



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Desenvolvimento de dispositivo inovador multifuncional a base de óleo
essencial de *Syzygium aromaticum***

Orientanda: Evalina Costa de Sousa
Orientadora: Prof^a Dra. Lívia Cristina Lira
de Sá Barreto

Brasília - DF

2023

EVALINA COSTA DE SOUSA

**Desenvolvimento de dispositivo inovador multifuncional a base de óleo
essencial de *Syzygium aromaticum***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da UnB para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Livia Cristina Lira de
Sá Barreto

Brasília - DF

2023

EVALINA COSTA DE SOUSA

**Desenvolvimento de dispositivo inovador multifuncional a base de
óleo essencial de *Syzygium aromaticum***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
de Brasília para obtenção do Título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Livia
Cristina Lira de Sá Barreto

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto –
(presidente) Universidade de Brasília

Dra. Heloísa Alves de Figueiredo
Sousa Instituto Federal de
Brasília- IFB

Prof. Dr. Diego Juscelino Santos
Dias Universidade de Brasília

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais, aos filhos, meu esposo, familiares e amigos que sempre me incentivaram e encorajaram a sempre lutar e nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar ao êxito sem o precioso apoio de várias pessoas.

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as graças, bênçãos e livramentos que me acalmaram e me confortaram nos momentos de atribuições, em meio às turbulências que me permitiu enfrentar diversas situações difíceis para me proporcionar o meu melhor em concluir esse trabalho.

Aos meus pais Nelcides Costa de Sousa e Edson Nunes de Sousa por todo apoio, suporte e incentivo para priorizar e alcançar meus objetivos através dos estudos, agradeço também aos meus filhos Luis Paulo de Sousa e Lucas de Sousa Peixoto por todo carinho e por ser sempre o meu maior motivo para prosseguir. Agradeço ao meu esposo José Geraldo Peixoto por toda parceria e cuidado.

À minha querida e amada irmã Edina Maria Costa de Sousa, que sempre esteve ao meu lado me dando suporte em todas as situações e que sou fã incondicionalmente e à minha linda sobrinha Priscila Lorrane, obrigada pelo carinho, cuidado e cumplicidade.

Aos meus queridos amigos da Faculdade de Ceilândia FCE/UnB, Evilásio Marinho, Jean Soares, Lynce Ramos, Nara Rodrigues Almeida e Rosileide Fernandes, pessoas importantíssimas que me acompanharam desde o início da jornada.

Aos meus amigos do LABTEC, Antônio Leonardo Garcia e ao Sr. Modoaldo Teles que sempre compreenderam a importância do mestrado para mim. Obrigada pela força e pela ajuda nos momentos em que estive ausente.

As minhas irmãs de jornada, Alice Lima Rosa Mendes e Maiane Silva de Souza, pelos momentos de mais risos e menos lamentações que compartilhamos.

Em especial, quero agradecer à minha filha de coração Tatiele Barboza pela paciência, apoio e disposição nessa missão que parecia interminável por todas as dicas, as conversas, bons momentos que jamais irei esquecer, te amo filha.

Aos funcionários da EMBRAPA Cerrados, Fred Gomes, Claudiomir Gonçalves da Silva por viabilizarem a coleta das amostras de carrapatos, essenciais ao estudo.

Agradeço imensamente a minha querida orientadora e Prof.a Dra Livia Cristina Lira de Sá Barreto, por toda dedicação, acompanhamento, preocupação, disponibilidade, presença, atenção até mesmo em situações alheias ao desenvolvimento da pesquisa, desde o início de minha jornada, sempre presente e buscando sempre me preparar da melhor forma.

Agradeço ainda a Prof.a Dra Daniela Castilho Orsi, por dividir os conhecimentos e auxiliar nos experimentos no laboratório de microbiologia.

Por fim, agradeço às instituições que fomentaram o trabalho: Universidade de Brasília - UnB, através do Edital COPEI-DPI/DEX 01/2021 e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAP-DF, através do Edital 04/2021 – Demanda Espontânea.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates.

RESUMO

O *Rhipicephalus (B.) microplus*, conhecido popularmente como carrapato-do-boi, é a espécie que mais compromete a produtividade pecuarista bovina no país, além de configurar um fator preponderante de impacto para prejuízos comerciais, ambientais e de saúde pública. Na contemporaneidade existem várias estratégias de controle, prevenção e eliminação de pragas agrícolas e outros microrganismos patogênicos como bactérias e fungos. Desta forma, a adoção de medidas de aplicação das formulações com dispositivos inovadores multifuncionais por intermédio de óleos essenciais (OEs) vêm encontrando grande eficiência no combate a esses agentes etiológicos, principalmente o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA). O objetivo consiste na obtenção e caracterização de um dispositivo multifuncional inovador a base de microemulsões contendo o óleo essencial de *S. aromaticum*, dispersas em uma base saponificada desenvolvida através de uma reação de saponificação, visando a aquisição de um sistema, que em contato com o meio aquoso, permita a liberação do eugenol (princípio ativo do OESA), molécula responsável pelo controle de pragas agrícolas e de extensa ação acaricida, bactericida e fungicida. A metodologia foi desenvolvida com base em estudo experimental, com a realização da construção do diagrama de fases pseudoternário, seleção da formulação, desenvolvimento e caracterização físico-química da microemulsão, elaboração de uma base saponificada, avaliação acaricida e da atividade microbiológica. Os resultados obtidos demonstraram que todas as três formulações mantiveram-se com viscosidade adequada, de coloração amarelada, límpidas e transparentes. Dentre as formulações desenvolvidas, a formulação 02 (ME25, 2:8:6 OESA: T/Cot: água) foi a escolhida para os demais testes devido às suas características mais promissoras. Os resultados indicaram valores de PDI menores que 0,3 demonstrando que existe uma grande homogeneidade de distribuição do diâmetro das gotículas nessas formulações. O potencial zeta variou entre -27,1 e -39,9 mV. A formulação selecionada apresentou pH de 8,50. Com relação à base saponificada obtida, apresentou-se de forma física semissólida, mesmo após secagem, comprometendo a obtenção dos tabletes. Quanto à atividade acaricida, o uso do (OESA), puro, e da microemulsão inibiram significativamente a postura das fêmeas ingurgitadas, demonstrando uma eficácia de quase 100% para as teleóginas. Já para as formas larvais, o grupo contendo o OESA puro e microemulsionado, resultou em mortalidades acima de 99% e 95%, respectivamente. No que concerne a avaliação microbiológica, verificou-se que tanto o óleo essencial puro quanto o composto microemulsionado apresentaram atividade antimicrobiana, sendo classificados como inibidores fortes, pois apresentaram Concentração Inibitória mínima (CIM) de até 500µg/mL. Com isso, conclui-se que a microemulsão contendo o óleo essencial de *S. aromaticum* foi obtida de maneira satisfatória, revelando-se como adequada em seus aspectos físico-químicos. Outrossim, tanto o óleo essencial quanto a microemulsão mostraram-se promissores no combate a espécie *Rhipicephalus (B.) microplus*, sugerindo uma exímia atividade carrapaticida, além de uma atividade antimicrobiana satisfatória, sendo necessários novas pesquisas e experimentos para elucidação dos mecanismos de ação do composto.

Palavras-chave: *Syzygium aromaticum*, microemulsões, acaricidas, produtos com ação antimicrobiana.

ABSTRACT

Rhipicephalus (B.) microplus, popularly known as “carrapato-do-boi”, is the species that most compromises cattle breeding productivity in the country. Additionally, this parasite has a major negative impact on commercial, environmental, and public health. Nowadays, several strategies are available for controlling, preventing, and eliminating agricultural pests and other pathogenic microorganisms such as bacteria and fungi. In this way, applying formulations with innovative multifunctional devices based on essential oils (OEs) has been finding great efficiency in combating these etiological agents, mainly the *Syzygium aromaticum* essential oil (OESA). This work aims to obtain and characterize an innovative multifunctional device based on microemulsions containing the essential oil of *S. aromaticum*, dispersed in a saponic base developed by a saponification reaction. It is expected that such system, when in contact with the aqueous medium, releases eugenol, an active ingredient of OESA and responsible for controlling agricultural pests due to an extensive acaricidal, bactericidal, and fungicidal action. The methodology was developed based on an experimental design study, including a pseudo- ternary phase diagram, the formulation selection, the development and physical-chemical characterization of the microemulsion, the production of a soap base, and the evaluation of acaricides and microbiological activity. The results obtained demonstrated that all three formulations remained with adequate viscosity, yellowish, clear, and translucent. Among the developed formulations, formulation 02 (ME25, 2:8:6 OESA: T/Cot: water) was chosen for the other tests due to its promising characteristics. The results indicated PDI values lower than 0.3, demonstrating an excellent homogeneity in the droplet diameter distribution. The zeta potential varied between -27.1 and -39.9 mV. The selected formulation had a pH of 8.50. The soap base presented a semi-solid appearance, even after drying, compromising the tableting process. As for the acaricidal activity, using OESA, pure, and in the microemulsion significantly inhibited the posture of the engorged females, demonstrating an effectiveness of almost 100%. As for the larval forms, the group containing pure and microemulsified OESA resulted in mortalities above 99% and 95%, respectively. The microbiological evaluation showed an antimicrobial activity for both pure and microemulsified essential oil, classified as strong inhibitors, as they had a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of up to 500µg/mL. Thus, it is concluded that the microemulsion containing the essential oil of *S. aromaticum* was obtained satisfactorily, proving to be adequate in its physicochemical aspects. Furthermore, both the essential oil itself and the microemulsion showed capable of combating the species *Rhipicephalus (B.) microplus*, suggesting an excellent acaricidal activity, in addition to a satisfactory antimicrobial activity, requiring further research and experiments to elucidate the mechanisms of action of the compound.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, microemulsion, acaricide, antimicrobial action product

LISTA DE FIGURA

- Figura 1.** Ciclo biológico do *Rhipicephalus microplus* exibindo o tipo de comportamento monoxeno (um único ciclo de hospedeiro) 20
- Figura 2.** Estrutura química e as principais espécies vegetais que sintetizam eugenol, em seus óleos essenciais
- Figura 3.** Representação esquemática das três microestruturas de microemulsões mais comumente encontradas: (a) ME óleo em água (O/A) e (b) ME água em óleo (A/O), empregando surfactante aniônico e álcool de cadeia média, e (c) ME bicontínua 33
- Figura 4.** Tensoativos, molécula surfactante 35
- Figura 05.** A. Placa com fêmeas de *R. microplus*. Figura B. Peso e preparo das placas para fixação das teleóginas. Figura C. Teleóginas fixadas na posição dorsal Figura D. Oviposição das teleóginas Figura E Ovos nos tubos lacrados 42
- Figura 6.** Diagrama de fases pseudoternário mostrando as regiões de formação de microemulsões gel e líquida, em vermelho, está indicada a região escolhida para o preparo da microemulsão. O diagrama foi composto por renex e amida na proporção 3:1 (p/p), como tensoativos, OESA, como fase oleosa e água, como fase aquosa 45
- Figura 7.** Aspecto visual das amostras de microemulsões com o fitoingrediente microestruturado 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das amostras selecionadas do diagrama RENEX/AMIDA 3:1/ OESA/ Água	46
Tabela 2. Caracterização das microemulsões quanto ao diâmetro da gotícula (nm), ZETA e ao PDI. Formulação 1(ME10), formulação 2(ME25) e formulação 3(ME43)	48
Tabela 3. Mensuração do pH das microemulsões	50
Tabela 4. Eficiência dos tratamentos em testes in vitro com teleóginas de <i>R. microplus</i> procedentes de bovinos naturalmente infestados criados na fazenda CTZL, Brasília DF	51
Tabela 5. Médias percentuais de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> submetidas ao teste de imersão em diferentes grupos de tratamento.	51
Tabela 6. CIM, CBM e CFM do OESA	53
Tabela 7. CIM, CBM e CFM do composto microemulsionado e do eugenol	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

OESA	Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>
DFPT	Diagrama de Fases Pseudoternário
PDI	Potencial de Polidispersão
ME1	Microemulsão 10
ME2	Microemulsão 25
ME3	Microemulsão 43
TIL	Teste de imersão de Larvas
TIA	Teste de imersão de Adultas
CBM	Concentração Bactericida
Mínima CIM	Concentração Inibitória Mínima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina (oxacilina)
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazi
pH	Potencial hidrogeniônico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LABTEC	Laboratório de Tecnologias da Universidade de Brasília- Campus Ceilândia
UnB	Universidade de Brasília
CTZL	Centro de tecnologias para raças zebuínas leiteiras
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	5.1 Objetivo Geral	
2.3	Objetivos específicos	
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	Pragas Agrícolas	
3.2	Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	
3.2.1	Ciclo de vida do carrapato	
3.2.2	Controle do carrapato	
3.2.3	Resistência aos carrapaticidas	
3.2.4	Doenças parasitárias transmitidas na <i>R. Microplus</i>	
3.3	Bactérias	
3.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	
3.3.2	<i>Escherichia coli</i>	
3.4	Fungos	
3.4.1	<i>Candida krusei</i>	
3.5	Óleos Essenciais	
3.5.1	Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (OESA)	
3.6	Eugenol	
3.6.1	Mecanismo de ação do Eugenol e do Óleo essencial cravo da Índia	
3.6.2	Atividade antiparasitária	
3.6.3	Atividade antifúngica	
3.6.4	Atividade antibacteriana	
3.7	Toxicidade do eugenol	
3.8	Microemulsão	
3.8.1	Tensoativos e Co Tensoativos	
3.8.2	Diagrama de fases	
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Material	
4.2	Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química do Fitoingrediente Microestruturado.	
4.2.1	Diagrama de fases pseudoternário para seleção da composição da microemulsão (fitoingrediente microestruturado)	

- 4.2.2 Seleção da composição da microemulsão: fitoingrediente microestruturado.
- 4.3 Caracterização das microemulsões
 - 4.3.1 Dispersão Coloidal
 - 4.3.2 PDI e Diâmetro Hidrodinâmico Médio das Gotículas
 - 4.3.3 Potencial Zeta
 - 4.3.4 Mensuração do potencial hidrogeniônico - pH
- 4.4 Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química do Dispositivo Inovador –
Tabletes Saponeicos Contendo Fitoingrediente Microestruturado
 - 4.4.1 Produção da base do dispositivo inovador – base saponeica
- 4.5 Avaliação biológica *in vitro*
 - 4.5.1 Avaliação acaricida através do teste de imersão de adultas (TIA)
 - 4.5.2 Teste de imersão de Larvas (TIL)
 - 4.5.3 Atividade microbiológica e testes de eficácia bactericida e fungicida das
microemulsões
 - 4.5.3.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)
 - 4.5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

45

- 5.1 Desenvolvimento e caracterização físico-química do fitoingrediente microestruturado
 - 5.1.1 Seleção da composição da microemulsão contendo o fitoingrediente microestruturado
 - 5.1.2 Caracterização do PDI e Diâmetro das partículas
 - 5.1.3 Caracterização do Potencial Zeta
 - 5.1.4 Mensuração do potencial hidrogeniônico - pH
- 5.2 Obtenção da base do dispositivo inovador - base saponeica
- 5.3 Avaliação da eficácia da atividade acaricida
- 5.4 Avaliação da atividade microbiológica

6 CONCLUSÕES

56

7 PERSPECTIVAS

57

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

58

1 INTRODUÇÃO

Sob a ótica dos estudos e manejos para manutenção das plantações saudáveis e produtivas, aliada ao equilíbrio da saúde da população, as pragas agrícolas surgem como um pesadelo na rotina de diversas comunidades agrícolas, que figuram expressivamente no potencial de crescimento socioeconômico do país. O desenvolvimento de infecções por pragas agroecológicas, especialmente causadas por ectoparasitas como os carrapatos, tem sido cada vez mais frequente no Brasil, país de características climáticas que favorecem a sobrevivência e disseminação parasitária do carrapato, principalmente da espécie *Rhipicephalus (B.) microplus* (OLIVEIRA et al., 2013; FIDELIS JÚNIOR et al., 2014; CHAPARRO- GUTIÉRREZ, 2020).

O *Rhipicephalus (B.) microplus*, conhecido popularmente como carrapato-do-boi, é a espécie que mais compromete a produtividade pecuarista bovina no país, além de configurar um fator preponderante de impacto para prejuízos comerciais, ambientais e de problemas para a saúde pública. Contemporaneamente existem várias estratégias de controle, prevenção e eliminação de carrapatos como, a forma alopática por meio de feromônios associados a substâncias tóxicas que podem ser medicamentos sistêmicos injetáveis ou medicamentos de contato a partir de técnicas de pulverização ou imersão (OLIVEIRA et al., 2013; FIDELIS JÚNIOR et al., 2014; CHAPARRO- GUTIÉRREZ, 2020; TORRES-SANTOS et al., 2022).

