas tecnologias encontradas em produtos naturais vem crescendo bastante nas últimas décadas. Desta forma o presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* "Quimiotipo Cânfora" em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e em Helmintos das espécies *Haemonchus contortus* e *Caenorhabditis elegans*. Para isso, folhas de Alecrim-pimenta (*L. origanoides*) foram obtidas de plantas adultas de ocorrência natural no município de Montes Altos, Maranhão, Brasil. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas de *L. origanoides* por meio de hidrodestilação e a análise dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e por detector de ionização de chama (DIC). A análise química demonstrou um óleo essencial rico em monoterpenos, principalmente oxigenados, sendo os principais compostos cânfora (32,13%), β -bisaboleno (10,02%) e canfeno (6,66%). Para a avaliação da atividade carrapaticida sobre *R. (B.) microplus* foi realizado o Teste de Pacote de Larvas utilizando concentrações do óleo essencial de *L. origanoides* variando de 10 a 0,40 mg/mL em solução de 1% etanol + 0,02% Triton, onde obteve-se Concentração Letal 50% (CL₅₀) de 7,48 mg/mL. Para a avaliação da atividade repelente sobre *R. (B.) microplus* foi realizado o Teste de Repelência em concentrações que variaram de 1,25 a 0,001 mg/mL e para o controle positivo foi utilizado N,N-Dietil-m-toluamida (DEET) em diferentes tempos, obtendo-se para *L. origanoides* Concentração de Repelência 50% (RC₅₀) de 0,058 mg/cm² (10min), 0,101 mg/cm² (20min) e 0,310 mg/cm² (30min). Para a espécie *H. contortus* foi realizado o Teste de Eclodibilidade de Ovos onde ovos de *H. contortus* foram contados e distribuídos em placas de 96 poços, na proporção de 100 ovos por poço. Foram utilizadas concentrações do óleo essencial variando de 10 a 0,005 mg/mL em Tween 3%, obtendo-se CL₅₀ de 0,67 mg/mL. Para a espécie *C. elegans* foi realizado o teste de mortalidade de adultos, onde concentrações do óleo essencial variando de 10 a 0,005 mg/mL foram inseridas em placas de 96 poços contendo 100 μ L de M9 (KH₂PO₄ 0,01 M, Na₂HPO₄ 0,02 M, NaCl 0,04 M, MgSO₄ 1 M), obtendo-se uma CL₅₀ de 2,23 mg/mL. Os resultados obtidos através dos testes foram satisfatórios mostrando a atividade acaricida, repelente e nematocida do óleo essencial de *L. origanoides* e sua eficácia contra *R. (B.) microplus*, *H. contortus* e *C. elegans*.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Lippia origanoides*; Carrapatos, Helmintos, Cânfora.

ABSTRACT

One of the biggest challenges for ranchers today is associated with the search for effective products to control parasites in herds of cattle, goats and sheep. However, the constant and indiscriminate use of chemicals has led to the selection of mutations and the development of resistance in part of the populations of ectoparasites and endoparasites, as well as influencing the quality of products derived from animals. In this sense, the search for new technologies found in natural products has grown significantly in recent decades. Thus, the present study aimed to evaluate the *in vitro* activity of the essential oil of *Lippia origanoides* "Camphora Chemotype" in ticks of the species *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and in Helminths of the species *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. For this, leaves of Rosemary-pimenta (*L. origanoides*) were obtained from naturally occurring adult plants in the municipality of Montes Altos, Maranhão, Brazil. The essential oil was extracted from fresh leaves of *L. origanoides* by means of hydrodistillation and the analysis of chemical constituents was performed by gas chromatography coupled with mass spectroscopy (GC-MS) and by flame ionization detector (DIC). Chemical analysis of an essential oil rich in monoterpenes, mainly oxygenated, the main compounds being Camphor (32.13%), β -Bisabolene (10.02%) and Camphene (6.66%). To evaluate the acaricide activity on *R. (B.) microplus*, the Larvae Package Test was carried out using concentrations of *L. origanoides* essential oil ranging from 10 to 0.40 mg/mL in a solution of 1% ethanol + 0.02% Triton, which obtained a Lethal Concentration 50% (LC₅₀) of 7.48 mg/mL. For the evaluation of the repellent activity on *R. (B.) microplus*, the repellency test was carried out at concentrations ranging from 1.25 to 0.001 mg/mL and for the positive control, N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET) at different times, obtaining for *L. origanoides* 50% Repellent Concentration (RC₅₀) of 0.058 mg/cm² (10min), 0.101 mg/cm² (20min) and 0.310 mg/cm² (30min). For the species *H. contortus*, the Egg Hatchability Test was performed, where eggs of *H. contortus* were counted and distributed in 96-well plates, at the rate of 100 eggs per well. Essential oil concentrations ranging from 10 to 0.005 mg/mL in 3% Tween were used, obtaining LC₅₀ of 0.67 mg/mL. For the species *C. elegans*, the adult mortality test was performed, where essential oil concentrations ranging from 10 to 0.005 mg/mL were placed in 96-well plates containing 100 μ L of M9 (KH₂PO₄ 0.01 M, Na₂HPO₄ 0.02 M, 0.04 M NaCl, 1 M MgSO₄), giving an LC₅₀ of 2.23 mg/mL. The results obtained through the tests were satisfactory, showing the acaricidal, repellent and nematicide activity of the essential oil of *L. origanoides* and its effectiveness against *R. (B.) microplus*, *H. contortus* and *C. elegans*.

Key words: Essential oil, *Lippia origanoides*; Ticks, Helminths, Camphor.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - (A) Folhas e galhos de <i>L. origanoides</i> . (B) Arbusto adulto com aproximadamente 2 metros de altura. | 22 |
| Figura 2 - (A) Folhas, galhos e inflorescência; (B) Folhas lavadas e separadas; (C) Sistema Clevenger por técnica de hidrodestilação. | 23 |
| Figura 3 - (A) Fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B) microplus</i> ; (B) larvas de <i>R. (B) microplus</i> em tubos falcon | 25 |
| Figura 4 - (A) Imersão de larvas em solução (1% etanol + 0,02% Triton + Óleo essencial de <i>L. origanoides</i>); (B) Pacotes de papel de filtro (8,5 × 7,5 cm) dobrado e fechado com cliques contendo larvas de <i>R. (B) microplus</i> | 26 |
| Figura 5 - (A) Ilustração de papel filtro quantitativo (7x4) e suas áreas correspondentes; (B) Teste de repelência (Bioensaio de papel filtro vertical) suspenso por haste de madeira com larvas de <i>R. microplus</i> em área não-impregnada..... | 27 |
| Figura 6 - Óleo essencial de <i>L. origanoides</i> em frasco de vidro com capacidade para 5mL. . | 29 |
| Figura 7 - Ovos de <i>H. contortus</i> após 48 horas sem eclosão (azul) nas concentrações de 10 a 2,5 mg/mL de óleo essencial. | 34 |
| Figura 8 - Ovos de <i>H. contortus</i> após 48 horas sem eclosão (azul) e com presença de nematoides (vermelho) em concentrações de 1,2 a 0,62 mg/mL de óleo essencial. | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características físicas do óleo essencial de <i>L. organoides</i> | 29 |
| Tabela 2 - Composição química do óleo essencial das folhas de <i>L. organoides</i> | 30 |
| Tabela 3 - Atividade de repelência do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> e DEET (controle) sobre larvas de <i>R. (B.) microplus</i> | 33 |

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

DEET - N, N-Dietil-m-toluamida

CG - Cromatografia Gasosa

EM - Espectroscopia de Massas

DIC - Detector de Ionização de Chamas

CL₅₀ - Concentração Letal

EC₅₀ - Concentração Efetiva

RC₅₀ - Concentração de Repelência

IC95 - Intervalo de Confiança

R² - Coeficiente de determinação

B.O.D. - Biochemical Oxygen Demand

UR - Umidade Relativa

M9 - KH₂PO₄ 0,01 M, Na₂HPO₄ 0,02 M, NaCl 0,04 M, MgSO₄ 1 M

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo geral | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos | 17 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 Óleos essenciais | 18 |
| 3.2 <i>Lippia origanoides</i> | 19 |
| 3.3 Carrapato | 20 |
| 3.4 Nematóide..... | 21 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 4.1 Material vegetal | 22 |
| 4.2 Extração do óleo essencial..... | 23 |
| 4.3 Características físicas do óleo essencial | 23 |
| 4.4 Caracterização química do óleo essencial | 24 |
| 4.5 Carrapatos | 24 |
| 4.6 Teste de pacote de larvas | 25 |
| 4.7 Teste de repelência | 26 |
| 4.8 Obtenção de ovos de <i>H. contortus</i> | 27 |
| 4.9 Teste de eclodibilidade de ovos..... | 27 |
| 4.10 Manutenção das linhagens de <i>Caenorhabditis elegans</i> | 27 |
| 4.11 Isolamento de adultos de <i>C. elegans</i> | 28 |
| 4.12 Teste de mortalidade de adultos | 28 |
| 4.13 Análises estatísticas | 28 |
| 4.13.1 Análise estatística para os testes com pacote de larvas e repelência com <i>R. microplus</i> | 28 |
| 4.13.2 Análise estatística para os testes de inibição da eclodibilidade ovos de <i>H. contortus</i> e mortalidade de <i>C. elegans</i> | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 29 |
| 5.1 Características físicas e químicas | 29 |
| 5.2 Teste de pacote de larvas | 32 |
| 5.3 Repelência de larvas | 32 |
| 5.4 Inibição da eclodibilidade de ovos | 33 |
| 5.2 Mortalidade de <i>C. elegans</i> (Bristol N2)..... | 34 |
| CONCLUSÃO..... | 35 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a segunda posição no ranking de maiores produtores de rebanhos e carne bovina do mundo, segundo dados divulgado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o rebanho bovino brasileiro alcançou 264 milhões de cabeças e 9,75 milhões de toneladas de carne bovina em equivalente carcaça, ficando atrás da Índia com 306 milhões de cabeças e Estados Unidos com 12 de toneladas de carne bovina (FARMNEWS, 2022).