Tem-se o controle imunológico que muitas vezes é restrito por questões econômicas e de acessibilidade através da vacinação que permite a inclusão de múltiplos antígenos que têm como alvo o combate ao carrapato e também a prevenção da transmissão de patógenos. Para isso, é importantíssimo o estudo e a adoção de metodologias fitoterápicas que correspondem a aquisição de plantas medicinais ou extratos vegetais, com aplicação das formulações à base de óleos essenciais (OEs), como princípios ativos que vêm encontrando grande eficiência no combate às pragas agrícolas e agentes etiológicos estudados (LOPES et al., 2013; VERÍSSIMO, 2015; SILVEIRA NETO et al., 2017).

Este procedimento busca primordialmente, amenizar a contaminação ambiental e a toxicidade dos animais e dos seres humanos, mas que ao longo do uso, encontram resistência dos parasitas. Para isso, torna-se fundamental o emprego de veículos com formulações seguras e eficientes produzidas a partir de OEs de ordem natural e de baixo custo como uma excelente alternativa viável economicamente e sustentável, com o intuito de diminuir os efeitos colaterais provocados pelo uso indiscriminado de acaricidas. Haja vista, que o uso de dispositivos multifuncionais como microemulsões a base de OEs incorporados à uma base saponificada configuram um produto de estrita inovação para aplicações agrícolas (OLIVO et al., 2013; CRUZ,

2017).

Sob essa perspectiva, dentre os OEs que possuem atividade efetiva de destaque contra agentes patogênicos tem-se o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA), conhecido popularmente como óleo do cravo da Índia, este por sua vez, é obtido pela extração das folhas e dos botões floríferos secos. Não obstante, os OEs em sua maioria apresentam importantes limitações como agravantes a serem sanados, nomeadamente como baixa solubilidade, a instabilidade na presença de luz, do calor, umidade ar e metais. Para tal, a utilização de sistemas estabilizadores ou formados por tensoativos, como, micelas, emulsões, microemulsões, lipossomas e cristais líquidos, podem ser um excelente meio para minimizar essas características limitantes dos OEs (FERREIRA, 2018; CHELLAPPANDIAN; VASANTHA-SRINIVASAN; SENTHIL- NATHAN, 2018).

Nesse cenário, o presente estudo teve como objetivo obter e caracterizar um dispositivo multifuncional inovador a base de microemulsões contendo o óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, dispersas em uma base saponificada desenvolvida através de uma reação de saponificação, visando obter aquisição de um sistema que em contato com o meio aquoso, permita a liberação do eugenol (princípio ativo do OESA), molécula responsável pelo controle de pragas agrícolas e de extensa ação acaricida, microbiológica, fungicida e virucida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obtenção e caracterização de um dispositivo multifuncional inovador a base de microemulsões contendo o óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, dispersas em uma base saponéica.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar composição do fitoingrediente microestruturado, ativo do produto carrapaticida em tela;
- Desenvolver base saponéica, matriz do sistema microemulsionado, no estado sólido;
- Avaliar eficácia carrapaticida dos produtos desenvolvidos contra *Rhipicephalus (B.) microplus*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos produtos desenvolvidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pragas agrícolas

As pragas agrícolas são caracterizadas como organismos que reduzem a produção das culturas, seja por atacá-las, por serem transmissores de doenças ou por reduzirem a qualidade dos produtos agrícolas. Para tanto, podemos dizer que um inseto ou ectoparasita se torna uma praga quando ele aumenta e se dissemina em população, ao ponto de ocasionar perturbações no desenvolvimento da lavoura, além de prejuízos econômicos, danos à saúde pública e desequilíbrios ao ecossistema (BLASSIOLI-MORAES et al, 2016; EMBRAPA, 2020) .

Nessa conjunção, salienta-se a importância do manejo integrado e adequado para o controle desses agentes invasores e produtores de grande desarmonia ambiental, a partir de diversos métodos de controle que devem ser selecionados com base em parâmetros técnicos de precisão e eficácia, padrões e estratégias econômicas, que preservam o ambiente. Os principais métodos que podem ser empregados no controle de pragas são: os culturais que consistem no emprego de práticas agrícolas normalmente utilizadas no cultivo das plantas objetivando o controle das pragas; controle biológico por intermédio da ação de inimigos naturais na manutenção da densidade das pragas em nível inferior àquele que ocorreria na ausência desses inimigos naturais (BORGES et al, 2017, 2017).

Nesse sentido, ressalta-se o controle químico por meio da aplicação de substâncias químicas que causam mortalidade no controle de pragas, metodologia essa que têm passado por diversos experimentos e estudos para torná-la mais sustentável e menos prejudicial à saúde e ao meio ambiente. Desse modo, torna-se imperioso a adoção de dispositivos multifuncionais e inovadores produzidos a partir de substâncias naturais, como os óleos essenciais do cravo-da-índia, que tem demonstrado atuação significativa no combate a essas pragas agrícolas (ERB et al, 2015; EMBRAPA, 2020).

Além disso, dispõe-se ainda do controle mecânico com o uso de técnicas que possibilitem a eliminação direta das pragas; e o controle físico que integra a utilização de elementos como fogo, drenagem, inundações, temperatura e radiação eletromagnética no controle desses agentes nocivos. Dessarte, o desafio do agronegócio brasileiro está na difusão de métodos sustentáveis conforme exposto acima, para o manejo de pragas, trazendo para o dia-a-dia do produtor as inovações tecnológicas e, assim, manter as cadeias produtivas competitivas, porém saudáveis no mercado (GRAÇA et al 2016; BORGES et al, 2017).

3.2 Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O *Rhipicephalus Boophilus microplus* é um ectoparasito de ciclo monoxeno hematófago, cujo principal hospedeiro é o animal bovino, utilizando um só hospedeiro em seu ciclo evolutivo, isto é, depende apenas de um único hospedeiro para a sua reprodução. Antigamente era denominado de *Boophilus microplus*, no entanto Murrell; Barker (2003) realizaram estudos e análises filogenéticas e o reclassificaram no gênero *Rhipicephalus* passando a se denominar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (EVANS, 1992; DAHER, 2012; VERÍSSIMO, 2015).

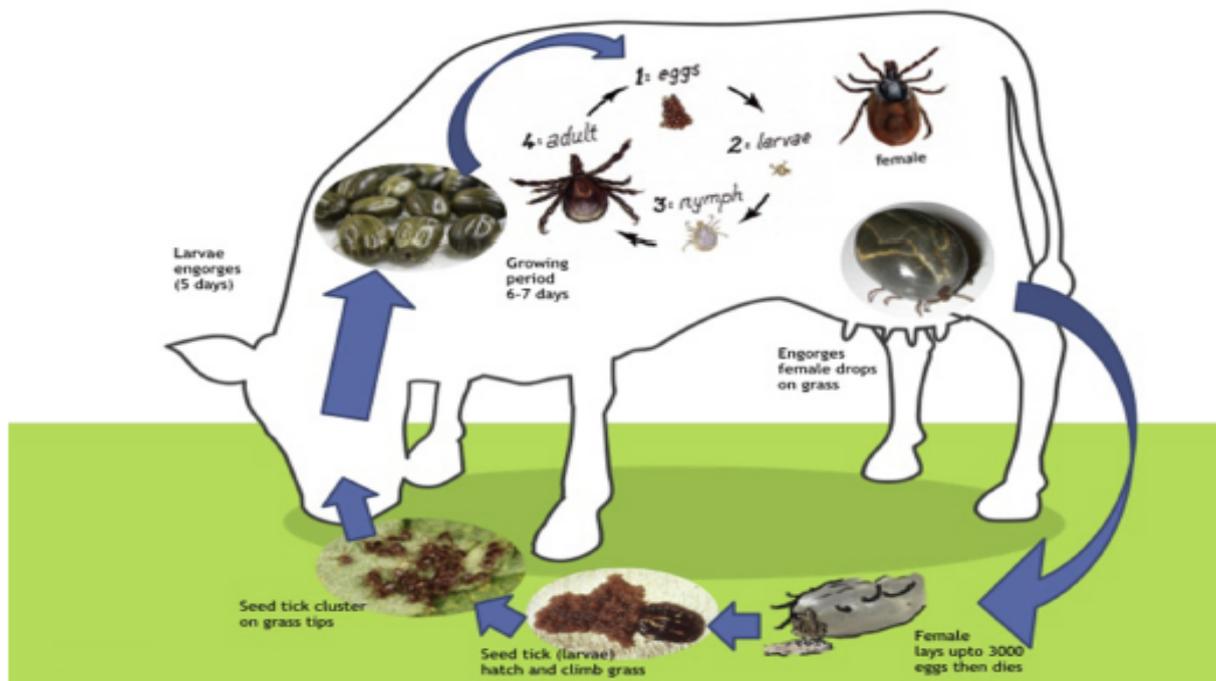
O gênero *Boophilus* nesta espécie foi mantido como subgênero facilitando a recuperação de publicações em que aparece com o antigo nome. Está amplamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais no globo terrestre, demonstrando-se persistente entre os paralelos 32° norte e 32° sul, exceto nos Estados Unidos da América, que conseguiu erradicar o parasito, e também em áreas muito altas ou muito áridas (EVANS, 1992; DAHER, 2012; VERÍSSIMO, 2015; SILVEIRA, 2017).

No Brasil, o principal método utilizado pelos produtores para o controle do carrapato bovino é o tratamento curativo, com produtos químicos sintéticos disponíveis no mercado, com destaque para a utilização de piretróides, organofosforados e amidinas, os quais atuam causando a morte das fêmeas ingurgitadas ou inibindo sua reprodução. Estes produtos químicos se apresentam como o padrão-ouro para obtenção de um melhor desempenho na produção bovina, porém, por muitas vezes, são administrados de forma equivocada, excessiva e desordenada (SHYMA, 2014; CHAGAS, 2016; CARDOSO, 2020).

3.2.1 Ciclo de vida do carrapato

No que se refere ao ciclo biológico do ectoparasita, na fase de vida livre a teleógina, ou seja, a fêmea fecundada, ingurgitada, repleta de sangue, desprende-se do bovino, alcança o solo onde procura um local abrigado, com elevada umidade em cerca de 70%, com temperatura ambiente de 27°C e escuro para realizar a postura de 100 até cerca de 7.700 ovos. Esse evento ocorre em aproximadamente dois a três dias após as teleóginas se soltarem, finalizando a evolução em duas semanas aproximadas. Por volta do sétimo dia de eclosão as larvas se tornarão infectantes por geotropismo negativo sobem nos pastos à espera do bovino. A fase de evolução da vida parasitária inicia-se quando a larva infectante se instala no hospedeiro passando a ser larva parasitária e se transformando em metalarva, não se alimentando durante esta fase (AGNOLIN, 2012; RECK, 2014; REGINATO, 2017; NAVA, 2019).

Figura 01. Ciclo biológico do *Rhipicephalus (B.) microplus* exibindo o tipo de comportamento monoxeno (um único ciclo de hospedeiro).



(Fonte da imagem: JAIN, 2020)

3.2.2 Controle do carrapato

Em primeira análise, o setor da pecuária bovina é um dos campos comerciais mais importantes do agronegócio brasileiro e que reforçam expressivamente a economia nacional, tornando-se a pecuária leiteira uma das atividades mais tradicionais do meio rural brasileiro, além da pecuária de corte, campo fulcral para a progressão econômica do país. Conforme censo de 2014 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o segundo maior rebanho de bovinos do mundo pertence ao Brasil, totalizando 212.34 milhões de cabeças. Nesse ínterim, a aplicação de carrapaticidas, com diferentes propriedades químicas e antiparasitárias, é a ferramenta estratégica mais utilizada para controlar os carrapatos de bovinos (BRASIL, 2014; ANUALPEC, 2015).

Diante disso, a maioria dos produtos dispostos para controlar as pragas, especialmente na agricultura, era constituída de compostos orgânicos e de extratos de vegetais, a exemplos desses

tem-se a nicotina e a rotenona. Na década de 40, observou-se uma brusca transição no processo de controle das pragas com a descoberta, por Paul Müller, das propriedades inseticidas do DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano). Decorrente do seu considerável potencial residual, o DDT foi amplamente apresentado e utilizado como inseticida e carrapaticida em bovinos. Todavia, este mesmo efeito resultou na restrição da sua utilização, por conta do seu acúmulo no meio ambiente, desequilibrando a flora e fauna e consequentemente a cadeia alimentar dos diversos seres vivos certamente expostos (RAMOS et al., 2018; PEREIRA, 2019).

3.2.3 Resistência aos carrapaticidas

Nos últimos anos, notadamente a resistência dos carrapatos aos princípios ativos dos diversos carrapaticidas vem aumentando de forma mais intensa, comprometendo a eficácia na aplicação de certas moléculas no manejo do controle dos ectoparasitos em diversas regiões de produção pecuarista. Estudos observacionais já demonstraram que o número de carrapatos que se desenvolvem em raças zebuínas, por exemplo, é menor do que em raças europeias, sugerindo que há uma possível probabilidade desse desenvolvimento ocorrer em raças bovinas resistentes (GASPAR, 2017; CARDOSO, 2020; LÉON, 2020).

Esta resistência está associada ao perfil de resposta do sistema imunológico dos hospedeiros, já que, em uma primeira infestação, o número de carrapatos que completa o ciclo é semelhante em todas as raças. O problema da resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas vem aumentando consideravelmente em todas as regiões onde ele está presente e que utilizam produtos químicos como principal recurso para o seu controle (GASPAR, 2017; CARDOSO, 2020).

Este fato pode ser observado in vivo, verificando-se o efeito dos compostos acaricidas sobre os carrapatos no hospedeiro, ou em laboratório, por meio da imersão in vitro de fêmeas ingurgitadas e larvas não alimentadas. No entanto, para facilitar o monitoramento global da resistência e fornecer uma base histórica para a comparação dos resultados dos testes, devem ser adotados métodos diagnósticos padronizados. Em vista disso e seguindo o conselho de especialistas, desde 1975, a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) tem recomendado a realização do Teste do Pacote de Larvas – TPL para investigação da resistência em cepas de campo do carrapato dos bovinos, especialmente para acaricidas organofosforados e piretróides sintéticos (JÚNIOR, 2014; TAYLOR, 2017; JAIN, 2020).

3.2.4 Doenças ectoparasitárias transmitidas no *R. Microplus*

O Brasil é um país reconhecido globalmente pelo elevado potencial desenvolvido no setor do agronegócio, principalmente no que concerne à atividade pecuária. No cenário atual, a bovinocultura configura-se como um dos principais setores a fortalecerem a economia estatal mesmo diante dos impactos desfavoráveis produzidos pelo contexto da pandemia do novo coronavírus, SARS-CoV-2, acumulando resultados positivos no âmbito de exportação, evidenciando um crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) nativo de 5% no final de 2020 (SANTOS, 2019; PAIVA, 2020; SILVA et al., 2021).

Entretanto, os impactos sofridos com a ação das doenças parasitárias causadas por carrapatos no campo da reprodução e criação de animais, principalmente de bovinos são extremamente prejudiciais à saúde dos animais, colocando em risco a própria saúde dos trabalhadores, comprometendo a segurança de produção alimentar reverberando perdas significativas para a economia. Em contrapartida, as estratégias de controle e prevenção, quando empregadas de maneira adequada, são consideradas fundamentais para o desenvolvimento dos sistemas de produção animal (ALMEIDA, 2019; SILVA et al., 2021).

3.3 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares procarióticos constituídos por membrana celular, parede celular e, em alguns casos, envelope celular. Podem ser divididas em duas categorias principais, as Gram positivas e Gram negativas. Existem três principais tipos morfológicos: esferas (cocci), hastes (bacilos) e espirais (espiilla). As bactérias utilizam inúmeros mecanismos de resistência contra a ação de antibióticos. Os mecanismos de resistência antimicrobiana se enquadram em quatro categorias principais: limitação da absorção de um medicamento; modificar um alvo de droga; inativar um medicamento; efluxo de droga ativa (PEREIRA et al, 2016; STINGHEL et al, 2022).

A resistência intrínseca pode limitar a captação, a inativação e o efluxo de drogas; os mecanismos de resistência adquiridos usados podem ser modificação do alvo da droga, inativação da droga e efluxo da droga. Nessa conjuntura, urge que estudos científicos sejam realizados para uma melhor investigação diagnóstica, para melhoramento terapêutico, utilizando compostos naturais principalmente os que são obtidos a partir dos óleos essenciais (JUTHANI-MEHTA et al, 2016; KAUFMAN et al, 2019).