Atualmente o cenário agropecuário vem se tornando alvo de parasitos como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* também conhecido popularmente como carrapato-do-boi, que se destaca pelo notável impacto econômico em sistemas de produção pecuária, sendo responsável por causar mais de três bilhões de dólares de perdas anuais na cadeia produtiva de bovinos no Brasil (GRISI et al., 2014; GARCIA et al., 2019). Trata-se de um ectoparasito monoxeno que tem os bovinos como hospedeiro principal, mas também é encontrado parasitando outros animais como, ovinos, equinos e até mesmo cervídeos que compartilhem o mesmo ambiente de bovinos, onde animais de raças taurinas (*Bos taurus*) e seus cruzamentos são os mais afetados por essa espécie de carrapato (VERÍSSIMO et al., 1997; GARCIA et al., 2019).

O controle de *R. (B.) microplus* tem se tornado um desafio devido à seleção de populações de carrapatos resistentes a carrapaticidas químicos sintéticos. Embora carrapaticidas químicos sintéticos desempenhem um papel importante no controle de carrapatos *R. (B.) microplus* (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2014), o uso inadequado desses produtos químicos acelera a seleção multirresistência em populações de carrapatos (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2011, GUERRERO et al., 2012, LOVIS et al., 2013).

Os óleos essenciais e monoterpenos podem ser usados como carrapaticidas e/ou repelentes, pois surgem como uma alternativa aos compostos sintéticos (GARBOUI et al., 2007, SOARES et al., 2010). O uso de compostos repelentes tem se mostrado uma ótima alternativa, pois evita o contato do artrópode parasito com o hospedeiro e pode, assim, contribuir para o aumento da eficácia desses carrapaticidas (FIGUEIREDO et al., 2018; CASTRO et al., 2018). Possuem características como rápida degradação, baixa toxicidade e sustentabilidade que vem são vantagens dos compostos repelentes de artrópodes obtidos de plantas, e muito interesse tem sido gerado a esse respeito (BISSINGER e ROE, 2010, GOVINDARAJAN e SIVAKUMAR, 2011).

A caprinocultura e ovinocultura são atividades largamente exploradas no Brasil, visando a produção sustentada de carne, leite e peles. O Nordeste é a maior detentora da produção dos rebanhos, cerca de 94,5% e 68,5%, respectivamente para caprinos e ovinos mantendo a tendência de expansão dos rebanhos nesta região, compensando a redução observada em outras regiões produtoras, onde a competitividade (MAGALHÃES et al., 2020). Entretanto, a principal dificuldade na produção de pequenos ruminantes está associada às endoparasitoses gastrintestinais, provocados por agentes etiológicos das espécies pertencentes à família Trichostrongylidae (VIEIRA, 2006).

A espécie *Haemonchus contortus* faz parte de parasitos gastrintestinais mais abundantes de grande importância econômica no Brasil, sendo responsável pela morbidade e mortalidade de pequenos ruminantes causando grandes perdas na produtividade (AMARANTE, 2014; BESIÉ et al., 2016; ALMEIDA et al., 2018). A presença deste endoparasito hematófago no cenário pecuário acaba gerando doenças como a hemocose, é encontrado no abomaso, e os sintomas apresentados pelos animais é acompanhada por anemia severa, perda de peso, comprometimento da qualidade da carne, leite, pele e lã, e até mesmo a morte dos hospedeiros afetados. Isso causa aproximadamente 300 milhões de dólares em perdas econômicas para a indústria pecuária global anualmente (ROEBER et al., 2013; EMERY et al., 2016; EHSAN et al., 2020).

Medicamentos anti-helmínticos têm sido a principal escolha para o controle de parasitos. No entanto, o uso constante desses medicamentos levou a uma crescente resistência de parasitos contra todos os produtos químicos comerciais limitando as opções de controle do parasito na medicina veterinária e agricultura, sendo necessário buscar por novas alternativas eficientes (KAPLAN, 2004; KOTZE et al., 2014).

A espécie *Lippia origanoides* (família: Verbenaceae) é um arbusto aromático nativo da América Central e do norte da América do Sul, é frequentemente usado como tempero culinário ou remédio para doenças gastrointestinais (PASCUAL et al., 2001; VICUÑA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Há muitas pesquisas nas mais variadas áreas quando se trata do óleo essencial de *L. origanoides*, dentre as quais podem-se citar as atividades antioxidante (TELES et al., 2014ab; DAMASCENO et al., 2018), antiparasitária (SOARES et al., 2017), alelopática (ALVES et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2013; ALVES et al., 2014), antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2007; BALDIM et al., 2019), inseticida, larvicida e carrapaticida (CASTILHO et al., 2016; MAR et al., 2018; CASTRO et al., 2018). No gênero *Lippia*, os

compostos químicos que se encontram com mais frequência são o timol, carvacrol, 1,8-cineol, limoneno, p-cimeno, linalol, α -pineno, β -cariofileno, cânfora e canfeno (OLIVEIRA et al., 2007; STASHENKO et al., 2008; SOUSA et al., 2020)

Em razão da importância de *Rhipicephalus (B.) microplus* e *Haemonchus contortus* na economia mundial e nacional da pecuária e levando-se em conta os riscos decorrentes do uso de produtos químicos, notadamente aqueles associados à saúde do homem, à poluição e ao desenvolvimento de resistência às formulações sintéticas por parte dos carrapatos e parasitos, nesse sentido o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra *R. (B.) microplus*, *Haemonchus contortus* e *Caenorhabditis elegans*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade acaricida do óleo essencial de *Lippia origanoides* “Quimiotipo Cânfora” em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e anti-helmíntica em *Haemonchus contortus* e *Caenorhabditis elegans*.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides* por hidrodestilação;
- Avaliar as características físicas do óleo essencial;
- Identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Lippia origanoides* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliar atividade carrapaticida e repelente do óleo essencial de *Lippia origanoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*;
- Avaliar atividade ovicida do óleo essencial de *Lippia origanoides* em ovos de *Haemonchus contortus* e nematicida em adultos de *Caenorhabditis elegans*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de diversas partes de plantas, possuem composição química complexa e garantem aos vegetais vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos (OUSSALAH et al., 2007). Os óleos essenciais são biossintetizados e armazenados em estruturas vegetais especializadas (tricomas, ou citoplasma) de algumas células secretoras, e podem estar concentrados em órgãos específicos, como folhas, flores, ramos, rizomas, entre outros (BAKKALI et al., 2008; EL ASBAHANI et al., 2015). Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis, complexos e que exala forte odor, resultados do metabolismo secundário das plantas e são encontradas comumente em países dos trópicos e do mediterrâneo (BAKKALI et al., 2008).

Os metabólitos produzidos pelos vegetais são classificados em: metabólitos primários (carboidratos, aminoácidos e lipídeos) e os metabólitos secundários (compostos fenólicos, alcaloides e óleos essenciais) que são compostos sintetizados a partir dos metabólitos primários que são conhecidos por seu papel significativo nos mecanismos de defesa das plantas (SIMÕES et al., 2007; NAZZARO et al., 2013).

Os óleos essenciais são obtidos através de técnicas como hidrodestilação por micro-ondas, enfloragem, fluido supercrítico, prensagem e a mais citada na literatura estão a destilação arraste à vapor e hidrodestilação onde as moléculas terpênicas são imiscíveis em água, o que facilita a sua remoção por decantação (VITTI e BRITO, 2003; EL ASBAHANI et al., 2015). A hidrodestilação como método mais indicado na extração de óleo essencial devido a viabilidade econômica, tanto em escala industrial quanto em laboratório, utilizando para isso o aparelho de Clevenger, seguida da hidrodestilação por micro-ondas e o arraste por vapor d'água (VIANA et al., 2017). Os componentes químicos presentes em óleos essenciais apresentam uma grande variação de estruturas moleculares, onde o que apresenta maior quantidade em diferentes concentrações é chamado de composto majoritário, que representam cerca de 80% de uma composição de hidrocarbonetos terpênicos (LUPE, 2007; BAKKALI et al., 2008; EL ASBAHANI et al., 2015).

Pesquisas envolvendo óleos essenciais crescem cada vez mais devido a ampliação nas formas de controle de pragas e doenças, com técnicas que objetivam diminuir os impactos tanto ao meio ambiente como para o ser humano que as maneja, tornando-se um meio alternativo de controle de insetos, helmintos e carrapatos (BAGAVAN et al., 2009; CASTRO et al., 2018).

3.2 *Lippia origanoides*

L. origanoides é uma espécie popularmente conhecida como salva-de-Marajó, alecrim-d'Angola e alecrim-pimenta no Nordeste do Brasil e “orégano do monte” na Colômbia. Pertencente à família Verbenaceae é um arbusto aromático que pode atingir de 2 a 3 metros de altura, nativo da América do Sul e de alguns países da América Central. Possui um aspecto peculiar relacionado ao seu aroma e período de floração (OLIVEIRA et al., 2007; VICUÑA et al., 2010; MORÃO et al., 2016).