3.3.1 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são microrganismos gram-positivos imóveis não produtores de esporos. A cepa mais patogênica dessa espécie é a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), que pode causar uma ampla variedade de doenças em hospitais e também na comunidade. *S. aureus* é um organismo comensal dos seres humanos e de outros animais e pode colonizar a cavidade nasal, oral, a pele e os tratos respiratório superior, urogenital inferior e gastrointestinal. Quando encontrado na flora humana normal de indivíduos saudáveis não costuma causar infecções na pele, mas ao entrar na corrente sanguínea ou em tecidos causam infecções potencialmente graves e de difícil tratamento devido ao surgimento de cepas multirresistentes (KAUFMAN et al, 2019; STINGHEL et al, 2022).

Esse microrganismo é considerado um patógeno humano oportunista que está frequentemente associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. As infecções mais comuns envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos. Algumas infecções por *S. aureus* são agudas e podem disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Ou ainda episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite (SINGER et al, 2016; PANCOTTO et al, 2019).

O tratamento de escolha para infecções estafilocócicas era a penicilina inicialmente. Na década de 50 e 60 surgiram os primeiros casos de cepas resistentes a esse antimicrobiano. Em 1960 um novo antibiótico, a metilina, uma penicilina semissintética, passou a ser utilizada para tratar essas infecções. Porém, seis meses após seu uso foram relatados os primeiros casos de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Estudos demonstram que o uso indiscriminado de antibióticos na medicina, na produção de alimentos para os animais e na agricultura tem contribuído para um aumento na resistência aos antimicrobianos em todo o mundo (SINGER et al, 2016; MOTA et al, 2018; PANCOTTO et al, 2019).

3.3.2 *Escherichia coli*

As *Escherichia coli* são bactérias gram-negativas em formato de bastonetes e pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São organismos comensais encontrados no intestino de vertebrados e colonizam o trato gastrointestinal dos bebês pouco tempo após o nascimento. A *E. coli* faz parte do grupo de coliformes fecais (coliformes a 45 °C) sendo considerada o mais específico

indicador de contaminação fecal e eventual presença de bactérias patogênicas (BRYAN et al, 2015; STINGHEL et al, 2022).

Vários fatores contribuem para sua disseminação no meio ambiente pois é excretada nas fezes e pode sobreviver nas partículas fecais, poeira e água por semanas ou meses, porém seu ambiente normal é o trato intestinal. As cepas comuns podem causar doenças em pacientes imunodeficientes ou com barreiras gastrointestinais rompidas. Por meio da aquisição de mecanismos de virulência, podem causar uma variedade de doenças entéricas e infecções fora do intestino, como no trato urinário, próstata e corrente sanguínea (ALVES et al, 2016, RODRIGUES et al, 2020).

A *E. coli* comensal, é aquela que faz parte da microbiota intestinal, não é patogênica e apresenta um importante papel fisiológico para o funcionamento do organismo. Existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecção intestinal em homens e animais, sendo denominadas de *E. coli* diarreiogênicas que são diferenciadas pela presença de fatores de virulência como adesinas, fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli enteropatogênica*, *E. coli enterotoxigênica*, *E. coli enteroinvasora*, *E. coli enterohemorrágica* ou *E. coli produtora* da toxina de Shiga (STEC), *E. coli enteroagregativa* e *E. coli aderente difusa*. Apesar de sua ampla distribuição e da sua comprovada participação como causa de diarreia humana, sua patogênese e via de transmissão não estão claramente estabelecidas (ANDRADE et al, 2016; CARMO et al, 2018).

3.4 Fungos

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haploides (homo ou heterocariontes), possuem parede celular contendo quitina e α -glucano. Não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos. Em primeira análise, um dos principais representantes dos fúngicos, as leveduras são fungos conhecidos por serem simbióticos com os mamíferos, são patógenos emergentes e causam problemas globais de saúde pública devido à resistência medicamentosa. Nesse cenário, alguns possuem a capacidade de aumentar a saúde imunológica e são inclusive utilizados como agentes probióticos. A possibilidade de resistência fúngica é uma preocupação de saúde pública devido à escassez de medicamentos antifúngicos. O desenvolvimento desses medicamentos tem sido um desafio para os pesquisadores devido à natureza eucariótica semelhante entre fungos e humanos (TORRES, 2018; JAMIU et al, 2021).

De maneira geral, todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfologicamente semelhantes a estas. Os fungos são agentes patogênicos que podem causar doenças infecciosas de grande importância clínica, podendo produzir sítios infecciosos superficiais ou profundos associados a altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados e/ou imunossuprimidos, como os pacientes que convivem com a Síndrome da Imunodeficiência (SIDA/AIDS) (GÓMEZ-GAVIRIA et al, 2020; STINGHEL et al, 2022).

3.4.1 *Candida krusei*

Espécies como a *C. Krusei* têm sido encontradas no intestino de indivíduos saudáveis indicando um risco de propagação preocupante, devido a sua resistência aos antifúngicos. Está é definida como uma levedura dimórfica ascomiceto, e pode causar infecções graves em pacientes imunocomprometidos, com malignidades hematológicas e em uso prolongado de terapias profiláticas. Embora *C. albicans* continue sendo a principal causa de candidíase, nos últimos anos um número significativo de infecções têm sido atribuídas à *C. krusei*. Essa mudança epidemiológica pode ser parcialmente explicada pelo aumento da resistência das espécies aos antimicrobianos (JRODEN et al, 2017; GÓMEZ-GAVIRIA et al, 2020; AMIU et al, 2021).

C. krusei é encontrada em uma variedade de habitats naturais, como no ar, esgoto, solo, alimentos como frutas, laticínios, carne, vinhos e cervejas. É um fungo amplamente distribuído na natureza e considerado um saprófito facultativo. Dotado de uma maior capacidade em colonizar superfícies inertes, como implantes e cateteres, em virtude da hidrofobicidade de sua superfície celular. Uma vez ligado a um substrato inerte, e se deixado intacto e com nutrição adequada, pode se multiplicar e colonizar as superfícies e formar biofilmes (QUEIROZ-TELES et al, 2017; TORRES, 2018).

3.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias não gordurosas, voláteis, produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e têm sido considerados fontes com grande potencial para a aquisição de substâncias biologicamente ativas, tendo propriedades distintas como, ação antimicrobiana, antitumoral, ação neuronal e inseticida. São classificados segundo a sua estrutura molecular em

monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois, aldeídos, ésteres, fenóis, éteres e óxidos, peróxidos, furanos, lactonas e ácidos, e, por sua atividade bioquímica, em grupos funcionais. Com o desenvolvimento da biotecnologia farmacêutica e medicinal o interesse pelos óleos essenciais têm crescido exponencialmente, vários estudos realizados demonstram que foram descobertos aproximadamente 3000 subtipos de OEs, tendo grande importância comercial para a cosmetologia, indústria alimentícia e farmacêutica, razão da sua grande abrangência terapêutica, atuando em diversos sistemas no corpo, como também na psique (BARROS, 2018; FERREIRA, 2018).

Para a obtenção desses óleos são utilizadas diversas técnicas, mas a principal e mais utilizada é a destilação por arraste de vapor d'água. Já a análise dos componentes dos óleos essenciais é realizada pela cromatografia gasosa, teste capaz de identificar os óleos, avaliar seus componentes e definir sua pureza. Os OEs tem como característica principal seu odor forte e aromatizante, são lipossolúveis, de considerável solubilidade em solventes orgânicos com uma densidade geralmente inferior a da água. Na maioria dos casos, são obtidos a partir de espécimes vegetais como, flores, folhas, galhos, cascas, brotos, sementes, ervas, madeira, frutas e raízes, podendo ser encontrados em países de clima tropical e climas quentes (WOLFFENBUTTEL, 2016).

3.5.1 Óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA)

A espécie vegetal *Syzygium aromaticum*, conhecida popularmente como cravo-da-índia, pertence à família das *Mirtaceae* e é uma planta originária do Extremo Oriente, localizada nas ilhas Molucas (Indonésia), sendo uma planta arbórea, com copa alongada que pode alcançar em média 8-10 metros. Possui um potente odor aromático, sabor ardente e característico, folhas ovais grandes que variam em comprimento de 7 a 11 centímetros, as flores são pequenas e de cor vermelha que se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais (BARROS, 2018; FERREIRA, 2018).

A introdução do cravo da Índia no Brasil, ocorreu em meados da época da colonização portuguesa, mais precisamente no Sul da Bahia, principal região de cultivo no período citado, tornando-se o estado de maior produção da especiaria no país. Possui ainda, botões florais que são componentes bastante consumidos como aromatizantes, para utilização culinária e na forma de espécime para chás, além disso apresenta propriedades carminativas e estimulante digestivo. Os principais produtos derivados do cravo da Índia na atualidade são os OE's puros ou produtos

derivados, seu principal constituinte é o eugenol, componente majoritário do óleo (AFFONSO, 2012; ASCENÇÃO, 2016; FERREIRA, 2018).

Devido a sua estrutura molecular, o eugenol possui propriedades antiinflamatória, cicatrizante, analgésica e inseticida eficaz no combate a pulgões, ácaros, carrapatos e pragas de artrópodes. No campo medicinal tem o papel fundamental no tratamento de náuseas, flatulências, indigestão e diarreia. As propriedades antibactericidas do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* fornece também a capacidade de aplicação como anestésico e antisséptico para o alívio de dores odontológicas. Além dos efeitos citados, os extratos de cravo da índia reduzem o número de colônias bacterianas de *Escherichia coli* e outras bactérias durante a armazenagem de sucos, leites e chás (ASCENSÃO, 2016; BATIHA, et al, 2020).

Outrossim, o OESA apresenta limitações, como instabilidades a altas temperaturas, pode sofrer influência direta da umidade e do ar, podendo ser facilmente oxidado em contato com a luz. Outra condição limitante importante, é a baixa solubilidade em solvente universal, todavia, é solúvel em solventes orgânicos, e quando exposto ao ar, mesmo à temperatura ambiente, sofre evaporação. Diante disso, sistemas estabilizados por tensoativos podem ser uma alternativa para minimizar tais fatores limitantes, uma vez que agem como carreadores de moléculas insolúveis (BHOWMIK, 2012; BATIHA, 2019; BATIHA, 2020).

3.6 Eugenol

O eugenol é composto extraído do cravo-da-índia e responsável pela expressão do seu aroma. O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) corresponde ao botão seco da flor da família das mirtáceas, encontradas principalmente na Indonésia, Índia e Madagascar. A extração dos compostos voláteis a partir das folhas, caules e botões florais do *Syzygium aromaticum* apresenta como principal constituinte (70 a 90%) da sua composição química o eugenol (CORTÉS;ROJAS et al., 2014).

É um monoterpeneo ($C_{10}H_{12}O_2$), volátil da classe dos fenilpropanóides, que se apresenta na forma líquida à temperatura ambiente e por ser um óleo apresenta densidade de 1.066 g/mL, sendo pouco solúvel em água. Além disso, possui aroma característico de cravo da índia, coloração amarela e sabor acre. É fotossensível e muda de cor e consistência se exposto ao ar, escurecendo e tornando-se mais espesso. Esse fenilpropanóide é amplamente utilizado na conservação de produtos devido a suas propriedades antioxidantes e está presente nas

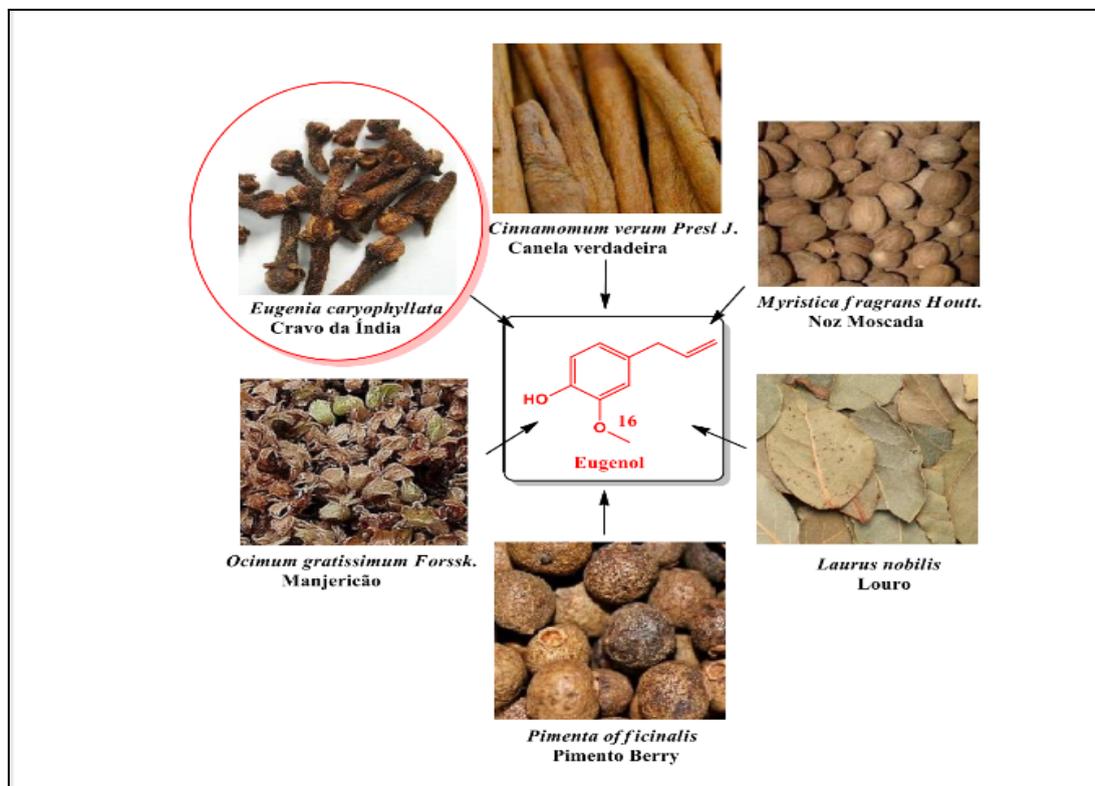
formulações de vários produtos de uso diário como desodorantes, fio dental, perfumes, maquiagens, shampoos, produtos de limpeza e mesmo em alimentos como agente flavorizante (IARC, 1985; CHATTERJEE; BHATTACHARJEE, 2015).

Em virtude de sua ampla distribuição e utilização, o eugenol passou a ser alvo de estudos para confirmar suas atividades farmacológicas e avaliar sua capacidade de provocar efeitos tóxicos. Alguns fenilpropanóides, incluindo o eugenol, apresentam atividade antioxidante, úteis na prevenção de danos celulares causados por radicais hidroxil, peroxil e superóxido e são empregados na composição de diversos cosméticos (SANTOS et al., 2014; RESENDE et al., 2017).

Dentre os óleos utilizados, o óleo essencial de cravo-da-índia se destaca como substituto de conservantes alimentares sintéticos devido a sua propriedade antimicrobiana, a qual está atribuída a presença do seu composto majoritário, o eugenol. Neste sentido, o uso do eugenol de forma isolada tem sido observado em diversos estudos e constatado a sua eficácia contra as principais bactérias contaminantes de alimentos, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (IRKIN e ESMER, 2015; RESENDE et al., 2017)..

Além disso, é destacada que a ação antimicrobiana do eugenol é mais eficaz contra cepas Gram positivas como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Além da propriedade antibacteriana, o eugenol apresenta diversas atividades, como: anti-inflamatória, antioxidante, modulador de respostas imunes, anticarcinogênica, cardiovasculares, antinocicetiva e anestésica local. Podem ser destacadas também atividade espasmolítica, antisséptica, anti-helmíntica em ruminantes, relaxante muscular e antipirética (SANTOS et al., 2014).

Figura 02 - Estrutura química e as principais espécies vegetais que sintetizam eugenol, em seus óleos essenciais.



Fonte: XAVIER, 2017.

3.6.1 Mecanismo de ação do Eugenol e do Óleo essencial cravo da Índia

O mecanismo de ação desenvolvido pelo eugenol baseia-se diretamente na formação e eliminação de eugenol. Assim como o óleo essencial de cravo-da-Índia, estudos têm demonstrado a fundamental capacidade de eliminação de radicais livres pela ação do eugenol de forma isolada. Foi relatado que este composto é capaz de inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e hidroxila radical de maneira dependente das concentrações utilizadas. Porém, à medida que a concentração do eugenol foi elevada, ocorreu paralelamente a formação de radicais livres, indicando uma atividade pró-oxidante a partir deste estudo (MODJINO et al, 2016; NIELSEN et al, 2017).

Os isômeros do eugenol, como o isoeugenol, também foram testados como agente antioxidante por meio da peroxidação lipídica mediada pelo ferro e da auto-oxidação do Fe²⁺. As pesquisas encontradas na literatura também nos trazem resultados que indicam a eliminação de óxido nítrico e forte poder redutor do eugenol, bem como um efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida por N-metil-D-aspartato (KHALIL et al, 2017; et al RAJPUT et al, 2018).

O eugenol apresenta ação anti-inflamatória devido a sua capacidade de inibir a síntese de prostaglandinas e quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos. Também é visto que esta substância é capaz de inibir a ativação do fator nuclear-kB induzida pelo fator de necrose tumoral. Além disso, alguns estudos relatam que o eugenol apresentou ação anti-inflamatória por bloquear a atividade da ciclooxigenase em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo. A redução da inflamação por diminuir o fator de necrose tumoral e atingir neutrófilos durante a infecção pulmonar em animais é outro exemplo desta propriedade do eugenol. Ademais, foi identificado a eficiência deste composto em proteger a disfunção celular de macrófagos induzida por produtos químicos e equilibrar os mediadores pró/anti-inflamatórios em macrófagos peritoneais de camundongos (WAN et al, 2016; KARYMATHIL et al, 2016; MAK et al, 2019).

3.6.2 Atividade antiparasitária

As plantas produzem em seu metabolismo secundário substâncias tóxicas aos nematóides. O eugenol é um exemplo de substância com potencial nematicida, caracterizando-se como uma matéria-prima para a produção de nematicida natural. Além da ação nematicida, estudos indicam o potencial anti-giardial, antileishmania, tripanocida e antimalárico do eugenol, sendo o último em concentrações mais altas do composto. A atividade anti-parasitária do

eugenol citadas nos estudos ocorreram por meio de alterações morfológicas que englobaram modificações na forma celular, presença de precipitados no citoplasma, vesículas autofágicas, entre outras (MACHADO et al; 2011; EL-MAAT et al, 2016; XAVIER, 2017).

No combate da leishmaniose o eugenol (100 a 1000 µg/mL) se mostrou eficaz na restrição do crescimento de *Leishmania amazonensis*, causando alterações morfológicas como colapso da membrana interna e inchaço. Esta atividade também foi observada em acetilados de eugenol, os quais apresentaram atividade contra a leishmaniose superior à forma contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum chagasi*. Ainda no que se refere a atividade antiparasitária do eugenol, estudos in vitro mostraram que o eugenol foi ativo como anti-giardial, tripanossomicida, leishmanicida como citado acima, e antimalarial, sendo essa última em maior concentração (MONTESCHIO, 2017; MEHER, 2018;).

3.6.3 Atividade antifúngica

Os mecanismos do eugenol que ditam a sua atividade antifúngica englobam a alteração da parede celular do microrganismo, bem como o enfraquecimento do sistema de defesa através da lipoxigenase mediada por cascata de radicais livres, o que resulta em lesões na membrana. Além disso, estudos demonstram que a interferência com as permeases de aminoácidos auxilia para a atividade fungicida do eugenol. Efeitos sinérgicos entre o eugenol e outros compostos também foram observados pelos pesquisadores, resultante da influência na síntese da parede celular do microrganismo ou da destruição da parede celular (RAJA et al., 2015; KARUMATHIL et al., 2016; MAK et al., 2019).

Em testes experimentais realizados em fungos a lista de atuação é ainda mais extensa. O eugenol mostrou-se ainda mais potente do que alguns antimicrobianos sintéticos, contra as espécies de *Aspergillus*, *Alternaria alternata*, *Botryodiplodia theobromae*, *Cladosporium herbarum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Por fim, vários outros estudos têm confirmado a atividade antifúngica do eugenol contra organismos patógenos, como *A. ochraceus*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum*, *Tricophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (XAVIER, 2017; MAK et al, 2019).

3.6.4 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do eugenol, *in vitro* e *in vivo*, é largamente estudada e reconhecida por uma diversidade de autores. Nesse cenário, este composto exibe uma importante ação antimicrobiana contra várias cepas bacterianas, tanto Gram-positivas (*Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella colérica*) quanto Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*) (RAJA et al, 2015; EL-MAAT et al, 2016).

O mecanismo antibacteriano do eugenol ocorre por meio de eventos que promovem a indução da lise celular das bactérias, que resultam na danificação da sua parede celular e da membrana, causando extravasamento proteico e lipídico. A inibição de cepas resistentes (MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e MSSA- *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (oxacilina) por meio da ação do eugenol também foi eficazmente identificada. Por consequência, a aplicação do eugenol em combinação com outras substâncias (ex. cinamaldeído) destaca o efeito sinérgico reconhecido contra diversas cepas bacterianas, como *S. pneumonia*, *L. innocua*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, entre outras (RAJA et al., 2015; FERREIRA, 2018; MAK et al., 2019).

3.7 Toxicidade do Eugenol

Devido a sua ampla utilização e importância farmacológica, o eugenol tem sido estudado quanto a sua toxicidade, a fim de determinar uma dose segura de uso. Em 1950, a dose letal capaz de causar morte em 50% dos animais (DL50) por via oral foi estimada em 1930 mg/kg e resultou em edema pulmonar, lesões renais, hepáticas e dormência nos membros inferiores dos ratos. Alguns anos depois, Lavoie et al. (1986) estimaram a DL50 por via intratecal do eugenol em solução de emulphor EL-620 diluído em NaCl à 10% em ratos (DL50 = 11 mg/kg) e hamsters (DL50 = 17 mg/kg), que exibiram também sinais de toxicidade nos pulmões, revelando pontos hemorrágicos, edema pulmonar, broncopneumonia e enfisema pulmonar agudo (FARMAKOLOJIK, 2017; RESENDE et al 2017).

A fim de compreender como o eugenol possivelmente seria metabolizado pelo organismo, Thompson; Constantin-Teodosiu; Moldéus relataram que a metabolização ocorria no citocromo P450, presente em hepatócitos isolados de ratos onde, identificou-se a formação de um metabólito intermediário de significativa toxicidade, posteriormente denominado de quinona

metide. Adicionalmente, McDonald; Heffner administraram eugenol (0,1 mM) por via intravenosa em coelhos e relataram aumento na formação de edema, associado a toxicidade pulmonar como um mecanismo dependente de oxidação, semelhante ao previamente proposto por Thompson; Constantin-Teodosiu; Moldéus (THOMPSON et al, 1989; MNAFGUI et al, 2015; MONTEIRO et al, 2017).

Além disso, numa toxicidade aguda, outros estudos foram realizados para avaliar os possíveis efeitos causados pela administração em doses repetidas do eugenol. Desse modo, verificou-se que a administração intramuscular do eugenol nas doses de 20 e 30 µg/100g de massa corporal em ratos Wistar machos durante 10 dias produziram elevações de 22 e 71% dos níveis de fosfatase alcalina. Essas mesmas doses induziram um aumento expressivo dos níveis enzimáticos dos hepatócitos de 23 e 99%, respectivamente, para alanina aminotransferase e 55 e 92% para aspartato aminotransferase, quando comparadas ao grupo controle, evidenciando efeito hepatotóxico (SAID et al 2017; MARINHO, 2018; SILVA et al, 2018).

Num outro cenário, sapos africanos da espécie *Xenopus laevis* foram expostos ao eugenol (375 µL/L) por banho de imersão durante 24 horas e apresentaram lesões nos rins, enquanto que animais expostos durante 72 horas tiveram efeitos mais pronunciados hepáticas e pulmonares. No entanto, com a interrupção da exposição por duas semanas consecutivas, as lesões foram reversíveis, indicando que o uso prolongado do eugenol pode ser tóxico para a homeostasia do organismo (BANSODE, 2017; MARINHO, 2018; ROCHA et al, 2018).

Diante disso, o eugenol durante período embrionário reprodutivo foi pouco estudado e seus efeitos indicam ação tóxica para embriões e fetos, porém não foram avaliados os índices reprodutivos e teratogenicidade durante o período de organogênese. Não obstante, torna-se medular compreender como esse óleo essencial pode interferir durante as fases de formação e maturação de órgãos, lactação e comportamento neuromotor dos fetos, a fim de complementar os estudos toxicológicos reprodutivos e estabelecer a segurança de uso desse composto (JÚNIOR, 2016; TALEUZZAMAN et al, 2017).

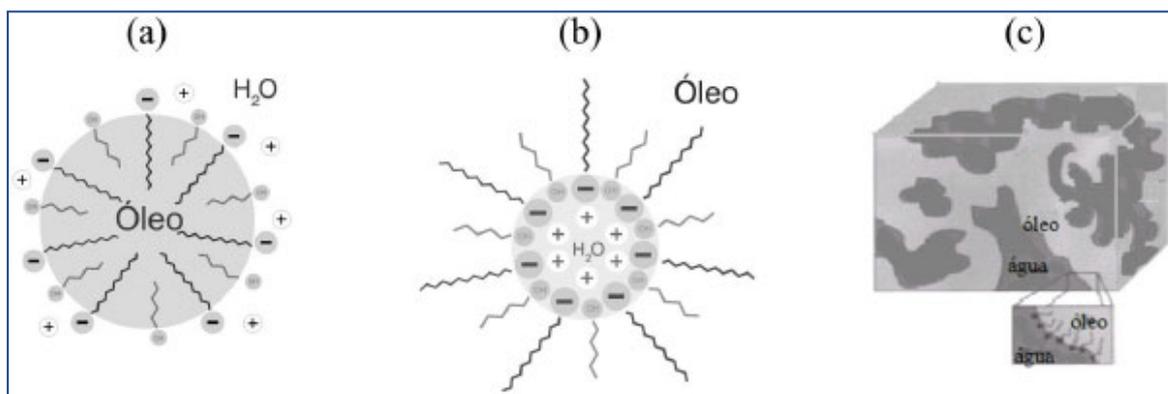
3.8 Microemulsão

A Microemulsão (ME) é uma dispersão do tipo coloidal monofásica, com baixa viscosidade, definida como um sistema isotrópico e que é termodinamicamente estável, as microemulsões podem ser caracterizadas como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente da ordem de 100 Å. As ME foram introduzidas na literatura científica por Hoar e Schulman, em 1943, ao descreverem sistemas transparentes formados de modo espontâneo

quando o óleo e a água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado a um álcool de cadeia média. Entretanto, o termo microemulsão foi de fato aplicado e utilizado somente no final da década de 1950 por Schulman e colaboradores (DAMASCENO, 2012; PORTO, 2020).

Um composto microemulsionado, será estabelecido a partir de um sistema translúcido, contendo duas soluções imiscíveis, comumente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos, frequentemente combinado com cotensoativo, localizados na interface entre óleo e água. Do ponto de vista farmacêutico, as ME podem ser definidas como emulsões transparentes, onde acredita-se que durante a obtenção de um sistema microemulsionado o papel do cotensoativo é reduzir a tensão interfacial otimizando a estabilização termodinâmica das gotículas da fase interna da microemulsão (SILVA et al, 2015; TAVARES, 2019).

Figura 03. Representação esquemática das três microestruturas de microemulsões mais comumente encontradas: (a) ME óleo em água (O/A) e (b) ME água em óleo (A/O), empregando surfactante aniônico e álcool de cadeia média, e (c) ME bicontínua.



Fonte: SILVA et al, 2015.

Nessa ocasião, as MEs apresentam características importantes que diferem das emulsões convencionais por meio do tamanho das suas partículas, a primeira faixa de medição apresenta de 5 a 140 nm, enquanto que o diâmetro das gotículas de uma emulsão é da ordem de 0,1 μm a 100 μm . É expressa por uma camada mononuclear, constituída por moléculas anfifílicas que envolvem as microgotículas com uma delicada membrana. Tais sistemas, em geral, formam-se automaticamente, apresentando conglomerados estruturais muito menores do que o comprimento de onda de luz, que é a razão para a sua propriedade de transparência. Nesse cenário, faz-se precípua compreender a lei da termodinâmica, que é determinada pela energia livre de Gibbs (G)

que precisa se tornar negativa para a formação espontânea de uma microemulsão termodinamicamente estável. Em condições onde a temperatura é constante, esse fenômeno pode ser determinado conforme a equação seguir: $\Delta G = \gamma_i \Delta S$ (SASIVIMOLPHAN et al, 2012; CHAMIEH et al, 2015).

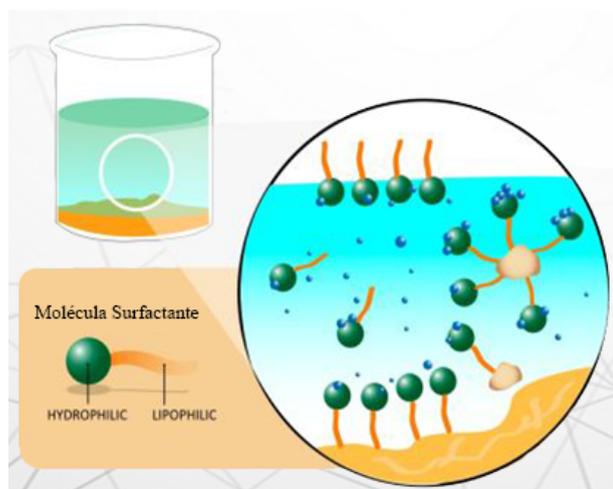
Sob essa perspectiva, as MEs podem classificar-se em: óleo em água (O/A), onde nesse estado as gotículas de óleo são envolvidas por uma região contínua em água; em microemulsão água em óleo (A/O), na qual gotas de água são envolvidas por óleo e de maneira duplamente contínua, aonde haverá a formação de uma estrutura não esférica com aspecto de gotícula. Três mecanismos irão evidenciar essa formação, como os seguintes descritos: o primeiro por meio do aumento gradativo do volume da fase interna do sistema, o segundo mecanismo será através da migração de O/A para A/O ou de A/O para O/A e quando o volume das duas fases ficarem próximos. No entanto, o tipo de estrutura das MEs irá depender da natureza dos componentes (tensoativo, cotensoativo, água e fase oleosa) e das condições termodinâmicas envolvendo estritamente a temperatura e a pressão (SILVA et al, 2015; STETEFELD et al, 2016).

3.8.1 Tensoativos e Cotensoativos

O Tensoativo é um tipo de molécula que apresenta uma parte estrutural com característica apolar ligada a uma outra parte com característica polar. Dessa forma, esse tipo de molécula é polar e apolar ao mesmo tempo. Os tensoativos, também chamados de surfactantes, são caracterizados como substâncias naturais ou sintéticas. O grupo polar é constituído pelos átomos de oxigênio, enxofre, nitrogênio ou fósforo (O, S, N, P), como parte de um grupo funcional como carboxilato, sulfonato, sulfato, amônio, fosfato, etc (SOUZA et al., 2016; EVONIK, 2020).

Grupos polares não-iônicos como hidroxila (-OH) ou éter (-O-) não são muito polares e justificam a sua ocorrência diversas vezes para formar um grupo polar adequado, como poliálcool ou poliéster. Já o grupo apolar é composto principalmente por hidrocarbonetos do tipo alquila ou alquila-arila com cerca de 12 a 20 átomos de carbono. Sua principal finalidade é agir como conciliador entre compostos sem afinidade, como a água e o óleo, alterando a sua tensão interfacial (SOUZA et al., 2016; BRUMANO et al,2016) (figura 04).

Figura 04: Tensoativos, molécula surfactante.



Fonte: SEO, Live, Entendendo os surfactantes: abordagem teórica, 2017.

Os tensoativos podem ser classificados em três tipos: iônicos (aniônicos, catiônicos e anfóteros, também chamado de zwitteriônicos) e não iônicos. Os iônicos são aqueles que possuem um ou mais grupos funcionais, que em solução aquosa se dissociam em íons carregados positivamente ou negativamente na superfície ativa. Existem muitas moléculas classificadas como tensoativos aniônicos (EVONIK, 2020; BASF, 2021).

Pode-se alterar a parte apolar com mudanças na cadeia carbônica e a parte polar com outros grupos aniônicos como o sulfato, o sulfonato e o fosfato. Já os tensoativos não-iônicos não formam íons em solução aquosa, já que os grupos hidrofílicos são formados por grupos polares não ionizáveis. Os tensoativos anfóteros são as moléculas orgânicas cujo grupo hidrofílico pode carregar-se negativamente ou positivamente, ou não estar carregado, dependendo do pH do meio que se encontra (PATEL et al,2017; EVONIK, 2020; BASF, 2021).

A solubilidade em água de um tensoativo é dada pela existência de cargas na sua parte polar. Quanto mais carga tiver um tensoativo, mais solúvel ele será em água, não importando se as cargas são negativas ou positivas (já que a água apresenta as duas cargas). O aumento da concentração do tensoativo reduz a tensão interfacial até um valor determinado, isto é, para cada tipo de tensoativo existe uma concentração na qual todas as superfícies já estão ocupadas e a quantidade de tensoativo excedente atinge uma concentração mínima necessária para o início de formação de micelas. Essa concentração, portanto, é chamada de concentração micelar crítica (CMC). A CMC depende do pH, temperatura, força iônica e estrutura do tensoativo, favorecendo a formação de diferentes estruturas de escala macroscópica e microscópica, tais como as MEs, cristais líquidos e emulsões (RUB et al, 2016; EVONIK, 2020).