Estudos mais recentes relatam 28 sinônimos de *L. origanoides* com base no conceito filogenético de espécie, tais como: *L. affinis* Schauer, *L. glandulosa* Schauer, *L. graveolens* Kunth, *L. microphylla* Cham, *L. rígida* Schauer, *L. schomburgkiana* Schauer e *L. sidoides* Cham. (O'LEARY et al., 2012; SOUSA et al., 2020). Devido a essa diversidade, a espécie também pode ser conhecida vulgarmente como orégano México (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014), alecrim-bravo, alecrim-do-nordeste, estrepa-cavalo no nordeste do Brasil (LORENZI e MATOS, 2008; SANTOS et al., 2015; VIANA et al., 2017).

Os principais constituintes do óleo essencial de *Lippia origanoides* são o carvacrol e timol (ROJAS et al., 2006; STASHENKO et al., 2010; MAR et al., 2018), como também novas ocorrências de cânfora e canfeno (SOUSA et al., 2020). Alguns autores relatam que esta espécie possui propriedades antitumorais, anticancerígenas, quimiopreventivas, bactericidas e fungicidas (VICUÑA et al., 2010; STASHENKO et al., 2013; MORÃO et al., 2016), atividade antioxidante (TEIXEIRA et al., 2014), antimicrobiana contra vários grupos de patógenos (BORGES et al., 2012), bem como repelência significativa e baixa toxicidade (CABALLERO-GALLARDO et al., 2012).

A variação quimiotípica presente nos óleos essenciais de *L. origanoides* está associada a diversos fatores genéticos e ambientais como, por exemplo, em função da idade da planta, local, época do ano e horário de coleta, podendo ser encontrado elevados níveis de diversidade genética podendo ser comparada a outras espécies do mesmo gênero (STASHENKO et al., 2010; VEGA-VELA et al., 2013; TELES et al., 2014b; RIBEIRO et al., 2014).

3.3 Carrapato

Anualmente são divulgados novos registros de espécies de carrapatos ao redor do mundo, mais de 920 espécies foram registradas até o momento, e estão divididas em três famílias, onde destacam-se Ixodidae (carrapatos “duros”) e Argasidae (carrapatos “moles”) que são as mais importantes e abundantes enquanto que Nuttalliellidae apresenta somente uma espécie (GUGLIELMONE et al., 2010; NAVA et al., 2017). Os ixodídeos estão divididos em cinco gêneros: *Amblyomma*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor* (GARCIA et al., 2019).

No Brasil, a fauna de carrapatos é composta por aproximadamente 73 espécies pertencentes as famílias Ixodidae (47 espécies) e Argasidae (26 espécies). Os ixodídeos estão divididos em cinco gêneros: *Amblyomma* (com maior abundância), *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor* (KRAWCZAK et al., 2015; LABRUNA et al., 2016; WOLF et al., 2016; MICHEL et al., 2017). Os argasídeos apresentam quatro gêneros: *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis* e *Ornithodoros* sendo este último composto por um número maior de espécies (LUZ et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017).

Dentre os cinco gêneros de ixodídeos encontrados no país, os carrapatos do gênero *Amblyomma* e *Rhipicephalus* despertam um maior interesse na comunidade científica. A espécie *Amblyomma sculptum* tem uma importância na área de saúde pública e *Rhipicephalus* (B.) *microplus* no impacto econômico voltada a criação e manutenção de bovinos de corte ou leite (GARCIA et al., 2019).

Antigamente a espécie era denominado de *Boophilus microplus*, no entanto Murrell e Barker (2003) em seus estudos e análises filogenéticas, o reclassificaram no gênero *Rhipicephalus* onde passou a se denominar de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, onde o gênero *Boophilus* nesta espécie foi mantido como subgênero facilitando a recuperação de publicações em que aparece nome antigo (GARCIA et al., 2019).

O carrapato da espécie *Rhipicephalus* (B.) *microplus* que é conhecido popularmente como carrapato-do-boi, apresenta uma provável origem na Índia e na Ilha de Java, na Ásia (NUÑES et al., 1982). Sua distribuição geográfica no Brasil está intimamente relacionada expedições do início do século XVIII, devido as expedições que transportavam mercadorias e animais domésticos parasitados, causando a dispersão dos carrapatos no País. Vale ressaltar que existe diferenças de intensidade de infestações nas distintas regiões do Brasil, por conta das

variações e condições climáticas favoráveis que foram cruciais na adaptação do carrapato em todas as regiões (GONZALES, 1995).

Com relação a sua importância econômica, este carrapato proporciona grandes perdas na pecuária mundial. Grisi et al. (2014) listaram os gastos relacionados a parasitos relevantes que afetam diretamente o bem-estar do gado, a produtividade e seu impacto econômico no Brasil. Dentre as espécies listadas de maior impacto econômico, *R. (B.) microplus* apresenta-se com gastos de 3,2 bilhões de dólares/ano.

Altas infestações do carrapato-do-boi também geram preocupações, pois eventualmente causam lesões na pele do animal e predispõe a instalação de miíases, além de ser porta de entrada para infecções secundárias (bactérias oportunistas), essas lesões provocam perda de peso, redução na produção de leite e desvalorização comercial do couro dos animais. Outro fator importante a ser abordado são os elevados custos de produtos químicos e despesas para a realização do mesmo, onde o mal uso pode desencadear perdas na produção do leite devido a presença de resíduos e a contaminação ambiental (CASTRO et al., 2018; GARCIA et al., 2019).

3.4 Nematóide

Haemonchus contortus (Strongylida: Trichostrongylidae) é o nematóide gastrointestinal mais patogênico encontrado em fazendas comerciais de ovinos em regiões tropicais e subtropicais. Trata-se de um endoparasito hematófago que causa anemia e perda de peso. Cordeiros são particularmente suscetíveis a infecções por *H. contortus*, embora com o tempo eles desenvolvam imunidade em resposta ao desafio larval contínuo a que são expostos enquanto pastam (BENAVIDES et al., 2021).

O ciclo de vida de *H. contortus* inclui uma fase de vida livre que se inicia no ambiente através da liberação dos ovos através das fezes de ruminantes contaminados, em temperatura e umidade favorável, os ovos eclodem liberando larvas que se desenvolvem nas fases L1, L2 e L3 (fase infectante), uma fase dentro de um hospedeiro, que se inicia através da ingestão das larvas infectantes localizadas nas gramíneas contaminadas, dando prosseguimento ao seu desenvolvimento em L4, L5 e fase adulta. Os nematóides de vida adulta se alimentam de sangue do abomaso dos hospedeiros, causando anemia e complicações associadas. A morte pode ocorrer em animais fortemente infectados (GASSER et al., 2008; SILVA et al., 2019).

Devido muitos nematóides gastrointestinais hematófagos em fase adulta estarem em seus hospedeiros na região do abomaso, a realização de um experimento com *H. contortus* só

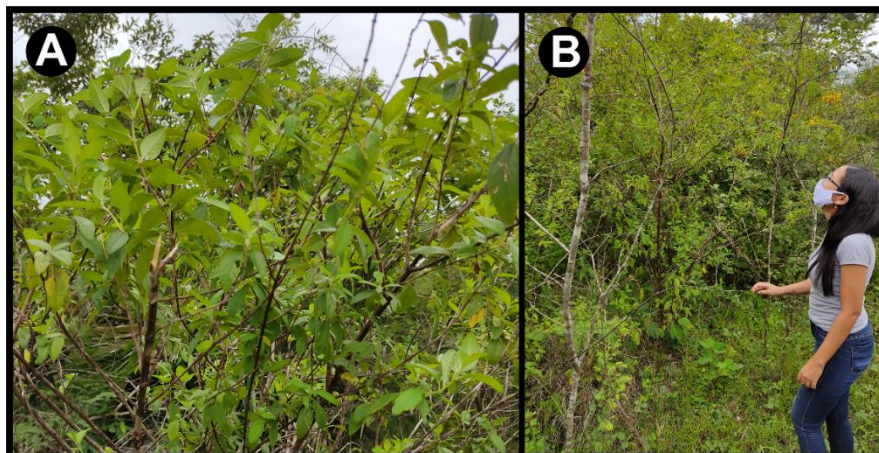
seria possível com o sacrifício do animal infectado. Contudo, o organismo modelo *Caenorhabditis elegans* é o organismo ideal para a realização de testes por apresentar uma estrutura morfofisiológica semelhante, vida livre, ciclo de vida rápido (L1, L2, L3, L4, jovem adulto e adulto), vida útil curta e um banco de dados genético bem estruturado. Além do efeito nematicida, o modo de ação dos anti-helmínticos pode ser observado *in vitro* por meio da locomoção, comportamento e reprodução do parasito (KATIKI et al., 2011; KATIKI et al., 2017). É bastante utilizado em estudos como triagem de drogas de alto rendimento em animais vivos como também na avaliação de propriedades antioxidantes e promotoras da longevidade como no estudo utilizando óleo essencial do Zimbro (*Juniperus communis* L.) onde foram observados os efeitos na extensão de vida e saúde de *C. elegans* (PANDEY et al., 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Folhas, galhos e inflorescência (Figura 1A, 2A) de *L. organoides* Kunth foram coletadas de plantas adultas (Figura 1B) de ocorrência natural no município de Montes Altos (5°50'0.63"S 47°16'9.60"W), Maranhão, Brasil. A coleta ocorreu das 8 às 10 horas da manhã no período de janeiro a março de 2021. Uma amostra de material biológico foi depositada no Herbário da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), com os números de registros 209, 210 e 211.