A literatura científica evidenciou que a adição de um cotensoativo diminui o tamanho estrutural das gotículas, ampliando as regiões microemulsionadas. Dessa maneira, a dimensão das gotículas é extremamente afetada pela mistura de tensoativo associada ao cotensoativo dentro do sistema, reverberando numa tendência à diminuição do tamanho, aumentando a sua concentração, o que forma um sistema opticamente transparente alcançando o aspecto translúcido. Isso se deve ao fato de que a mistura de tensoativo com um cotensoativo apresenta-se mais eficiente na redução da tensão interfacial entre óleo-água, conseqüentemente a redução máxima do tamanho das gotículas da fase interna. Como exemplos, destacamos alguns dos principais cotensoativos, descritos na literatura, tem-se o etanol absoluto, álcool isopropílico e o propilenoglicol (BRUMANO et al,2016; Ali et al, 2016).

Ademais, uma das alternativas que podem ser propostas para a quebra da emulsão está na aplicação de sistemas microemulsionados, dispersos termodinamicamente estáveis, monofásicos, isotrópicos e com diminuída viscosidade, que constitui uma aparente solubilização espontânea de dois líquidos (polar e apolar), na presença de um tensoativo e em sua maioria um cotensoativo. E, por possuírem um grande potencial de solubilização tanto de substâncias polares quanto apolares, esses sistemas demonstram bastante eficiência para o estudo em questão (KANOKKARN et al, 2017; Danov et al, 2019).

Deste modo, é importante citar que um cotensoativo que compõe uma microemulsão é geralmente um álcool e apresenta um grupo polar hidrofílico e um outro grupo apolar hidrofóbico, que define a cadeia carbônica. E essa estrutura, explicitamente interfere no tamanho e na forma da região correspondente de microemulsão. Estudos evidenciam que a utilização de álcool com cadeias carbônicas maiores produzem a região de microemulsão. Todavia, no Brasil existe uma cadeia produtiva consolidada de etanol, sendo produzido em larga escala e com preços de mercado incentivados pelo Programa Nacional de Álcool (Proálcool). Assim, torna-se interessante o uso deste elemento como cotensoativo a fim de reduzir os custos de preparação e melhoramento das microemulsões (FIEBER et al, 2018; GAUDIN et al, 2019; CARVALHO et al 2019).

3.8.2 Diagrama de fases pseudoternário

Os diagramas de fases (DF) podem ser descritos como ternários (DFT) (formados por três constituintes) ou pseudoternários (DFPT) (formado por mais de três constituintes) e são representados por triângulos equiláteros, cujos lados são usados como eixos, correspondentes aos

constituintes. A representação gráfica dos sistemas de microemulsão com quatro constituintes torna-se mais fácil quando é fixada uma razão entre dois componentes, geralmente cotensoativo/tensoativo, obtendo-se um sistema de três pseudo-componentes (água, óleo e a mistura cotensoativo/tensoativo) (CUNHA, 2013; TIBURTINO, 2015).

Os diagramas pseudoternários representam cortes axiais nos diagramas quaternários, onde se obtêm os diagramas triangulares em que um dos vértices representa a mistura de dois componentes geralmente, a uma razão constante. Geralmente, a proporção de cada componente é representada pela porcentagem de peso total da formulação e, assim, cada vértice corresponde a 100% do componente indicado. Desta forma, os diagramas são ferramentas capazes de identificar cada região e facilitar o trabalho dos pesquisadores (CARVALHO, 2009; SILVA et al, 2009; CUNHA, 2013).

A construção de diagramas de fase é uma ferramenta fundamental para a obtenção de sistemas microemulsionados, pois descreve em que condição experimental é possível se obter as regiões limites de transição entre emulsões, as separações de fases e as microemulsões O/A e A/O. Geralmente, as microemulsões são formadas por quatro componentes (água, óleo, tensoativo e cotensoativo), o que torna apropriada a utilização do diagrama de fases pseudoternário DFPT, que difere do diagrama ternário convencional pelo fato de o tensoativo e o cotensoativo estarem agrupados como um único componente (CUNHA, 2013; GUIMARÃES, 2013; SYED & PEH, 2014; TIBURTINO, 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Tensoativos não iônicos nonilfenol etoxilado - Renex 95 e dietanolamina de ácido graxo de coco - Amida 60 (casa da química). Óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA); adquirido comercialmente pela empresa CERRADO ESSENCIAL LTDA, Água ultrapurificada obtida através do sistema Milli-Q®.

4.2 Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química do Fitoingrediente Microestruturado.

4.2.1 Diagrama de fases pseudoternário para seleção da composição da microemulsão (fitoingrediente microestruturado)

O cenário produzido para a obtenção das microemulsões por meio do diagrama de fases, foi construído em temperatura ambiente (cerca de 25°C), visando a emulsificação espontânea, pela técnica de titulação. Com o intuito de obtê-las, a base do OESA utilizou-se uma combinação de tensoativos/cotensoativos (T/C) em busca de formulações estáveis misturando-as aos tensoativos (Renex e Amida 60), aos componentes da fase oleosa (OESA) e da fase aquosa (água ultrapurificada obtida em aparelho Milli Q). Esse método permite a identificação de quais faixas de concentração com formação de microemulsões (ME) à temperatura de 25°C. (PATEL et al., 2016; SHAH et al., 2019),

À mistura de Tensoativo e Cotensoativo (T/Co-t) na proporção de 3:1 foi acrescentada a fase oleosa e homogeneizada por agitação magnética, à temperatura ambiente nas seguintes proporções de fase oleosa e T/Co-t: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, onde cada proporção corresponde a um ensaio, formando, assim, 9 ensaios. Em cada ensaio foram feitas titulações com água ultrapurificada, adicionando 1000µl gota a gota, sob agitação magnética e registrando as mudanças de aspecto visual a cada 3 minutos, como também a observação de efeito *Tyndall*, com uso de feixe de luz com termômetro de infravermelho.

4.2.2 Seleção da composição da microemulsão: fitoingrediente microestruturado.

Essa etapa foi desenvolvida e aplicada a partir das regiões de ME, que foram selecionadas em pontos distintos no diagrama, com a finalidade de abranger toda a região selecionada (ME com diferentes proporções de componentes). Os testes de caracterização foram realizados com amostras de ME recém-preparadas (48h de antecedência) no Laboratório de tecnologias (LABTEC), campus Ceilândia (FCE/UnB), e no Laboratório de Tecnologias de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), na Faculdade de Saúde, no campus Darcy Ribeiro (FS/UnB)

4.3 Caracterização das microemulsões

As microemulsões foram caracterizadas considerando-se os parâmetros: aspectos organolépticos, presença de efeito *Tyndall*, índice de polidispersão (PDI), diâmetro hidrodinâmico médio de gotículas da fase interna, potencial Zeta e potencial hidrogeniônico (pH).

4.3.1 Dispersão Coloidal

Para classificação da dispersão coloidal nas microemulsões, foi utilizado um termômetro digital infravermelho, incidindo feixe de luz nas amostras para a observação do efeito *Tyndall*, durante a titulação com água ultrapurificada.

4.3.2 PDI e Diâmetro Hidrodinâmico Médio das Gotículas

Para as respectivas análises em tela, diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas e Índice de Polidispersão (PDI), foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmica. As análises foram feitas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA), as amostras foram diluídas em água ultrapurificada (Milli-Q), e aproximadamente 1000µl de amostra foram inseridas em cubeta apropriada para a realização das medidas, em triplicata, em temperatura ambiente (25 °C).

4.3.3 Potencial Zeta

O potencial Zeta foi analisado por intermédio da determinação da mobilidade eletroforética das gotículas, através do mesmo equipamento utilizado para caracterização dos parâmetros anteriores, Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA). As amostras foram diluídas em água.

4.3.4 Mensuração do potencial hidrogeniônico - pH

O pH das ME foi mensurado a partir da técnica de inserção direta do eletrodo próprio para amostras semissólidas, com acoplamento ao potenciômetro digital (Digimed, modelo DM-22), previamente ajustado e calibrado com as soluções tampão pH 4,00 e 7,00 à temperatura 25°C.

4.4 Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química do Dispositivo Inovador – Tabletes Saponêicos Contendo Fitoingrediente Microestruturado

4.4.1 Produção da base do dispositivo inovador – base saponêica

Para a obtenção da base saponêica, foi feita a reação de saponificação através da reciclagem de óleo alimentício misturado a solução aquosa de base forte (hidróxido de potássio), durante 30 minutos, à temperatura ambiente. O produto obtido (sabão bruto) foi submetido a diferentes processos de secagem, o uso de estufa de secagem, Liofilizador (marca, país), com amostra previamente congelada à -80oC.

4.5 Avaliação biológica *in vitro*

4.5.1 Avaliação acaricida através do teste de imersão de adultas (TIA)

Foram coletadas manualmente aproximadamente 450 fêmeas ingurgitadas de carrapatos, diretamente de bovinos das raças zebuínas, naturalmente parasitados em vacas do centro de tecnologias para raças zebuínas leiteiras (CTZL), isentos de tratamento parasiticida por, pelo menos, 30 dias. A coleta foi realizada na EMBRAPA Cerrados, DF 180, Recanto das Emas, Brasília-DF.

As teleóginas coletadas foram acondicionadas em vasilhames plásticos, limpos e aerados, para o transporte até o Laboratório de Tecnologias da Faculdade de Ceilândia (LABTEC/FCE/UnB). As fêmeas ingurgitadas de carrapatos foram lavadas em água corrente limpa, seca com papel absorvente e selecionada quanto ao seu vigor, motilidade e peso, antes de serem distribuídas em placas de Petri para formar grupos homogêneos com dez teleóginas. Técnica utilizada por Drummond e colaboradores (1973).

Para a realização do teste de carrapaticida foi utilizado um produto comercial como controle positivo (Triatox®), água destilada como controle negativo, fitoingrediente microestruturado (ME2), óleo essencial (OESA), e a base saponéica. Além dos testes com os componentes isolados, foi realizado o experimento com a mistura de tensoativo e cotensoativo (T/Co-t), componentes da microemulsão, Renex e Amida 60, na proporção 3:1.

Ocorreu a seleção de 30 teleóginas, apresentando tamanhos e atividades semelhantes, sendo divididas em três grupos, contendo 10 teleóginas em cada. O grupo A foi tratado com água destilada (controle negativo), o grupo B foi tratado com solução de Triatox® conforme indicações do fabricante, o grupo C foi tratado com o fitoingrediente microestruturado (ME2), o grupo D foi tratado com OESA, o grupo E com a base saponéica, e o grupo F foi tratado com (T/Co-t, 3:1).

As teleóginas permaneceram imersas nos tratamentos descritos previamente durante 5 minutos. Após a imersão, as fêmeas foram secadas em papel absorvente, acondicionadas em placas de Petri, dotadas de fita dupla face, e fixadas na posição dorsal. Cada grupo foi devidamente identificado e mantido em câmara climática com temperatura ambiente (25°C e 70% UR), por 18 dias. Todos os grupos foram testados em triplicata. Para a avaliação da eficácia acaricida foram empregadas as equações 1 e 2 descritas por Drummond e colaboradores (1973).

$$\text{Eq. 1.} \quad ER = \frac{(\text{Movos} \times \% \text{Eclosao} \times 20.000^*)}{Mfemeas}$$

Onde, *ER* corresponde a Eficiência Reprodutiva, *Movos* é a massa dos ovos, *Mfemeas* é a massa das fêmeas

e 20.000 Número de larvas por 1 grama de ovos.

$$\text{Eq. 2. } EP = \left[\frac{(ER_{\text{controle}} - ER_{\text{produto}}) \times 100\%}{ER_{\text{controle}}} \right]$$

Onde, EP corresponde a Eficiência do Produto, ER_{controle} é a Eficiência Reprodutiva do Controle negativo e ER_{produto} é a Eficiência Reprodutiva do produto em teste.

A eficácia de cada tratamento foi calculada com base na ER do grupo controle negativo água destilada estéril. Para a interpretação dos resultados, foram considerados como eficientes, os tratamentos com eficácia mínima de 95%, conforme legislação pertinente para a comercialização de carrapaticidas no Brasil ((BRASIL,1997).

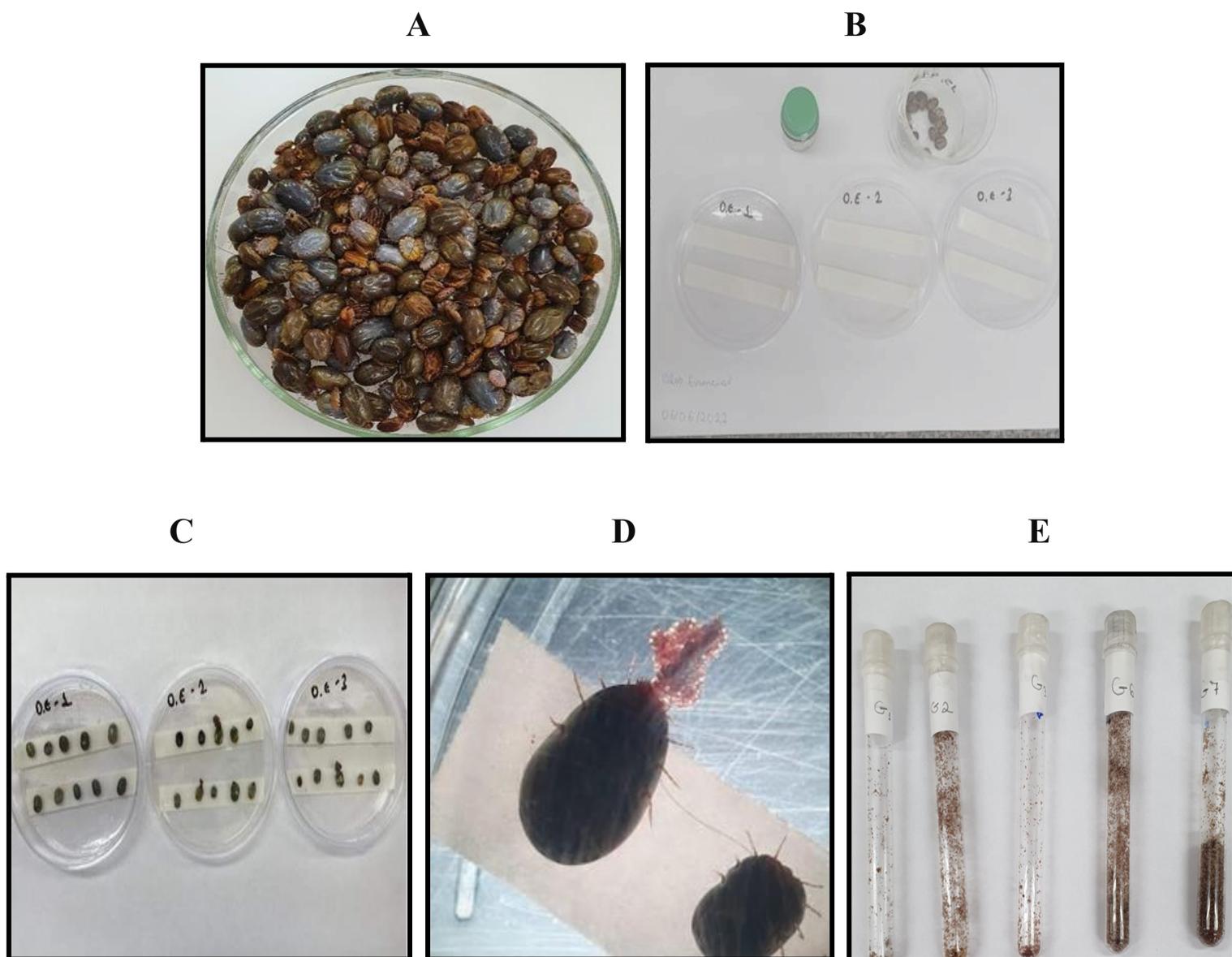


Figura 05. A. Placa com fêmeas de *R. microplus*. Figura B. Peso e preparo das placas para fixação das teleóginas. Figura C. Teleóginas fixadas na posição dorsal. Figura D. Oviposição das teleóginas. Figura E Ovos nos tubos lacrados. Fonte: Autoria própria (2022).

4.5.2 Teste de imersão de Larvas (TIL)

O processo de imersão larval, foi executado por meio do acondicionamento das teleóginas em placas de petri em posição dorsal e armazenadas em uma câmara climática (Série 420-CLDTS) por $\pm 27^{\circ}\text{C}$ e UR $>70\%$, por 18 dias para a obtenção de posturas. Após esse período os ovos foram pesados em 0,050 gramas e mantidos em um eppendorf com a capacidade de 2 mL e armazenados novamente até o nascimento das larvas. Para a realização do teste com os respectivos grupos a serem tratados, procedeu-se da seguinte forma: O grupo A foi tratado com água destilada (controle negativo), o grupo B foi tratado com solução de Triatox®; conforme indicações do fabricante (controle positivo), o grupo C foi tratado com o fitoingrediente microestruturado (ME2), o grupo D foi tratado com OESA, o grupo E com a base saponéica, e o grupo F foi tratado com (T/Co-t, 3:1).

Foram adicionadas 1 mL de cada grupo e fechado sendo agitado vigorosamente por um agitador (Vortex Motion III LSM56-III), durante 5 minutos. Após esses 5 minutos de imersão, com um auxílio de um pincel, as larvas foram colocadas em papel filtro e presas com o auxílio de um clipe e mantidas em $\pm 27^{\circ}\text{C}$ oc e UR $>70\%$.

Os testes de imersão larval (TIL) foram baseados no método descrito por Shaw (1966) e modificado pela EMBRAPA para estudos com óleos e extratos vegetais. A mortalidade foi avaliada após 24 horas do procedimento e as larvas contabilizadas visualmente vivas e mortas com auxílio de lupa.

A mortalidade foi expressa em percentagem:

$$(\%) = (\text{larvas mortas} / \text{total de larvas} \times 100)$$

4.5.3 Atividade microbiológica e testes de eficácia bactericida e fungicida das microemulsões

A avaliação da atividade microbiológica foi feita a partir da metodologia modificada, com a preparação dos inóculos microbianos realizadas de maneira seriada para todos os microrganismos avaliados. A metodologia baseou-se na utilização com uma alça microbiológica na cultura de microrganismo direcionando-as para um tubo falcon contendo uns 5 mL de caldo LB (caldo Luria Bertani). Agitou-se no vórtex, em seguida ajustou-se a turbidez entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro conforme era adicionado ao caldo LB e diluindo.

O aparelho de leitura foi calibrado precisamente, zerando-o com o caldo LB, para manter a finalidade de obter os dados da turbidez e não da cor. Para a realização do teste de eficácia microbiológica das microemulsões, foram selecionadas três diferentes espécies de microorganismos. *Escherichia coli* ATCC 25922, que é uma bactéria gram-negativa, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, bactéria gram-positiva, e *Candida krusei* ATCC 6258, uma levedura. A preparação dos inóculos das cepas foi realizada por suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (HIMEDIA), composto de extrato de levedura, de hidrolisado enzimático de caseína e cloreto de sódio.

A diluição dos inóculos microbianos feita em caldo LB utilizou-se nas concentrações de 100 µL ou 0,1 mL do inóculo em 15 mL de caldo LB. Adicionou-se em eppendorffs 100 µL ou 0,1 mL do inóculo e 100 µL ou 0,1 mL das diferentes concentrações dos produtos a serem testados. Em sequência, realizou-se a triplicata das diluições. Como controle positivo (com crescimento das bactérias), pipetou-se 100 µL ou 0,1 mL do inóculo na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 100 µL ou 0,1 mL de caldo LB. Para o controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) pipetou-se 100 µL ou 0,1 mL de caldo LB e 100 µL ou 0,1 mL do produto a ser testado. Por fim, os eppendorffs foram incubados a 37°C por 18-24 horas.

4.5.3.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) pelo método de diluição em caldo realizou-se no dia seguinte a adição de 100 µL ou 0,1 mL das diluições em ágar Padrão para contagem (ágar PCA), espalhou-se bem com alça de Drigalski (alça em L). Incubou-se as placas a 37°C por 18-24 horas. A CBM foi determinada pela menor concentração dos produtos a serem testados. Para contagem do *S. aureus* foi inoculado no meio com ágar PCA, para a *E. coli* o ágar MacConkey e para contagem de *C. krusei* o Ágar Sabouraud.

4.5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida com base no método de diluição em caldo para determinar a concentração, no dia seguinte adicionou-se 100 µL das diluições nos poços e 20 µL da solução de resazurina em temperatura ambiente, esperou-se de 30 minutos até 3 horas para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa o crescimento das bactérias. Em síntese, a CIM foi definida como a menor concentração dos produtos a serem testados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e caracterização físico-química do fitoingrediente microestruturado

As microemulsões foram formadas quando a fração de tensoativo estava em maior proporção e a de fase oleosa, em menor. As microemulsões formaram-se durante as primeiras titulações, em que a água se encontrava em menores proporções, e à medida que a titulação ocorria, a proporção da fase aquosa foi aumentando, ocorrendo a inversão de fase e dando origem a uma preparação com forma física líquida (CARVALHO, 2019).

O diagrama de fases pseudoternários (Figura 06) foi utilizado para a obtenção das amostras. Com seu auxílio, é possível descrever em que condições experimentais os componentes devem ser combinados, a fim de formar as microemulsões. Estas foram desenvolvidas, utilizando os componentes água ultrapurificada, OESA, renex e amida 60 na proporção 3:1 (p/p). Sob outra perspectiva, as regiões com concentrações iguais tanto de óleo quanto de tensoativo, com a titulação da fase aquosa, resultaram na formação de macroemulsões líquidas. Quando nas formulações com maior fase oleosa e menor proporção de mistura tensoativo-cotensoativo (T/Cot), conseguiu-se observar que, independentemente da proporção de fase aquosa, as formulações adquiriram o aspecto turvo e apresentaram separação de fases (ALI et al., 2016; CARVALHO, 2019).

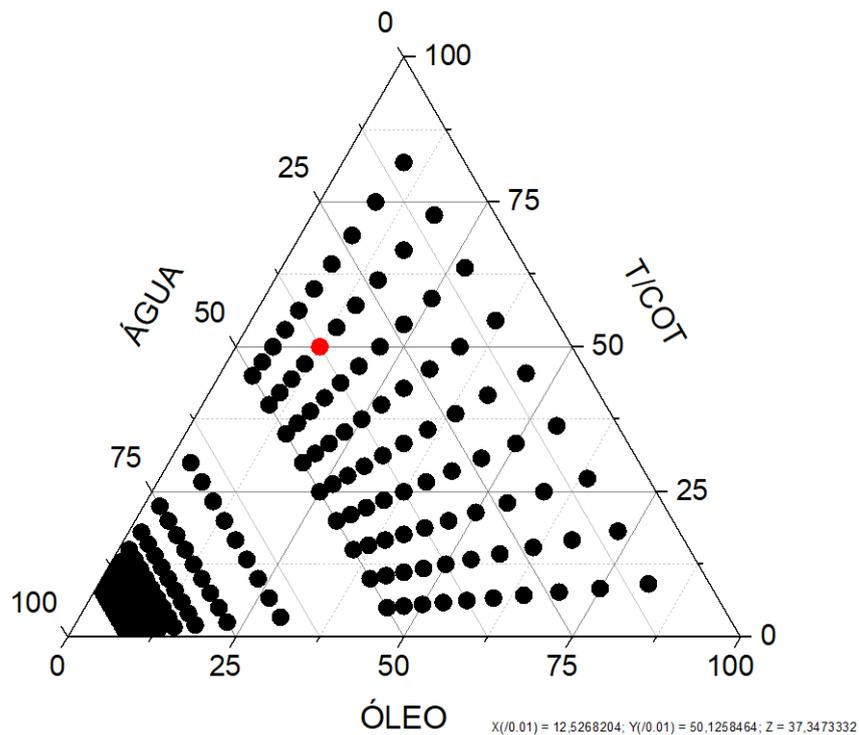


Figura 06. Diagrama de fases pseudoternário para desenvolvimento do fitoingrediente microestrutura à base de OESA. Destaque em vermelho para a região da microemulsão selecionada (ME25). Mostrando as regiões de formação de microemulsões gel límpidas e transparentes. O diagrama foi composto por mistura tensoativo-cotensoativo, Renex e Amida 60 na proporção 3:1 (p/p), óleo essencial (OESA), e água ultrapurificada.

5.1.1 Seleção da composição da microemulsão contendo o fitoingrediente microestruturado

Das regiões de ME do diagrama desenvolvido, foram selecionadas, previamente, três formulações para os estudos de caracterização, variando as proporções dos componentes. Todas as formulações mantiveram-se viscosas, de coloração amarelada, lípidas e transparentes após o período de 48 horas antes da realização das análises, conforme podem ser observadas na Figura 07.

Figura 07 – Aspecto visual das amostras de microemulsões com o fitoingrediente microestruturado



Fonte: autoria própria.

Tabela 01. Composição centesimal das amostras seleccionadas do diagrama RENEX/AMIDA 3:1/ OESA/ Água.

AMOSTRAS	OESA%	T/COT 3:1%	FASE AQUOSA%
M10	5,00	45,00	50,00
M25	12,50	50,00	37,50
M43	20,00	46,67	33,33

Fonte: a autora.

Dentre as formulações desenvolvidas, a seleção das microemulsões foi através da avaliação das mesmas pelas características organolépticas, apresentação de efeito Tyndall, tamanho de gotículas, índice de polidispersão e estabilidade pós-centrifugação, em que a microemulsão (ME25, 2:8:6 OESA: T/Cot: água) foi a escolhida entre as três avaliadas para fazer os demais testes, dentre eles a atividade acaricida, bactericida e fungicida.

5.1.2 Caracterização do PDI e Diâmetro de Partículas

Uma das características mais importantes de uma microemulsão é o tamanho da gotícula. Uma microemulsão com tamanho médio de gotícula variando entre diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente da ordem de 100 Å a 14,15 é capaz de melhorar a estabilidade, diminuindo a ocorrência de processos de instabilização como coalescência, além de aumentar o poder de penetração dos fármacos incorporados e, conseqüentemente, a biodisponibilidade praguicida, carrapaticida, bactericida, fungicida e virucida dos fármacos. De fato, as microemulsões formadas apresentaram um aspecto translúcido com valores de diâmetro da partícula relativamente altos, variando entre 145,4 e 278,3 nm (Tabela 02). Esse tamanho era esperado devido à presença das moléculas de cotensoativo juntas ao tensoativo, que permitem o aumento da tensão interfacial, aumentando, assim, o raio de curvatura das microemulsões (CABRAL et al., 2017; AL-KAABI et al., 2019; ANDRADE et al., 2020).

O PDI, por sua vez, indica a distribuição do diâmetro das partículas da microemulsão em torno do valor médio, em que valores menores que 0,3 indicam uma distribuição de tamanho estreita, ou seja, com alta homogeneidade no sistema. Os resultados obtidos indicaram valores de PDI menores que 0,3 demonstrando que existe uma grande homogeneidade de distribuição do diâmetro das gotículas nessas formulações. Esse resultado é positivo, pois permite inferir que essas nanoemulsões monodispersas serão estáveis fisicamente por período de tempo considerável (KARAMBEIGI et al., 2018; JESUS et al., 2019; ARAÚJO et al., 2020).

A combinação de surfactantes ao invés de um único surfactante é usada para formar e conferir maior estabilidade às microemulsões. A formulação escolhida foi a ME25 pelo fato de maior estabilidade física avaliada. Em concatenação, da mesma forma o PDI apresentou índices próximos a zero, o que indica uma distribuição de tamanho homogênea e com a estabilidade esperada. Além disso, foi possível observar que as microemulsões apresentaram características translúcidas, odor agradável e homogeneidade.

Assim, os resultados obtidos foram exibidos na tabela 02. Nota-se tamanhos e polidispersão com valores adequados e similares das microemulsões 10, 25 e 43 com ligeiro destaque para a microemulsão 25 que em termos de tamanho de partículas apresentou-se a mais adequada para o resultado esperado.

A ME10 apresentou valor de tamanho de gotículas compatível com a classificação de microemulsão, contudo, apresentando valor insatisfatório de índice de polidispersividade. Quanto aos aspectos praguicidas, a ME25 apresentou melhor qualidade em termos de secagem, sensorial e boa solidez. Em vista de tais dados, a ME25 mostrou-se superior às outras selecionadas por apresentar globalmente melhor adequabilidade para o uso como veículo do dispositivo multifuncional inovador. Tais resultados subsidiaram sua escolha para caracterização, avaliação de estabilidade e segurança.

5.1.3 Caracterização do potencial zeta

O potencial zeta indica a densidade de carga em torno das microgotículas e fornece informações sobre o grau de repulsão entre elas. Assim, quanto maior o seu potencial zeta, seja negativo ou positivo, maior deve ser a estabilidade física da formulação, já que há prevenção de floculação e a agregação das micropartículas da formulação. Os dados mostrados na Tabela 02 indicam que as gotículas apresentaram cargas negativas em sua superfície variando entre - 27,1 e -39,9 mV, mas esse resultado é próximo à neutralidade (PATEL et al., 2016; SHAH et al., 2019).

Tabela 02. Caracterização das microemulsões quanto ao diâmetro da gotícula (nm), ZETA (mV) e ao PDI. Formulação 1 (ME10), formulação 2(ME25) e formulação 3(ME43).

<i>Formulação</i>	<i>PDI (nm)</i>	<i>ZETA (mV)</i>	<i>DIÂMETRO DE PARTÍCULAS (nm)</i>
F1(ME10)	0,330	-32.5	230,3
F2(ME25)	0,293	-27.5	147,5
F3(ME43)	0,358	-38.0	245,5

Fonte: a autora.

A microemulsão apresentou potencial zeta de, aproximadamente, -32,6 mV. De modo geral, a carga elétrica das gotículas de óleo é direcionada pela carga de tensoativos adsorvidos ao seu redor, que podem ser de natureza catiônica, aniônica ou não iônica. Neste estudo utilizou-se um tensoativo não iônico (renex), o que leva a se esperar uma carga elétrica próxima a zero. Quando o valor é suficientemente elevado, as gotículas são impedidas de se agregarem devido à repulsão eletrostática entre elas (MEHANNA; MNEIMNEH; ABED EL JALIL, 2020).

5.1.4 Mensuração do potencial hidrogeniônico

O pH de uma formulação deve ser favorável à sua aplicação tópica, tendo em vista que os valores de tolerância biológica para aplicação de produtos cutâneos se figuram entre 5,5 a 8,0 (SILVA et al., 2009). Dessa forma, as médias dos valores da formulação selecionada 8,51, (Tabela 03) encontrados para a ME25 encontram-se dentro da tolerância da faixa, podendo ter risco de contaminação e irritação tópica (JAIN; FERNANDES; PATRAVALE, 2010). Contudo, estudos de irritabilidade cutânea devem ser realizados para garantir a segurança da aplicação tópica do sistema proposto, sejam em animais ou no pasto.

Os valores de pH fornecem também informações sobre a estabilidade do sistema, pois sua redução pode indicar a presença de ácidos graxos livres na formulação, provenientes da hidrólise do sistema tensoativo (fosfolipídeos), e dos triglicerídeos do núcleo oleoso. O pH reflete ainda as condições de armazenamento e processamento das formulações. Quando a esterilização por calor é empregada, por exemplo, verifica-se redução em seus valores ao longo do aquecimento (BRUXEL et al., 2012).

Tabela 03. Mensuração do pH das microemulsões.

AMOSTRAS	1	2	3	MÉDIAS
M10	8,75	8,65	8,56	8,65
M25	8,75	8,45	8,32	8,51
M43	9,10	9,25	9,15	9,17

Fonte: a autora.

5.2 Obtenção da base do dispositivo inovador - base saponéica

A base saponéica obtida apresentou forma física semissólida, mesmo após secagem. Sendo assim, para obtenção da forma física sólida foi adicionado o excipiente lactose para permitir a obtenção de grânulos (granulador oscilante), seguida da incorporação do fitoingrediente microestruturado, mistura com almofariz e pistilo, e realização de compressão (compressora excêntrica) para obtenção dos tabletes. O aspecto semissólido da base impossibilitou a incorporação do fitoingrediente microestruturado.

5.3 Avaliação da eficácia da atividade acaricida

Neste estudo foram testados *in vitro*, diferentes grupos de tratamentos, com o objetivo de avaliar seus efeitos acaricidas sobre fêmeas adultas e larvas de *Rhipicephalus microplus*. Os resultados das médias de eficácia após o teste de imersão das fêmeas ingurgitadas dos carrapatos, nos diferentes grupos, estão demonstrados nas tabelas 4 e 5. O controle positivo apresentou eficácia de 35% demonstrando resistência ao tratamento. O uso do (OESA), puro, e da microemulsão inibiram significativamente a postura das fêmeas ingurgitadas, demonstrando uma eficácia de quase 100%, ou seja, o OESA apresentou toxicidade total para as teleóginas.

O resultado do tratamento com a base saponéica, representada pelo grupo E e F já era esperado por se tratar de um controle sem o OESA. Conforme o ministério da agricultura a eficiência legalmente aceitável para uma base química carrapaticida ser licenciada deve ser igual ou superior a 95,00% sobre uma cepa sensível de *R. microplus*.

Como demonstra a tabela 07, as formulações testes representadas pelos grupos, C, D e F apresentaram percentuais de eficiência significativos para potencial acaricida. O produto comercial representado pelo grupo B na concentração de 200 mg indicada pelo fabricante, não apresentou eficiência no tratamento decorrente de uma provável resistência ao acaricida.