Figura 1 - (A) Folhas e galhos de *L. organoides*. (B) Arbusto adulto com aproximadamente 2 metros de altura.

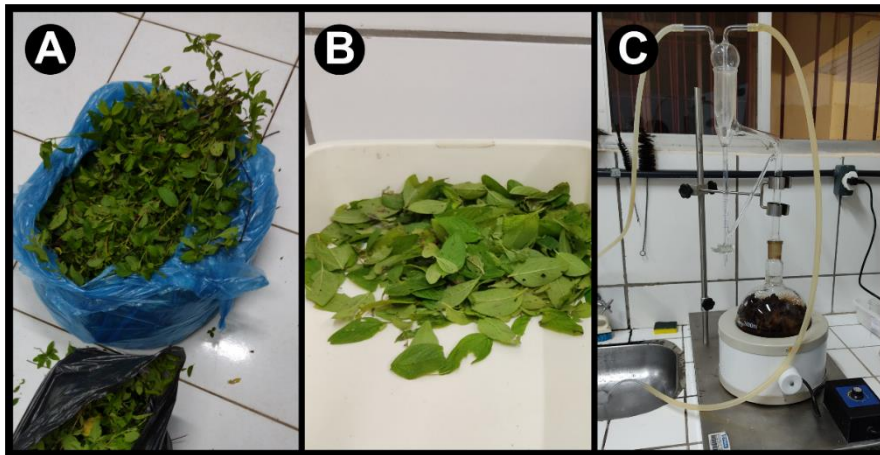


Fonte: Autor, 2021

4.2 Extração do óleo essencial

As folhas frescas foram lavadas inicialmente em água corrente, depois em água destilada, e posteriormente, foram cortadas para o processo de extração (Figura 2B). O óleo essencial foi extraído empregando o sistema Clevenger modificado (Figura 2C), por meio da técnica de hidrodestilação, por três horas à temperatura de 100 °C. Em cada extração foi utilizada uma massa de 100 g de amostras frescas para 1000 mL de água na proporção de 1:10. Ao final da extração o óleo foi armazenado em um frasco de vidro envolto por papel alumínio sob refrigeração para evitar perdas por volatilização (SOUSA et al., 2020).

Figura 2 - (A) Folhas, galhos e inflorescência; (B) Folhas lavadas e separadas; (C) Sistema Clevenger por técnica de hidrodestilação.



Fonte: Autor, 2021

4.3 Características físicas do óleo essencial

Na identificação das características físicas do óleo essencial foram avaliadas as variáveis: cor, aparência, odor e rendimento. A cor e aparência foram determinados visualmente. O odor foi determinado através do aroma sentido pela evaporação do óleo volátil.

O rendimento do óleo essencial foi determinado em % (m/m) que corresponde à relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume obtido no próprio sistema de extração, utilizando a equação: $R\% = V \times d \times 100 / m$, onde: R% = rendimento em porcentagem; V = volume de óleo em mL; D (densidade) = massa de um mL de óleo em g; M = massa de folhas secas em g.

4.4 Caracterização química do óleo essencial

A análise química foi realizada no Laboratório de Química dos Produtos Naturais da Universidade do Estado do Pará - UEPA. A análise qualitativa foi realizada por Cromatografia de fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) em sistema Shimadzu QP 2010 ultra com a injeção de 1 µL de solução 3:500 de óleo em hexano (Auto injetor AOC-20i), foi usado uma coluna capilar de sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno revestido com 5%-difenil/95%-dimetil-polisiloxano (0,25 µm de espessura do filme).

A temperatura do forno do CG foi programa de 60°C a 240°C (10 min) a 3°C/min, as temperaturas do injetor (split 1:20), linha de transferência e câmara de ionização foram de 250, 250 e 200°C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste a com fluxo de 1mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV com scans automáticos (varredura) na faixa de 35 a 400 daltons a 0,30 scans/s. A identificação dos componentes foi baseada no tempo e índice de retenção linear (série de n-alcanos C8-C40), na interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas Adams (2006), Nist 2011 e FFNSC 2.

4.5 Carrapatos

Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram coletados de bezerros infestados artificialmente (Figura 3A), no Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão – campus de São Luís, MA. As fêmeas ingurgitadas foram lavadas com água destilada, secas em papel filtro, colocadas em placas de Petri e mantidas em estufa B.O.D à temperatura de 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ até a completa oviposição. Os ovos foram coletados e armazenados em tubos Falcon (15 mL) vedados com algodão (Figura 3B) e novamente levados à estufa até a eclosão dos ovos. As larvas entre 14 a 21 dias foram usadas para os testes de pacote de larval e repelência.

Pesquisa aprovada pela Comissão de ética no uso de animais com os números de protocolo 23115.005443/2017-51.

Figura 3 - (A) Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*; (B) larvas de *R. (B.) microplus* em tubos falcon



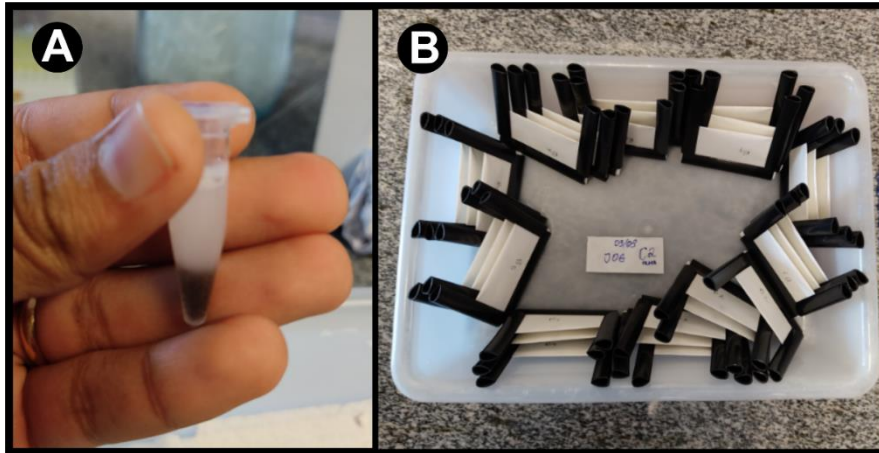
Fonte: Autor, 2021

4.6 Teste de pacote de larvas

A ação do óleo essencial sobre *R. (B.) microplus* foi avaliada utilizando o Teste de Pacote de Larvas de acordo com o bioensaio previamente descrito (KLAFKE et al., 2006). O óleo essencial foi diluído em solução de 1,0% de etanol e 0,02% de Triton X-100.

O grupo controle foi tratado com solução de etanol 1,0% de etanol e 0,02% de Triton X-100. O óleo essencial foi diluído nas concentrações de 10; 7; 4,90; 3,43; 2,40; 1,68; 1,17; 0,82; 0,57 e 0,40 mg/mL na mesma solução utilizada para o grupo controle. Aproximadamente 500 larvas foram imersas por 10 min com inversão constante a 25°C em cada solução teste e então foram transferidas para papel filtro para o processo de secagem. Em seguida, cerca de 100 larvas foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para um papel de filtro limpo e seco (8,5 × 7,5 cm) que foi dobrado e fechado com cliques. Os pacotes foram incubados a 27 ± 1°C com umidade relativa (UR) ≥ 80% por 24 h. Após a incubação, foi feita uma contagem de larvas vivas e mortas utilizando bomba a vácuo. Larvas sem movimentação ou com alterações morfológicas (encarquilhadas) foram registradas como mortas. O experimento foi realizado com três unidades experimentais ou réplicas para cada tratamento.

Figura 4 - (A) Imersão de larvas em solução (1% etanol + 0,02% Triton + Óleo essencial de *L. origanoides*); (B) Pacotes de papel de filtro (8,5 × 7,5 cm) dobrado e fechado com cliques contendo larvas de *R. (B) microplus*.



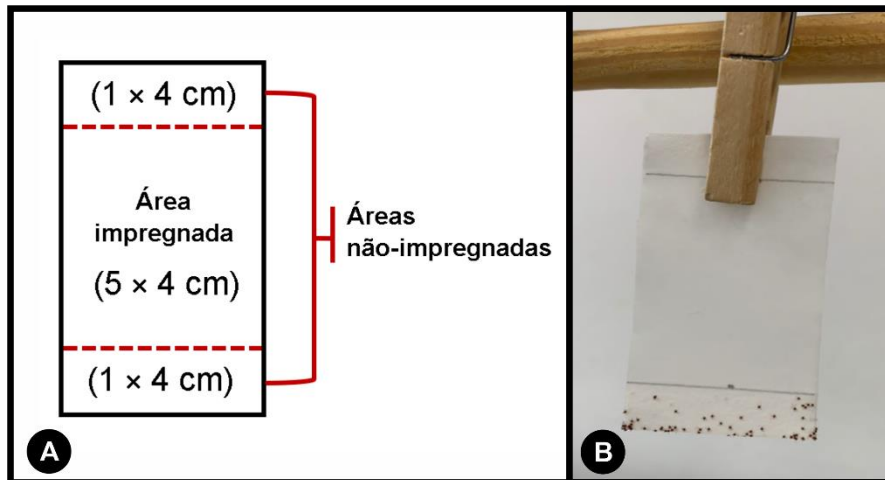
Fonte: Autor, 2021

4.7 Teste de repelência

O teste de repelência (bioensaio de papel de filtro vertical) foi realizado de acordo com Carroll et al. (2004) utilizando papel de filtro quantitativo (Marca: QM; 7 × 4 cm, Figura 5A), onde uma área central correspondente a 5 × 4 cm foi impregnada com 165µl em diferentes concentrações (1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; 0,001) do óleo essencial de *L. origanoides* e DEET foi utilizado como controle positivo. As áreas correspondentes 1 x 4 cm superior e inferior foram consideradas neutras (não tratadas).

Os papéis foram secos por 10 minutos a temperatura ambiente e suspensos verticalmente por uma das áreas não impregnadas em hastes de madeira (Figura 5B). Na área não impregnada da parte inferior foram colocadas aproximadamente 100 larvas. A localização das larvas em cada área do papel filtro foi anotada após 10, 20 e 30 minutos após tempo de secagem do papel. Como controle negativo foi utilizado água destilada e como controle positivo o DEET. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Figura 5 - (A) Ilustração de papel filtro quantitativo (7x4) e suas áreas correspondentes; (B) Teste de repelência (Bioensaio de papel filtro vertical) suspenso por haste de madeira com larvas de *R. microplus* em área não-impregnada.



Fonte: Autor, 2021

4.8 Obtenção de ovos de *H. contortus*

Para recuperação de ovos foram utilizadas fezes frescas coletadas de ovinos doadores, infectados artificialmente com linhagem monoespecífica de *H. contortus*. As fezes foram processadas em peneiras granulométricas (1mm, 105 μ m, 55 μ m e 25 μ m), e os ovos ressuspensos com solução salina saturada e em seguida, lavados com água destilada (COLES et al., 1992).

4.9 Teste de eclodibilidade de ovos

Ovos de *H. contortus* foram contados e distribuídos em placas de 96 poços, na proporção de 100 ovos por poço. O óleo essencial foi diluído em 12 concentrações (10; 5; 2.5; 1.25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; 0,01 e 0,005 mg/mL) seriadas a 50% em solução de água e Tween 3%, com concentração inicial de 10 mg/mL. As diferentes diluições foram colocadas nas placas, assim como o controle Tween 3%. A placa foi mantida em B.O.D., durante 48 horas a 27 °C (JACKSON e HOSTE, 2010).

4.10 Manutenção das linhagens de *Caenorhabditis elegans*

A linhagem Bristol N2 de *C. elegans* foi mantida pelo Laboratório de Controle de Parasitos (LCP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Maranhão, Brasil. Esta linhagem foi cultivada em meio de crescimento enriquecido para nematoides (NGM) com bactérias *Escherichia coli* NA22 sob condições padrão (BRENNER, 1974; JAMES e DAVEY, 2009).

4.11 Isolamento de adultos de *C. elegans*

Caenorhabditis elegans cultivados por cinco dias de idade foram isolados conforme descrito por Katiki et al. (2011) a fim de obter apenas nematoides adultos e jovens adultos. Para isso, adicionou-se 5 mL de solução tampão M9 nas placas de Petri com cultura de *C. elegans* para a retirada dos nematoides (BRENNER, 1974). Todas as fases do ciclo de vida foram recuperadas e separadas por meio de malhas granulométricas de 38 e 53 μm (FERREIRA et al., 2015).

4.12 Teste de mortalidade de adultos

Os testes de mortalidade foram realizados com populações de *C. elegans* Bristol N2. Em placas de 96 poços foram realizadas as diluições do óleo em 12 concentrações (10; 5; 2.5; 1.25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; 0,01 e 0,005 mg/mL) seriadas a 50%. Foi adicionado a cada poço 100 μL de M9 contendo, aproximadamente, 100 nematoides. Todas as diluições foram realizadas em triplicata e o controle negativo foi realizado com M9 contendo Tween 80 a 3%. As placas foram incubadas a 24 °C por 24 horas. Após a incubação, os nematoides vivos e mortos foram contados ao microscópio invertido. Os nematoides sem movimento durante cinco segundos de observação foram considerados mortos (KATIKI et al., 2011).

4.13 Análises estatísticas

4.13.1 Análise estatística para os testes com pacote de larvas e repelência com *R. microplus*

Para estimar a CL_{50} a partir do Teste de Pacote de Larvas e a RC_{50} do Teste de Repelência, as concentrações do óleo essencial utilizadas foram inicialmente transformadas para log (X) e normalizadas. Posteriormente, foi realizada uma regressão não linear usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

4.13.2 Análise estatística para os testes de inibição da eclodibilidade ovos de *H. contortus* e mortalidade de *C. elegans*

A análise estatística foi calculada com o software GraphPad Prism 8.0, com intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$), para o cálculo da concentração letal para 50% (CL_{50}) e concentração efetiva para 50% (EC_{50}) do óleo de *L. origanoides* estudado (RODITAKIS et al., 2005). Os testes do estudo foram elaborados em quádrupla, com três repetições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Características físicas e químicas

O óleo essencial de *L. origanoides* apresentou cor amarelo claro de aparência límpida e odor suave refrescante (Figura 6). O rendimento médio do óleo foi de 1,35% (m/m) com base no peso das folhas frescas.

Figura 6 - Óleo essencial de *L. origanoides* em frasco de vidro com capacidade para 5mL.



Fonte: Autor, 2021

Tabela 1 - Características físicas do óleo essencial de *L. origanoides*.

| Características | <i>L. origanoides</i> |
|-----------------|-----------------------|
| Aparência | Límpida |
| Cor | Amarelo claro |
| Odor | Suave (Cânfora) |
| Rendimento (%) | 1,35 |

A análise química por CG-MS identificou 70 componentes no óleo essencial, que representam 90,52% do total identificado (Tabela 02). O óleo é composto na sua maioria por monoterpenos (51,05%), seguido de sesquiterpenos (38,70%), fenil propanóides (0,18%) e outros compostos (0,59%).

Entre os monoterpenos, os compostos oxigenados apresentaram maior percentual (40,77%) do que os hidrocarbonados (10,28%). A cânfora foi responsável por 32,13% do total dos compostos oxigenados e também foi o composto majoritário do óleo essencial, seguida pelo canfeno (hidrocarbonado) com 6,66%.

Os sesquiterpenos hidrocarbonados representaram 22,77% da composição química do óleo, sendo o β -bisaboleno (10,02%) um dos principais compostos encontrados no óleo essencial. Os sesquiterpenos oxigenados constituíram 15,93%, fenil propanóides e outros compostos, apenas 0,18 e 0,25%, respectivamente.

Os principais compostos encontrados no óleo essencial, com composição superior a 1%, em ordem decrescente foram: cânfora (32,13%), β -bisaboleno (10,02%), canfeno (6,66%), borneol (4,11%), óxido de cariofileno (3,36%), pogostol (3,05%), α -E-bergamoteno (2,43%), elemol (1,92%), e-cariofileno (1,83%), β -atlantol (1,74%), (E)- α -Bisaboleno (1,39%), epi- β -bisabolol (1,39%), 1,8-cineol (1,25%), limoneno (1,17%), carvona (1,15%) (Tabela 02).

Resultados semelhantes foram encontradas por Sousa et al. (2020), onde os compostos majoritários foram: cânfora (34,04%), canfeno (10,99%) e β -bisaboleno (10,8%), foram identificados 37 componentes do óleo essencial de *L. origanoides* totalizando 91,58% do total de compostos orgânicos identificados, a proximidade entre os resultados está relacionada às metodologias aplicadas na coleta e extração do óleo essencial.

Pesquisas recentes realizadas por Torres-Sierra et al. (2022) identificaram 120 constituintes de *L. origanoides* coletadas em três horários do dia (6, 12 e 18 horas) em duas regiões agroecológicas na Colômbia, onde o composto metabólico majoritário foi o timol (68,02%), o que é explicado na literatura quanto aos métodos de extração (STASHENKO et al., 2004) e fatores ambientais (ROJAS et al., 2006) que podem afetar a produção de metabólitos secundários em *Lippia* spp. Com base em seus constituintes principais, diferentes quimiotipos foram relatados e nem sempre consistem em carvacrol e timol.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial das folhas de *L. origanoides*.