Nessa conjuntura, infere-se que um simples relato da ineficácia de um determinado acaricida, que não mais atua satisfatoriamente, na maioria das populações de carrapatos, não deve ser o motivo para que o produto não seja mais utilizado em determinada região. Com isso, reforça-se a necessidade de recomendação da realização acurada de testes *in vitro* por profissionais do estudo da atuação das pragas agrícolas aliados aos estudos para a aplicação de dispositivos multifuncionais e inovadores na abordagem a tais agentes, como forma de diagnosticar e tratar individual, além de se constituir um instrumental otimizador da eficiência do controle químico em métodos estratégicos de combate aos carrapatos (CHAPARRO-GUTIÉRREZ, 2020; TORRES-SANTOS et al., 2022).

Tabela 04. Eficiência dos tratamentos em testes *in vitro* com teleóginas de *R. microplus* procedentes de bovinos naturalmente infestados criados na fazenda CTZL, Brasília DF.

GRUPOS	% MF	PIF	%MO	%EL	%ER	%EP*
A	10	4,048	0,237	100	117094,86	-
B	13,3	4,570	0,172	100	99781,18	35,71
C	70	4,683	0,020	0,00	85,41	99,92
D	95	4,569	0,014	0,00	61,28	99,94
E	4	4,617	0,222	100	9616634	17,87
F	6,6	4,305	0,212	100	98490,12	15,88

* Cálculo baseado no controle-negativo

** Cálculo baseado no controle-positivo

Grupo A=controle negativo h₂o; Grupo B controle positivo Produto comercial; Grupo C= microemulsão; Grupo D=OESA; Grupo E= base saponéica; Grupo F= BME (branco da microemulsão sem o OESA).

MF- Mortalidade das fêmeas; PIF- Peso Inicial das Fêmeas; MO – Massa de Ovos; EL - Eclosão Larval; EP- Eficácia do produto.

Fonte: a autora

Tabela 05. Médias percentuais de mortalidade de larvas de *R. microplus* submetidas ao teste de imersão em diferentes grupos de tratamento.

TIL -MORTALIDADE DOS TESTES EM %					
Grupos	A1	A2	A3	Média %	Desvio – Padrão
A	0	0	0	0	±0
B	58	50	52	53	±4.1
C	95	91	97	94	±3.05
D	100	100	100	100	±0
E	0	0	0	0	±0
F	0	0	0	0	±0

Fonte: a autora.

A tabela apresenta os valores da porcentagem de mortalidade das larvas referentes à média dos resultados de três ensaios. O controle negativo e o grupo da base saponosa não demonstraram mortalidade alguma. O controle positivo, composto por acaricida comercial, atingiu 53% de mortalidade larval. O grupo contendo o OESA puro, resultou em mortalidades acima de 99%, já a formulação teste com sistema microemulsionado demonstrou uma atividade bastante significativa, acima de 95% de mortalidade.

Existem muitos relatos na literatura sobre a utilização de substâncias de origem vegetal no controle de carrapatos (CRUZ et al., 2013; NOVATO et al., 2015), contudo, a literatura ainda é escassa acerca da atividade carrapaticida de monoterpenos e fenilpropanoide incorporados a uma formulação (DELMONTE et al., 2017; FERREIRA et al., 2017).

Lage et al. (2015) também avaliaram a atividade do óleo de *Baccharis dracunculifolia* sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Eles constataram mortalidade de 99% em larvas na concentração de 15 mg/mL. Já para as fêmeas a redução significativa no percentual de eclosão ocorreu a partir da concentração de 40 mg/mL. Outros óleos essenciais também foram testados em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, como: *Cymbopogon winterianus* e *Syzygium aromaticum* (MELLO et al., 2014), *Cymbopogon nardus* e *Corymbia citriodora* (CHAGAS et al., 2014), *Lippia graveolens* (FLORES-FERNÁNDEZ et al., 2016), *Curcuma longa* e *Mentha arvensis* (CHAGAS et al., 2016), *Juniperus communis*, *Cymbopogon martinii*, *Cedrus atlântica*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*, *Pelargonium graveolens* (PAZINATO et al., 2016), *S. aromaticum* (FERREIRA et al., 2017).

O eugenol é um fenilpropanóide, constituinte majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), folha de louro (*Laurus nobilis*), noz-moscada (*Myristica fragrans*) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica*) (PENGELLY, 2004; FRANZ NOVAK, 2009; NEVES, 2009). Ele apresenta grande versatilidade, útil na fabricação de sorvetes, produtos de panificação, doces, cosméticos, perfumes, produtos farmacêuticos e em composições para produtos odontológicos (BARCELOUX, 2008; CHANG et al., 2002).

O eugenol tem ação bactericida, fungicida, nematicida, acaricida e inseticida (ASHA et al., 2001; EL-ZEMITY et al., 2010). Já existem investigações sobre a ação do eugenol sobre fêmeas ingurgitadas e larvas não ingurgitadas de *R. microplus* e *D. nitens* (MONTEIRO et al., 2012; FERREIRA et al., 2017) e larvas e ninfas não ingurgitadas de *R. sanguineus* e *A. cajennense* s. l. (SENRA et al., 2013). O efeito repelente do eugenol também foi observado em ninfas de *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (THORSELL; MIKIVER; TUNÓN, 2006; DEL FABBRO; NAZZI, 2008) e em *R. microplus* e *D. nitens* (ZERINGÓTA et al., 2013). Valente et al. (2014), por sua vez também avaliaram que o eugenol, na concentração de 5%, demonstrou atividade acaricida e inibiu a oviposição de *R. microplus*.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nos artrópodes ainda é obscuro, entretanto sugere-se que por meio do contato, podem interagir com o tegumento do inseto atuando em enzimas digestivas e neurológicas, aparecendo sinais tóxicos (KNAAK; FIUZA, 2010). A enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por promover a hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas, tem sido alvo de pesticidas e sua inibição pelos organofosforados levam

à paralisia e morte de artrópodes (RIBEIRO et al., 2012). Algumas pesquisas apontam o eugenol, como um potente inibidor da AChE, o que justifica sua elevada atividade frente a *R. microplus* (DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009). 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; 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 (BALASHOV, 1972), sendo que as larvas não possuem esta camada de cera o que pode ter permitido uma maior ação dos compostos (ODHIAMBO, 1982).

5.4 Avaliação da atividade microbiológica

No que concerne a avaliação microbiológica, verificou-se que tanto o óleo essencial puro quanto o composto microemulsionado apresentaram atividade antimicrobiana, sendo os resultados do composto microemulsionado mais promissores (Tabelas 06 e 07). De acordo com Aligiannis et al. (2001) são considerados inibidores fortes, os óleos que apresentarem a CIM até 500µg/mL, com CIM entre 600 µg/mL e 1500µg/mL são considerados moderados e com CIM acima de 1.600µg/mL são considerados fracos.

Tabela 06 – CIM, CBM e CFM do OESA.

Microrganismos	CIM (µg/mL)	CBM ou CFM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	250	250
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	63	125

Legenda: CIM = concentração inibitória mínima; CBM= concentração bactericida mínima; CFM= concentração fungicida mínima.

Tabela 07 – CIM, CBM e CFM do composto microemulsionado e do eugenol

Microrganismos	CIM/CBM/CFM (µg/mL) Composto	CIM/CBM/CFM (µg/mL) Eugenol
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	70	8,75
<i>E. coli</i> ATCC 25922	< 50	< 6,25
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	< 50	<6,25

Legenda: CIM = concentração inibitória mínima; CBM= concentração bactericida mínima; CFM= concentração fungicida mínima.

As propriedades antimicrobianas do OESA e do eugenol para cepas de *S. aureus* e *E. coli* são bem descritas na literatura. Scherer et al. (2009) pois o óleo de cravo-da-índia apresentou melhor atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *E. coli* do que em *Salmonella thyphimurium*. A diferença de resultados em microrganismos da mesma espécie, porém de fontes diferentes, podem ser causados devido à pressão seletiva e seleção natural causando assim resistência destes microrganismos.

De acordo com o estudo feito por Silvestri et al. (2010), que realizaram atividade antimicrobiana do óleo essencial do cravo por dois métodos: o de difusão em placas e o método indireto de crescimento microbiano, ficou comprovado que as bactérias *E. coli* e *S. aureus* mostraram-se vulneráveis ao óleo essencial do cravo da índia nos dois métodos. Os óleos ricos em eugenol e outros aldeídos possuem uma boa atividade bactericida. Diversos autores (RADÜNZ et al., 2019; RAJKOWSKA et al., 2017; BUDZYNSKA et al., 2017; XU et al.,

2016) atribuem ao composto majoritário do óleo de cravo, o eugenol, não só o efeito bactericida, mas também outras propriedades biológicas. Entretanto, a ação conjunta dos vários compostos presentes nos óleos é denominada sinergismo, o que confere uma boa capacidade antibacteriana (RABÊLO, 2010).

Com relação ao seu mecanismo de ação, o eugenol se destaca por sua atividade antifúngica (HASSAN et al., 2018, LABIB, ALDAWSARI, 2015) e antibacteriana (ZHANG et al., 2018, THOSAR et al., 2013), nas quais ele age, geralmente, similarmente, tendo como alvo principal a parede celular e as membranas presentes nos microrganismos, aumentando a permeabilidade celular e repercutindo no efluxo de constituintes importantes para sua sobrevivência, como a perda de K⁺ e de outros componentes citoplasmáticos (AHMAD et al., 2010). O eugenol pode estar associado também à inibição enzimática da ATPase e de proteases,

por exemplo (HYLDGAARD et al., 2012), assim como na indução do estresse oxidativo celular com o aumento das Espécies Reativas do Oxigênio – EROS, que causam danos estruturais à célula, como a ruptura de membranas (KHAN, AHMAD et al, 2012).

Utilizando o mesmo método de microdiluição em placas, Moreira et al. (2005) determinaram a concentração de 0,3% de OE de cravo-da-índia como a CBM para *E. coli*. Deve-se considerar que a CBM encontrada para o OE, neste estudo, foi 40% menor que o resultado obtido pelos autores citados, além de que, normalmente, os OEs apresentam capacidade bactericida para bactérias Gram negativas em concentrações menores que para as Gram positivas. Esta diferença de CBM poderia ser explicada pela variação na composição química entre os óleos extraídos.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do estudo permitiu a obtenção de um dispositivo multifuncional inovador à base de microemulsão contendo o óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, dispersa em base saponéica.

O fitoingrediente foi microestruturado através de microemulsificação espontânea com mistura de 2 tensoativos usualmente aplicado em produtos domissanitários, e, portanto, inócuo. A microemulsão apresentou variação de características físico-químicas, que não provocaram alterações em sua efetividade biológica avaliada, acaricida, antibacteriana e antifúngica.

Quanto à obtenção da base saponéica, o presente estudo apresentou dificuldades para escolha do processo de secagem empregado. Por se tratar de sabão obtido através da saponificação com hidróxido de potássio, base alcalina forte empregada na elaboração de sabões líquidos, o estado físico alcançado com os diferentes métodos de secagem empregados foi o semissólido. Dessa maneira. No estudo foi selecionado o processo de secagem em estufa, bastante empregado na indústria, o que viabiliza a produção em larga escala.

Apesar da obtenção da base saponéica no estado semissólido, foi possível efetuar a granulação e incorporação do fitoingrediente microestruturado para as avaliações de efetividade biológica. Melhorias no processo serão necessárias para aprimorar o processo produtivo, mas o protótipo obtido permitiu alcançar resultados relevantes de efetividade biológica.

Por fim, o produto desenvolvido mostrou-se promissor no combate a espécie *Rhipicephalus (B.) microplus*, sugerindo uma exímia atividade carrapaticida, especialmente para as formas larvais. Podendo, assim, consistir em forma de prevenção de doenças na pecuária transmitidas pelo carrapato e controle da frequência de infestações por este ectoparasita, proporcionando, assim, melhorias econômicas com a redução de danos no couro ocasionadas por lesões na pele e/ou aumento da produção de leite, evitando-se a interrupção da produção, por exemplo.

7 PERSPECTIVAS

A proposta surgiu em meio a pandemia da COVID-19, e um dos objetivos previstos inicialmente foi a avaliação da atividade virucida contra coronavírus. Entretanto, por razões alheias aos pesquisadores envolvidos na proposta, esta avaliação será realizada posteriormente. Assim sendo, o projeto de pesquisa seguirá em andamento e novas metas foram traçadas e listadas a seguir:

- Desenvolver e validar método analítico para determinação da concentração de fitoingrediente no protótipo;
- Otimizar o método produtivo da base saponéica, com ou sem alterações no processo de secagem da base saponéica;
- Avaliar o efeito virucida do produto inovador e do fitoingrediente microestruturado;
- Otimizar as características físico-químicas do produto inovador (pastilha), com incorporação de insumos que permitam a obtenção do protótipo por compressão;
- Avaliação da efetividade carrapaticida frente a carrapatos do gênero *Amblyomm* (carrapato estrela, vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, transmissora da Febre Maculosa), a fim de ampliar a aplicação do produto e permitir benefícios na saúde da população.

8 REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Rev. Virtual Quim.**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.

AGNOLIN, C. A. **Avaliação dos óleos essenciais de capim limão, citronela e eucalipto no controle do carrapato**. 2012. Tese. Pós-graduação em Zootecnia, área de Produção Animal/Bovinocultura de leite. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

AHMAD, A. et al. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.1178– 1184, 2010.

AL-KAABI, M. A. et al. An integrated approach for produced water treatment using microemulsions modified activated carbon. **Journal of Water Process Engineering**, v. 31, p. 100830, 2019.

ALI, A. et al. Conductometric and tensiometric studies on the mixed micellar systems of surface-active ionic liquid and cationic surfactants in aqueous medium. **Journal of Molecular Liquids**, v. 223, p. 589-602, 2016.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALMEIDA, L. S., SENA, L. M., BARIONI, G., MORAES, T. M. A., & OLIVEIRA, R. E. Comparação entre métodos de avaliação direta para o diagnóstico de babesiose em bovinos. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 10, 2019.

ALVES, D. M.; EDELWEISS, M. K.; BOTELHO, L. J. Infecções comunitárias do trato urinário: prevalência e suscetibilidade aos antimicrobianos na cidade de Florianópolis. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 11, n. 38, p. 1-12, 2016.

ANDRADE, L.N.; DARINI, A.L. C. **Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos**. Divisão de MI – CM – FMRP-USP, 2016.

ANDRADE, W. A. et al. Síntese de um tensoativo a base de óleo de Moringa Oleífera Lam e formulação de sistemas microemulsionados para a quebra de emulsões do tipo água em óleo. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. e193922194, 2020.

ANUALPEC. **Anuário brasileiro da pecuária brasileira 2015**. Editora Gazeta, 64 p, 2015.

ARAÚJO, E.A. et al. Application of microemulsion systems in the formulation of biodegradable pre-flush fluid of primary cementing. **Energies**, v. 13, p. 4683-4688, 2020.

ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração e caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, n. especial, p. 137-144, 2013.

ASHA, M. K. et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 669-70, 2001.

BALASHOV, I.U.S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidea): vectors of diseases of man and animals. **Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.** v. 8, n. 5, p. 159-376, 1972.

BANSODE, T. N. Green synthesis and antimicrobial activity of some eugenol derivatives. **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research**, Thane, v. 4, n. 4, p.145-147, 2017.

BARCELOUX, D. G. **Medical toxicology of natural substances. foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animals.** Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008.

BARROS, G. P. R. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018.

BASF. Disponil® SUS IC PG 870; Anionic surfactant for use in the chemical-technical industry and emulsion polymerization. **Technical Information**, WF-No. 27451, p.1-3, 2021.

BATIHA, G. E. et al. *Syzygium aromaticum* L. (*Myrtaceae*): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. **Biomolecules**, v. 10, n. 202, 2020.

BATIHA, G. E. S. et al. Inhibitory effects of *Syzygium aromaticum* and *Camellia sinensis* methanolic extracts on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Ticks Tick. Borne Dis**, v. 10, p. 949–958, 2019.

BHOWMIK, D. et al. Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. **J. Pharmaco. Phytochem.**, v. 1, p. 13–23, 2012.

BLASSIOLI-MORAES, M. C. et al. Semiochemicals from plants and insects on the foraging behavior of Platygasteridae egg parasitoids. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 454-464, 2016.

BORGES, M.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. The semiochemistry of Pentatomidae. In: COKL, A.; BORGES, M. (Org.). **Stink bugs: biorational control based on communication processes.** Boca Raton: CRC Press, 2017.

BRASIL. **Portaria 48, de 12 de maio de 1997.** MAPA.Brasília,1997.

BRASIL. **Produção da pecuária municipal.** vol 42, p.1-39. IBGE. Rio de Janeiro, 2014.