| Compostos | Constituintes | R.Time | % |
|---|----------------------------|---------------|--------------|
| Monoterpenos Hidrocarbonados | Triciclono | 5.548 | 0,04 |
| | α -Pinoeno | 5.834 | 0,95 |
| | Canfeno³ | 6.244 | 6,66 |
| | Sabineno | 6.912 | 0,15 |
| | β -Pinoeno | 7.030 | 0,82 |
| | Mirceno | 7.385 | 0,29 |
| | p-Cimeno | 8.505 | 0,13 |
| | Limoneno | 8.660 | 1,17 |
| | Hidrato de Canfeno | 13.271 | 0,07 |
| Total | | | 10,28 |
| Monoterpenos Oxigenados | 1,8-Cineol | 8.748 | 1,25 |
| | Linalool | 11.247 | 0,09 |
| | Cânfora⁴ | 13.163 | 32,13 |
| | Borneol | 13.978 | 4,11 |
| | α -Terpineol | 14.999 | 0,36 |
| | Verbenona | 15.767 | 0,31 |

| | | | |
|------------------------|--|---------------|--------------|
| | E-Carveol | 16.187 | 0,45 |
| | Carvona | 17.239 | 1,15 |
| | Cis-Hidrato de Sabineno | 10.022 | 0,07 |
| | Cis-Óxido de Limoneno | 12.513 | 0,08 |
| | p-Cymen-8-ol | 14.749 | 0,57 |
| | Mirtenol | 15.252 | 0,20 |
| Total | | | 40,77 |
| Sesquiterpenos | α -Copaene | 22.930 | 0,81 |
| Hidrocarbonados | β -Elemeno | 23.603 | 0,78 |
| | E-Cariofileno | 24.739 | 1,83 |
| | α -E-Bergamoteno | 25.407 | 2,43 |
| | α -Humuleno | 26.124 | 0,23 |
| | Z- β -Farneseno | 26.247 | 0,36 |
| | 9-epi-E-Cariofileno | 26.417 | 0,54 |
| | β -Selineno | 27.570 | 0,96 |
| | β-Bisaboleno² | 28.385 | 10,02 |
| | δ -Cadineno | 28.937 | 0,45 |
| | (E)- α -Bisaboleno | 29.688 | 1,39 |
| | β -Bourboneno | 23.304 | 0,06 |
| | Sesquitujeno | 24.174 | 0,06 |
| | α -Guaiano | 25.523 | 0,16 |
| | Ar-Curcumeno | 27.293 | 0,73 |
| | γ -Cadineno | 28.616 | 0,22 |
| | a-Copaen-11-ol | 29.600 | 0,06 |
| | α -Cedreno | 24.430 | 0,28 |
| | γ -Muuroleno | 27.068 | 0,11 |
| | α -Bulneseno | 27.988 | 0,52 |
| | α -Bulneseno | 28.245 | 0,26 |
| | α -Alaskeno | 28.528 | 0,29 |
| | Cis-Calameneno | 29.311 | 0,22 |
| Total | | | 22,77 |
| Sesquiterpenos | Guaiol | 31.800 | 0,06 |
| Oxigenados | γ -Eudesmol | 33.086 | 0,24 |
| | β -Eudesmol | 33.757 | 0,51 |
| | Epi- β -Bisabolol | 34.489 | 1,39 |
| | α -Bisabolol | 34.982 | 0,33 |
| | Epi-Cubebol | 27.782 | 0,19 |
| | Elemol | 29.929 | 1,92 |
| | Espatulenol | 31.034 | 0,47 |
| | Óxido de Cariofileno | 31.246 | 3,36 |
| | Pogostol | 33.918 | 3,05 |
| | Shyobunol | 35.256 | 0,47 |
| | Ledol | 32.008 | 0,63 |
| | β -Atlantol | 32.213 | 1,74 |
| | Muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol | 32.960 | 0,41 |
| | Epi- α -Muurolol | 33.460 | 0,22 |
| | α -Muurolol | 33.630 | 0,29 |
| | Cis-Calamenen-10-ol | 34.082 | 0,35 |
| | Eudesm-7(11)-en-4-ol | 35.798 | 0,15 |
| | Criptomeriona | 36.555 | 0,08 |
| | Oplopanona | 36.913 | 0,07 |
| Total | | | 15,93 |
| Fenil | Metil Chavicol | 15.321 | 0,12 |

| | | | |
|---------------------------|------------------------------|--------|--------------|
| Propanóides | E-Anetol | 19.040 | 0,06 |
| Total | | | 0,18 |
| Outros | Acetofenona | 9.967 | 0,07 |
| | (2E,6E)-Acetato de farnesila | 40.512 | 0,32 |
| | 2E, 6Z-Farnesal | 36,065 | 0,10 |
| | 2E,6E - Farnesol | 37,069 | 0,10 |
| Total | | | 0,59 |
| Total identificado | | | 90,52 |

#: porcentagem de cada constituinte químico.

Números 1, 2 e 3: ordem dos principais compostos.

5.2 Teste de pacote de larvas

O óleo essencial de *L. origanoides* apresentou atividade na mortalidade de larvas de *R. microplus* com o valor CL_{50} de 7,48 mg/mL ($IC_{95} = 7,12 - 7,85$, $R^2 = 0,98$). Peixoto et al. (2015) realizaram estudos com genótipos da espécie *Lippia alba* e obtiveram resultado próximo de *L. origanoides* com CL_{50} de 8,8 mg/mL e em concentrações mais altas de 16,8 mg/mL, mostrando que a efetividade do óleo essencial de *L. origanoides* mostrou maior atividade com relação a CL_{50} obtida de *Lippia alba*. Outros trabalhos com genótipos de *Lippia gracilis* realizado por Cruz et al. (2013), encontraram resultados em concentrações menores, onde a CL_{50} variou de 1,31 a 4,34 mg/mL e Soares et al. (2016) com CL_{50} de 0,93 a 2,99 mg/mL com genótipos de *Lippia sidoides* onde observa-se bons resultados para o gênero *Lippia* na atividade acaricida contra o carrapato.

5.3 Repelência de larvas

O controle negativo apresentou repelência <10% em todos os testes realizados. O óleo essencial de *L. origanoides* Kunth apresentou efeito repelente em todas as concentrações testadas, com RC_{50} de 0,058; 0,101 e 0,310 mg/cm² nos tempos de 10, 20 e 30 minutos respectivamente (tabela 3). Entretanto quando comparados com o DEET, este foi menos potente em relação ao controle positivo, apesar disso, o óleo essencial se mostra promissor, considerando que suas substâncias químicas repelentes podem servir como protótipo para o desenvolvimento de novas tecnologias com menos efeitos adversos ou ainda atuar como sinergistas (PEIXOTO et al., 2015).

Estudos realizados por Olivero-Verbel et al (2009) com *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* e *Cymbopogon nardus* demonstraram resultados significativos contra o besouro vermelho da farinha (*Tribolium castaneum*) quando comparados ao produto comercial IR353,

classificando-os como bons candidatos a serem incluídos como componente ativos em formulações para repelentes, resultados semelhantes foram obtidos também por Caballero-Gallardo et al. (2012) com *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* e *Lippia origanoides* contra a mesma espécie de besouro. Resultados como este mostram a eficiência da atividade repelente da espécie *L. origanoides* citadas na literatura.

Tabela 3 - Atividade de repelência do óleo essencial de *Lippia origanoides* e DEET (controle) sobre larvas de *R. (B.) microplus*.

| Substâncias | Tempo (min) | <i>Rhipicephalus microplus</i> | | |
|-----------------------|-------------|--------------------------------|-------------|----------------|
| | | RC ₅₀ | IC95 | R ² |
| <i>L. origanoides</i> | 10 | 0.058 | 0.051-0.067 | 0.92 |
| | 20 | 0.101 | 0.089-0.116 | 0.95 |
| | 30 | 0.310 | 0.282-0.338 | 0.97 |
| DEET | 10 | 0.025 | 0.021-0.030 | 0.98 |
| | 20 | 0.026 | 0.019-0.030 | 0.96 |
| | 30 | 0.031 | 0.026-0.037 | 0.96 |

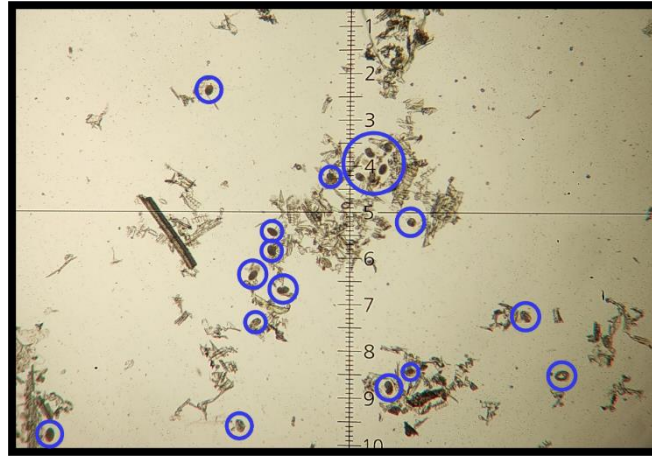
RC₅₀ refere-se à concentração (mg/cm²) à qual 50% das larvas de *R. (B.) microplus* foram repelidas; IC95, intervalo de confiança; R², coeficiente de determinação.

5.4 Inibição da eclodibilidade de ovos

No teste foi identificado que a partir da concentração de 2,5 mg/mL, detectou-se 100% de inibição da eclosão dos ovos, onde observou-se a ausência de larvas (Figura 7). Já nas concentrações de 1,2 a 0,62 mg/mL foram observadas a presença de larvas e ovos não eclodidos (Figura 08).

A EC₅₀ encontrada para o óleo de *Lippia origanoides* foi de 0,67 mg/mL (IC95 = 0,60 - 0,74, R² = 0,97) sobre ovos de *H. contortus*, o teste demonstrou que o óleo essencial possui efeito dose-resposta. Os resultados foram satisfatórios quando comparado a concentrações maiores obtidas por Macedo et al. (2009) com EC₅₀ = 8,3 mg/mL realizando teste com *Eucalyptus globulus* e concentrações menores foram obtidas de *Hesperozygis myrtoides* através de estudos realizados por Castilho et al (2016) com EC₅₀ = 0,249 mg/mL contra *H. contortus*. Resultados como este mostram que o óleo essencial de *L. origanoides* possui bioatividade promissor para formulações de produtos bioativos contra parasitos.

Figura 7 - Ovos de *H. contortus* após 48 horas sem eclosão (azul) nas concentrações de 10 a 2,5 mg/mL de óleo essencial.



Fonte: Autor, 2021

Figura 8 - Ovos de *H. contortus* após 48 horas sem eclosão (azul) e com presença de nematoides (vermelho) em concentrações de 1,2 a 0,62 mg/mL de óleo essencial.



Fonte: Autor, 2021

5.2 Mortalidade de *C. elegans* (Bristol N2)

O óleo essencial mostrou atividade na mortalidade de adultos de *C. elegans* com CL_{50} de 2,23 mg/mL ($IC_{95} = 1,79-2,78$, $R^2 = 0,91$). Estudos realizados por Satyal et al. (2012) com óleo essencial obtido de sementes de *Amomum subulatum* (Zingiberaceae) apresentaram atividade nematicida moderada sobre nematoides juvenis e adultos de *C. elegans*, com CL_{50} de 0,341 mg/mL. Trabalhos realizados por Lima et al. (2021) utilizando óleo essencial de *Hedychium coronarium* (Lírio-do-brejo) em adultos de *C. elegans* obtiveram CL_{50} de 0,082 mg/mL, concentração menor que a apresentada neste estudo, contudo não foram encontrados estudos com avaliação da atividade anti-helmíntica em relação ao óleo essencial de *L. origanoides* usando o modelo experimental de *C. elegans*, devido à escassez de estudos avaliando atividades de óleos essenciais.

CONCLUSÃO

O óleo essencial de *L. origanoides* apresentou como compostos principais a cânfora, β -bisaboleno e canfeno, exala um odor suave de cânfora podendo ser um novo quimiótipo relatado para a espécie conforme citado na literatura.

Conforme os resultados obtidos neste estudo, o óleo essencial apresenta atividade carrapaticida, repelente sobre *R. microplus* e anti-helmíntica contra as espécies *H. contortus* e *C. elegans*, sobretudo se mostrou mais promissor na inibição da eclosão dos ovos de *H. contortus*, onde foram obtidos melhores resultados e com o prosseguimento de estudos *in vivo*, podem vir a ser utilizados no controle dos nematoides gastrintestinais de ovinos e caprinos.

No geral o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou atividades satisfatórias podendo ser considerado um candidato potencial para estudos mais detalhados quanto à segurança e ao desenvolvimento de formulações de produtos bioativos para o controle de ecto e endoparasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, IL, USA, 2006.
- ALMEIDA, F. A.; PIZA, M. L. S. T.; BASSETTO, C. C.; STARLING, R. Z. C.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; PROTES, V. M.; PARIZ, C. M.; CASTILHOS, A. M.; COSTA, C.; AMARANTE, A. F. T. Infection with gastrointestinal nematodes in lambs in different integrated crop-livestock systems (ICL). **Small Ruminant Research**, p. 66–72, 2018.
- ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1083–1086, 2004.
- ALVES, M.C.S; MEDEIROS FILHO, S.; MANOEL NETO, A.; BRITO, R.C.; ARAUJO, R.C. Allelopathic effect of essential oils of medicinal plants in *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, v. 16, n. 3, p. 731–736, 2014.
- AMARANTE, A.F.T. Sustainable worm control practices in South America. **Small Rumin. Res.** 118, p. 56-62, 2014.
- BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C.; ELANGO, G.; ABDUZ ZAHIR A, ABDUL RAHUMAN A. Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. **Veterinary Parasitology**. 166(3-4): 286-292, 2009.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, B.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALDIM, I.; TONANI, L.; KRESS, M. R. V. Z.; OLIVEIRA, W. P. *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-*Candida* agent. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 73–81, 2019.
- BENAVIDES, M. V.; SOUZA, C. J. H.; SMITH, W. D.; MORAES, J. C. F. Evaluation of protection in grazing lambs immunised with different doses of *Haemonchus contortus* gut membrane glycoproteins in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2021.
- BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. **Advances in Parasitology**. vol. 93, p. 95-141, 2016.
- BISSINGER, B. W.; ROE, R. M. Tick repellents: past, present, and future. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 96: p. 63–79, 2010.
- BORGES, A.R.; AIRES, J.R. DE A.; HIGINO, T. M. M.; MEDEIROS, M. das G. F. DE, CITÓ, A.M. DAS G. L., LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. DE. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**. 132, p. 123–128, 2012.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.
- CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E.E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia*

origanoides cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**. 50, 62–65, 2012.

CARROLL, J. F.; SOLBERG, V. B.; KLUN, J. A.; KRAMER, M.; DEBBOUN, M. Comparative activity of deet and AI3-37220 repellents against the ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in laboratory bioassays. **Journal of Medical Entomology**. 41: p. 249–254, 2004.

CASTILHO, C. V. V.; FANTATTO, R. R.; GAÍNZA, Y. A.; BIZZO, H. R.; BARBI, N. S.; LEITÃO, S. G.; CHAGAS, A. C. S. In vitro activity of the essential oil from *Hesperozygis myrtoides* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 27(1), p. 70–76, 2016.

CASTRO, K. N. DE C.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. DE S.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; DE ANDRADE, I. M.; MAGALHÃES, J. A.; BARROS, D. M. A. In vitro efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, 27(2), 203–210, 2018.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A. WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1–2, p. 35–44, 1992.

CRUZ, E. M. O.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. DE A.; ARAUJO, S. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, 195(1–2), 198–202, 2013.

DAMASCENO, T. E. S.; ALMEIDA, R. R.; CARVALHO, S. Y. B.; CARVALHO, G. S. G.; MANO, V.; PEREIRA, A. C.; GUIMARÃES, L. G. L. *Lippia origanoides* Kunth essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and ρ -coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 125, n. May, p. 85–94, 2018.

EHSAN, M.; HU, R.S.; LIANG, Q. L.; HOU, J. L.; SONG, X.; YAN, R.; ZHU, X.Q.; LI, X. Advances in the development of anti-*Haemonchus contortus* vaccines: challenges, opportunities, and perspectives. **Vaccines (Basel)** 8, E555, 2020.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BRADI, W.; SALA, M; AIT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oil: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 483, p. 220-243, 2015.

EMERY, D. L.; HUNT, P.W.; Le JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology**. 46, p. 755-769, 2016.

FARMNEWS – **Dados da produção mundial de carne bovina e por país, entre 2018 e 2022**. Disponível em: < <https://www.farmnews.com.br/mercado/dados-da-producao-mundial-de-carne-bovina-e-por-pais-entre-2018-e-2022/>> Acesso em: 10/04/2022.

FERREIRA, S. R.; ANTÔNIO, T.; MENDES, O.; BUENO, L. L.; ARAÚJO, J. V. DE; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T. A New Methodology for Evaluation of

Nematode Viability. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FIGUEIREDO, A.; NASCIMENTO, L. M.; LOPES, L. G.; GIGLIOTTI, R.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G.; SANTOS, M. G.; FALCÃO, D. Q.; NOGUEIRA, J. A. P.; ROCHA, L.; CHAGAS, A. C. S. First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, 252, 131–136, 2018.

GARBOUI, S. S.; JAENSON T. G. T.; BORG-KARLSON A. K.; PÅLSSON K. Repellency of methyl jasmonate to *Ixodes ricinus* nymphs (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**. 42: p. 209–215, 2007.

GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. DA S.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. **Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (org.). Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte. p. 17-26, 2019.

GASSER, R. B.; BOTT, N. J.; CHILTON, N. B.; HUNT, P.; BEVERIDGE, I. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock-bionomic and biotechnological implications. **Biotechnology Advances**. 26, p. 325-334, 2008.

GONZALES, J. C. O controle do carrapato do boi. 2. ed. Porto Alegre: **Edição do Autor**, p. 235, 1995.

GOVINDARAJAN, M.; R. SIVAKUMAR. Mosquito adulticidal and repellent activities of botanical extracts against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 4: p. 941–947, 2011.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUERRERO, F. D.; LOVIS L.; MARTINS J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 21: p. 1–6, 2012.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, G. R.; APANASKEVICH, A. D.; PETNEY, N. T.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, G. I.; SHAO, R.; BARKER, C. S. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, n. 2528, p. 1-28, 2010.

JACKSON, F.; HOSTE, H. **In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes**. In: VERCOE, P., MAKKAR, H., SCHLINK, A. (org.). In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Springer, Dordrecht **In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and related methodologies**, p. 25–45, 2010.

JAMES, C. E.; DAVEY, M. W. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 213-220, 2009.

KAPLAN, R.M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends Parasitol.** 20, p. 477-481, 2004.

KATIKI, L.M., BARBIERI, A.M.E., ARAUJO, R.C., VERÍSSIMO, C.J., LOUVANDINI, H., FERREIRA, J.F. S., 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. **Veterinary Parasitology.** 243, 47–51, 2017.

KATIKI, L.M.; CHAGAS, A. C. S.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. **Veterinary Parasitology**, 183(1-2): p. 103-108, 2011.

KLAFKE, G.M.; SABATINI, G. A.; ALBUQUERQUE, T. A.; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology.** 142, p. 386–390, 2006.

KOTZE, A. C.; HUNT, P. W.; SKUCE, P.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MARTIN, R. J.; SAGER, H.; KRÜCKEN, J.; HODGKINSON, J.; LESPIE, A.; JEX, A. R.; GILLEARD, J. S.; BEECH, R. N.; WOLSTENHOLME, A. J.; DEMELER, J.; ROBERTSON, A. P.; CHARVET, C. L.; NEVEU, C.; KAMINSKY, R.; RUFENER, L.; ALBERICH, M.; MENEZ, C.; PRICHARD, R. K. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. **International Journal for Parasitology.** Drugs and drug resistance 4, p. 164-184, 2014.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 28-37, 2015.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2016.

LIMA, A. S.; COSTA JUNIOR, H. N. P.; COSTA-JUNIOR, L. M.; MONTEIRO, O. S.; MAIA, J. G. S.; DA ROCHA, C. Q. Anthelmintic effect of essential rhizome oil from *Hedychium coronarium* Koenig (Zingiberaceae) introduced in Northeastern Brazil. **Acta Tropica**, 218, 2021.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 577, 2008.

LOVIS, L.; MENDES, M. C.; PERRET, J. L.; MARTINS, J. R.; BOUVIER, J.; BETSCHART, B.; SAGER H. Use of the larval tarsal test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. **Veterinary Parasitology**, 191: p. 323–331, 2013.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da amazônia.** 103f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

LUZ, H. R.; MUÑOZ-LEAL, S.; ALMEIDA, J. C.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. Carrapatos parasitando morcegos (Mammalia: Chiroptera) na Caatinga, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 484-491, 2016.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; DE OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. DA S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, 18(3), 62–66, 2009.

MAGALHÃES, H. M.; AQUINO, C. F.; SOARES, E. P. S.; SANTOS, L. D. T.; LOPES, P. S. N. Ação alelopática de óleos essenciais de alecrim-pimenta e capim-santo na germinação de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 485–496, 2013.

MAGALHÃES, K. A.; HOLANDA FILHO, Z. F.; MARTINS, E. C.; LUCENA, C. C. DE. Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal 2019. **Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**, n. 11, dez. 2020.

MAR, J. M.; SILVA, L. S.; AZEVEDO, S. G.; FRANÇA, L. P.; GOES, A. F. F.; SANTOS, A. L.; BEZERRA, J. A.; NUNOMURA, R. C. S.; MACHADO, M. B.; SANCHES, E. A. *Lippia organoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. October 2017, p. 292–297, 2018.

MICHEL, T.; SOUZA, U.; DALL'AGNOL, B.; WEBSTER, A.; PETERS, F.; CHRISTOFF, A.; LUZA, A. L.; KASPER, N.; BECKER, M.; FIORENTIN, G.; KLAFKE, G.; VENZAL, J.; MARTINS, J. R.; JARDIM, M. M. M.; OTT, R.; RECK, J. *Ixodes* spp. (Acari: Ixodidae) ticks in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v.22, p. 2057-2063, 2017.

MORÃO, R. P.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R.; PRATES, J. P. B.; OLIVEIRA, F. D. Constituintes Químicos e Princípios Farmacológicos do Óleo Essencial de Alecrim Pimenta (*Lippia organoides*). **Revista Unimontes Científica**, v. 18, n. 1, p. 74–81, 2016.

MUÑOZ-LEAL, S.; TOLEDO, L. F.; VENZAL, J. M.; MARCILI, A.; MARTINS, T. F.; ACOSTA, I. C. L.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: Ornithodoros) associated with stream breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: Cycloramphus) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 682-692, 2017.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; GONZALEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks of the Southern Cone of América: Diagnosis, Distribution, and Hosts With Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. **Academic Press**, p. 339, 2017.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, 6(12): 1451-1474, 2013.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno. Buenos Aires: **Hemisfério Sur**, p. 19, 1982.

O'LEARY, N.; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 197–219, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; FERNANDES, P. D.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 206–214, 2014.

OLIVERO-VERBEL, J.; CABALLERO-GALLARDO, K.; JARAMILLO-COLORADO, B.; STASHENKO, E. Repellent activity of the essential oils from *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* and *Cymbopogon nardus* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*, Herbst. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**. vol.41, n.3, pp.244-250, 2009.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PANDEY, S.; TIWARI, S.; KUMAR, A.; NIRANJAN, A.; CHAND, J.; LEHRI, A.; CHAUHAN, P. S. Antioxidant and anti-aging potential of Juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil in *Caenorhabditis elegans* model system. **Industrial Crops and Products**, 120(October 2017), p. 113–122, 2018.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, 76(3), p. 201–214, 2001.

PEIXOTO, M. G.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; FITZGERALD, A.; LIMA, S.; SAYNARA, T.; MENEZES, A. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, 210(1–2), 118–122, 2015.

RIBEIRO, A. F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249–259, 2014.

RODITAKIS, E.; RODITAKIS, N. E.; TSAGKARAKOU, A. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. **Pest Management Science**, p. 577–582, 2005.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; R. J. MILLER, M. M. OJEDA-CHI, J. A. ROSADO-AGUILAR, I. C. TRINIDAD-MARTÍNEZ, AND A. A. PÉREZ DE LEÓN. Acaricide and ivermectin resistance in a field population of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from red deer (*Cervus elaphus*) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, 200: p. 179–188, 2014.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; TREES, A. J.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; VILLEGAS-PEREZ, S. L.; HODGKINSON, J. E. Evolution of acaricide resistance: phenotypic and genotypic

changes in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to pyrethroid selection pressure. **International Journal for Parasitology**, 41: p. 895–903, 2011.

ROEBER, F.; JEX, A.R.; GASSER, R.B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. **Parasites & Vectors**. v. 6, p. 153, 2013.

ROJAS, J.; MORALES, A.; PASCUALE, S.; MÁRQUEZ, A.; RONDON, R.; MATHÉ, I., VERÉS, K., Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons of the year in Venezuela. **Natural Product Communications**. v. 1, n. 3, p. 205 – 207, 2006.

SANTOS, A. C. B.; NUNES, T. S.; COUTINHO, T. S.; SILVA, M. A. P. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 980–991, 2015.

SATYAL, P.; DOSOKY, N. S.; KINCER, B. L.; SETZER, W. N. Chemical Compositions and Biological Activities of *Amomum subulatum* Essential Oils from Nepal. **Natural Product Communications** 7, 1233–1236, 2012.

SILVA, G. M. F., AMORIM, B. M., QUIRINO, A. H. DE L., SILVA, A. DOS S., & FARIAS, L. A. DE. *Haemonchus contortus* em ovinos e caprinos. **Pubvet**, v. 13(9), p. 1-4, 2019.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Porto Alegre: UFRGS**, 2007.

SOARES, A. M. S.; PENHA, T. A.; ARAÚJO, S. A.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; COSTA-JUNIOR, L. M. Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, 25(4), 401-406, 2016.

SOARES, B. V.; NEVES, L. R.; FERREIRA, D. O.; OLIVEIRA, M. S. B.; CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C.; GONÇALVES, R. A.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 234, n. January, p. 49–56, 2017.

SOARES, S. F., L. M. BORGES, R. DE SOUSA BRAGA, L. L. FERREIRA, C. C. LOULY, L. M. TRESVENZOL, J. R. DE PAULA, AND P. H. FERRI. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. **Veterinary Parasitology**, 167: p. 67–73, 2010.

SOUSA, M. A. A.; MESQUITA, M. L. R.; ORLANDA, J. F. F.; CATUNDA, F. E. A. Chemical composition and phytotoxic activity of *Lippia origanoides* essential oil on weeds. **Australian Journal of Crop Science**, 14(3), 3015–3024, 2020.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; CALA, M. P.; DURÁN, D. C.; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 1, p. 192–202, 2013.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 93–103, 2010.

STASHENKO, E. E.; RUIZ, C.; MUÑOZ, A.; CASTAÑEDA, M.; MARTÍNEZ, J. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H. B. K. grown in Colombia. **Natural Product Communications**, Westerville, v.3, p. 563-566, 2008.

TEIXEIRA, M. L.; CARDOSO, M. DAS G.; FIGUEIREDO, A. C. S.; MORAES, J.C.; ASSIS, F.A.; DE ANDRADE, J.; NELSON, D.L.; DE SOUZA GOMES, M.; DE SOUZA, J. A.; MARQUES DE ALBUQUERQUE, L.R. Essential oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. **American Journal of Plant Sciences**. 5, p. 1181–1190, 2014.

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. M.; MALHEIRO, R.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 217–225, 2014b.

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. M.; MALHEIRO, R.; MACHADO, S. S.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 169–176, 2014a.

TORRES-SIERRA, L. M.; PÉREZ-CORDERO, A.; TORREGROZA-ESPINOSA, A., VITOLA-ROMERO, D. Chemical comparison of the essential oils of *Lippia origanoides* in two agroclimatic zones of the Colombian Caribbean coast. **DYNA**, vol. 89(220), p. 172-177, 2022.

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

VEGA-VELA, N. E.; DELGADO-ÁVILA, W. A.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 1, p. 7–17, 2013.

VERÍSSIMO, C. J.; SILVA, R. G.; OLIVEIRA, A. A. D.; RIBEIRO, W. R.; ROCHA, U. F. Contagens de ínstares do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos mestiços. **Boletim de Indústria Animal**, v. 54, n.2, p. 21-26, 1997.

VIANA, T. J. M. S.; SANTOS, A. D. R. S.; NETO, C. M. S.; COSTA, L. P. C.; OLIVEIRA, D. M. L. Métodos de Extração do Óleo Essencial de *Lippia origanoides* Kunth. **Universidade Tiradentes: INTERNATIONAL NURSING CONGRESS**, maio/2017.

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 343–349, 2010.

VIEIRA, L. S. Endoparasitoses Gastrointestinais de Caprinos e Ovinos: Alternativas de Controle. In: **Encontro Nacional de Produção de Caprinos e Ovinos**, Campina Grande, 2006.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleos essenciais de eucalipto. Universidade de São Paulo, **Documentos Florestais**, n.17, p. 1-26, agosto/2003.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J.S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 449-456, 2016.