BRUMANO, P. L.; SOLER, M. F.; DA SILVA, S. S. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova.** Porto Alegre, RS, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BRYAN, A.; YOUNGSTER, I.; MCADAM, A.J. Shiga Toxin Producing Escherichia coli. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 247-272, 2015.

BUDZYŃSKA, A., et al. Candida albicans/Staphylococcus aureus dual-species biofilm as a target for the combination of essential oils and fluconazole or mupirocin. **Mycopathologia**. v.182, e.11-12, p.989-995, 2017.

CABRAL, A.G.; ARAÚJO; LOPES, G.S.; GARNICA, A.I.C.; CURBELO, F.D.S. **Estudo comparativo de óleos vegetais na preparação de microemulsões utilizadas como colchão lavador**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 12. São Carlos, SP, Brasil, 2017.

CARDOSO, A. S. et al. Terpenes on Rhipicephalus (Boophilus) microplus: acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Vet Parasitol**, v. 280, n. 109090, 2020.

CARMO, M. S. D. et al. Detecção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) em isolados de Escherichia coli uropatogênicas (UPECS) oriundos de pacientes da comunidade. **Rev. Patol. Trop**, p. 419-426, 2018.

CARVALHO, G. K. G. **Floculação iônica através de tensoativos aniônicos na remoção de cobre e corantes**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia Química, Linha de Pesquisa: Ciência e Tecnologia de Tensoativos, UFRN, Natal/RN, Brasil, 2019.

CHAGAS, A. C. S. et al. Sensibilidade do carrapato Boophilus microplus a solventes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 109-114, 2003.

CHAGAS, A. C. et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.

CHAGAS, A.C.S. et al. In vitro and in vivo acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of Cymbopogon spp. and Corymbia citriodora essential oil on the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 277-284, 2014.

CHAMIEH, J. et al. Size characterization of commercial micelles and microemulsions by Taylor dispersion analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1, p. 46-54, 2015.

CHANG, M. C. Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: Roles of glutathione and reactive oxygen species. **British Journal of Pharmacology**, v.135, p. 619– 630, 2002.

CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J.; VILLAR, D.; SCHAEFFER, D. J. Interpretation of the larval immersion test with ivermectin in populations of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus from Colombia farms. **Ticks Tick-borne Dis.**, v. 11, n. 101323, 2020.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Use of eugenol-lean clove extract as a flavoring agent and natural antioxidant in mayonnaise: product characterization and storage study. **J**

Food Sci Technol., v. 52, n. 8, p. 4945-54, 2015.

CHELLAPPANDIAN, M., VASANTHA-SRINIVASAN, P., SENTHIL-NATHAN, S. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue.

Environment International, n° 113, 214-230, 2018.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v. 4, n. 2, p. 90-6, 2014.

CRUZ, B. C. **Aspectos ecológicos, biológicos e de resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) na região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.** (Tese doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2017. 146 p.

CRUZ, E. M. O. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198– 202, 2013.

CUNHA, F. J. V. **Obtenção de microemulsão, utilizando nonilfenoletoxilado, empregada na preparação de um fluido de perfuração base óleo:** avaliação das propriedades reológicas. Monografia de Graduação, PRH ANP-14, Departamento de Engenharia Química, UFRN, Natal/RN, Brasil, 2013.

DAHER, D. O. et al. Fatores associados à resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) no Sul de Minas Gerais. **Revista Verde**, v. 7, n. 1, p. 102 – 115, 2012.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev Ciên Farmac Bás Apl**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2012.

DANOV, K. D. Analytical modeling of micelle growth. 1. Chain-conformation free energy of binary mixed spherical, wormlike and lamellar micelles. **Journal of colloid and interface science**, v. 547, p. 245-255, 2019.

DEL FABBRO, S.; NAZZI, F. Repellent effect of sweet basil compounds on *Ixodes ricinus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 45, n.3-4, p. 219-228, 2008.

DELMONTE, C. et al. Evaluation of the acaricidal activity of thymol incorporated in two formulations for topical use against immature stages of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.116, n. 11, p. 2957–2964, 2017.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4313–4318, 2009.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* Vand *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **J Econ Entomol**, v. 66, n. 1, p. 130-3, 1973.

EL-MAATI, M. F. A. et al. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, n.

4, p. 494-504, 2016.

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

EL-ZEMITY, S.R. et al. Acaricidal activity of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Trends in Acarology**, p. 541-543, 2010.

EMBRAPA. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510 p.

ERB, M.; VEYRAT, N.; ROBERT C. A. M.; XU, H.; FREY, M.; TON, J.; TURLINGS, T. C. J. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. **Nature Communications**, v. 6, n. 6273, p. 1-10, 2015.

EVANS, D. E. **Ecologia e controle de carrapato de bovinos**. Coronel Pacheco: IICA: EMBRAPA, vol. 13, p. 629-643, 1992.

EVONIK. Química dos Surfactantes - Características e influência do grau de etoxilação. In: **Solucionando seus desafios de umectação com SURFYNOL® 104**, Webinar p.8-14; São Paulo, p.1-33, 2020.

FERREIRA, F. M. **Atividade acaricida do eugenol, do óleo essencial e do hidrolato de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) frente a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae)**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.

FERREIRA, F. M. et al. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.32, n.1, p 4147, 2017.

FERREIRA, F. M. et al. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. **Med Vet Entomol**, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2018.

FIDELIS JÚNIOR, O. L. et al. Resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas: revisão de literatura. **Nucleus Animalium**, v. 6, n. 2, p. 99-110, 2014.

FIEBER, W.; FRANK, S.; HERRERO, C., Competition between surfactants and apolar fragrances in micelle cores. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 539, p. 310-318, 2018.

FLORES-FERNÁNDEZ, J. M. et al. Adulticidal and oviposition- and hatching-altering activities of essential oil from Mexican oregano leaves (*Lippia graveolens* H.B.K.) against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Tropical Biomedicine**, v. 33, n. 2, p. 290–294, 2016.

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of Essential Oils. In: Baser KHC, Buchbauer G (ed)

Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications. **CRC Press**, New York 39-81, 2009.

GASPAR, E. B.; SACCO, A. M. S.; BENAVIDES, M. V. B. **Vacina viva atenuada contra tristeza parasitária bovina**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2017.

GAUDIN, T. et al. Estimating the adsorption efficiency of sugarbased surfactants from QSPR Models. **International Journal of Quantitative Structure Property Relationships (IJQSPR)**, v. 4, n. 2, p. 28-51, 2019.

GÓMEZ-GAVIRIA, M; MORA-MONTES, H. M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of candida krusei, a neglected fungal pathogen. **Infect Drug Resist.**, v. 13, p. 1673–89, 2020.

GRAÇA, J. P. et al. The natural plant stress elicitor cis-jasmone causes cultivar-dependent reduction in growth of the stink bug *Euschistus heros* and associated changes in flavonoid concentrations in soybean, *Glycine max*. **Phytochemistry**, v. 131, p. 84-91, 2016.

HASSAN, H. A., et al. Topical eugenol successfully treats experimental candida 51 albicans-induced keratitis. **Ophthalmic Research**, v. 60, n. 2, 2018.

HYLDGAARD, M., et al. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiol.** v. 3, p.12, 2012

IRKIN, R.; ESMER, O.K. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.10, p.6095-6111, 2015.

JAIN, J.; FERNANDES, C.; PATRAVALE, V. Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 2, p.826-831, 2010.

JAIN, P., SATAPATHY, T., PANDEY, K. R. *Rhipicephalus microplus* : A parasite threatening cattle health and consequences of herbal acaricides for upliftment of livelihood of cattle rearing communities in Chhattisgarh. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, n. 101611, 2020.

JAMIU, A. T. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Med Mycol.**, v. 59, n. 1, p. 14–30, 2021.

JESUS, V. A. S. et al. Avaliação da influência da fração dos componentes do sistema microemulsionado na quebra de emulsão. Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, 10. **Anais...** Natal, Brasil, 2019.

JUTHANI-MEHTA, M. et al. Effect of cranberry capsules on bacteriuria plus pyuria among older women in nursing homes: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 316, n. 18, p. 1879- 87, 2016.

KANOKKARN, P. et al. Equilibrium and dynamic surface tension in relation to diffusivity and foaming properties: effects of surfactant type and structure. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 524, p. 135-142, 2017.

KARAMBEIGI, M. S.; ASL, A. H.; NASIRI, M. Multi-Objective Optimization of Microemulsion Flooding for Chemical Enhanced Oil Recovery. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 73, 2018.

KARYMATHIL, D. P.; SURENDRAN-NAIR, M.; VENKITANARAYANAN, K. Efficacy of trans-cinnamaldehyde and eugenol in reducing *Acinetobacter baumannii* adhesion to and invasion of human keratinocytes and controlling wound infection in vitro. **Phytotherapy Research**, v.30, p. 2053-2059, 2016.

KAUFMAN, J.; TEMPLE-SMITH, M.; SANCI, L. Urinary tract infections in children: an overview of diagnosis and management. **BMJ Paediatrics Open**, v. 3, n. 1, e000487, 2019.

KHALIL, A. A. et al. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. **RSC Advances**, n. 52, 2017.

KHAN, M.S.A., AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 416– 423, 2012.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p.120-132, 2010

LABIB, G. S. ALDAWSARI, H. Innovation of natural essential oil-loaded Orabase for local treatment of oral candidiasis. **Drug Des Devel Ther.** v. 9, p. 3349–3359. 2015.

LAGE, T. C. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 124-129, 2015.

LAVOIE, E. J. et al. Toxicity studies on clove cigarette smoke and constituents of clove: determination of the LD50 of eugenol by intratracheal instillation in rats and hamsters. **Archives of Toxicology**, v. 59, p. 78-81, 1986.

LÉON, P. D. et al. Ectoparasites of Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 173-185, 2020.

LOPES, W. D. Z. et al. Effects of macrocyclic lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. **Exp Parasitol**, v. 135, p. 72–78, 2013.

MACHADO, F. A. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multiresistant tick. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal**, v. 23, n. 3, p. 337-342, 2014.

MAK, K. K. et al. A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: a transformation from ethnomedicine to industry. **Pharmacognosy Reviews**, v. 13, n. 25, 2019.

MARINHO, A. C. T. A. **Estudo toxicológico reprodutivo do eugenol**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

MEHANNA, M. M.; MNEIMNEH, A. T.; ABED EL JALIL, K. Levofloxacin-loaded naturally occurring monoterpene-based nanoemulgel: a feasible efficient system to circumvent MRSA ocular infections. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 46, n. 11, p. 1787-1799, 2020.

MEHER, G.; CHAKRABORTY, H. Influence of eugenol on the organization and dynamics of lipid membranes: a phase-dependet study. **Lagmuir**, v. 34, p. 2344-2351, 2018.

MELLO, V. et al. Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4431–7, 2014.

MNAFGUI, K. et al. Anti-inflammatory, antithrombotic and cardiac remodeling preventive effects of Eugenol in Isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rat. **Cardiovascular toxicology**, v. 16, n. 4, p. 336-344, 2015.

MODJINO, T. et al. Antibacterial and antioxidant bio-based networks derived from eugenol using photo-activated thiol-ene reaction. **Reactive and Functional Polymers**, v.101, p.47–53, 2016.

MONTEIRO, I. N. et al. Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 238, p. 54-57, 2017.

MONTEIRO, C. M. O. et al. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111, p.1295–1300, 2012.

MONTESCHIO, J. O. **Dietas suplementadas com óleos essenciais de cravo e alecrim e óleos protegidos (eugenol, timol e vanilina) sobre a qualidade da carne de novilhas terminada em confinamento**. 2017. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

MOREIRA, M.R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT**, v. 38, 2005, p. 565-570.

MOTA, F. S.; OLIVEIRA, H. A; SOUTO, R. C. F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **Rev Bras Anal Clin.**, v. 50, n. 3, p. 270-7, 2018.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169–172, 2003.

NAVA, S. et al. Relationship between pharmacokinetics of ivermectin (3.15%) and its efficacy to control the infestation with the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in cattle. **Vet. Parasitol.** v. 268, p. 81–86, 2019.

NEVES, A. P. **Ensaio sobre controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* através de processos agroecológicos**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, Santa Catarina, 2009.

NIELSEN, C. K. et al. Antibacterial isoeugenol coating on stainless steel and polyethylene surfaces prevents biofilm growth. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 179- 187, 2017.

NOVATO, T. et al. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 331-335, 2015.

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

OLIVEIRA, F. P.; SPADA J. C. P.; SILVA, T. S. D.; FERREIRA, L. C.; LUQUETTI, B. C.; SOUTELLO, R.V.G. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos diferentes grupos de acaricidas utilizados na região noroeste do estado de São Paulo. **Ciências Agrárias da Saúde**, v. 9, p. 54-60, 2013.

OLIVO, C. J. et al. Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbiacitriodora*) no controle do carrapato bovino. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 331-337, 2013.

PATEL, N. et al. Development of loteprednol etabonate-loaded cationic nanoemulsified in- situ ophthalmic gel for sustained delivery and enhanced ocular bioavailability. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3712–3723, 2016.

PATEL, U.; PAREKH, P.; SASTRY, N. V.; ASWAL, V. K.; BAHADUR, P. Surface activity, micellization and solubilization of cationic gemini surfactant-conventional surfactants mixed systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 225, p. 888-896, 2017.

PAZINATO, R.; VOLPATO, A.; BALDISSERA, M.D.; SANTOS, R.C.V.; BARETTA, D.; VAUCHER, R.A.; GIONGO, J.L.; BOLIGON, A.A.; STEFANI, L.M.; Da SILVA, A.S. In vitro effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Advanced Research**, v. 7, p. 1029 – 1034, 2016.

PENGELLY, A. **The Constituents of Medicinal Plants: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine**. 2. ed, Allen&Unwin, 2004.

PEREIRA, C. D. **Análise molecular e bioquímica da resistência do *Boophilus microplus* (acari.ixodidae) à cipermetrina**. 72 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

PEREIRA, F. G. F. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 70-77, 2016.

PORTO, A. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão a base de óleo de copaíba - *Copaifera***

multijuga hayne e nanopartícula de prata associada à itraconazol e terbinafina: ensaios antimicrobianos. 2020. 100 f. tese (doutorado) - curso de ciências biológicas, universidade de Brasília, Brasília, 2020.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **Lancet Infect Dis.**, v. 17, e367– e377, 2017.

RABÊLO, W. F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*).** 2010. 79p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, São Luís, 2010.

RADÜNZ, M., et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil. **Food Chemistry**, v.15, p.180- 186, 2019.

RAJKOWSKA, K., et al. Candida albicans impairments induced by peppermint and clove oils at sub-inhibitory concentrations. **Int J Mol Sci.**, v.18, n.6, p.1307, 2017.

RAJA, M. R. C. et al. Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. **Pharm Anal Acta**, v. 6, n. 367, 2015.

RAJPUT, J. D. et al. Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. **Molecular Diversity**, v. 22, n. 225, 2018.

RAMOS, F. et al. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, 10- 16, 2018.

RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in Rhipicephalus microplus: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Vet Parasitol**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

REGINATO, C. Z. et al. Efficacy of commercial synthetic pyrethroids and organophosphates associations used to control Rhipicephalus (Boophilus) microplus in Southern Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 26, n. 4, p. 500-504, 2017.

RESENDE, D. B. et al. Synthesis and in vitro evaluation of peracetyl and deacetyl glycosides of eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol acting against food-contaminating bacteria. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1025-1029, 2017.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Effect of Calea serrata Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. **Veterinary Parasitology**, 189, p. 322-326, 2012.

ROCHA, C. F. et al. Action of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen on the reproductive performance of Wistar females rats: A popular female aphrodisiac from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 214, p. 301-308, 2018.

RODRIGUES, R. C. E. et al. Estudo da resistência bacteriana frente ao líquido da castanha de caju (*Anacardium occidentale*). **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 18076-

18094, 2020.

RUB, M. A. et al. Tensiometric, fluorescence and ¹H NMR study of mixed micellization of non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salt of ibuprofen in the presence of non-ionic surfactant in aqueous/urea solutions. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 96, p. 196-207, 2016.

SÁ JÚNIOR, P. L. et al. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell in vitro. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, p. 725-735, 2016.

SAID, M. M.; RABO, M. M. Neuroprotective effects of eugenol against aluminium-induced toxicity in the rat brain. **Archives of industrial hygiene and toxicology**, v. 68, n. 1, p. 27-36, 2017.

SANTOS, A. L. et al. Characterization of the raw essential oil of eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, p. 821-825, 2014.

SANTOS, L. R et al. Tristeza Parasitária Bovina - Medidas de controle atuais. Cap 6, p. 86-97. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

SASIVIMOLPHAN, P. et al. Microemulsion-Based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: physicochemical properties and efficacy in cutaneous hsv-1 infection in mice. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 13, n. 4, p. 1266-1275, 2012.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SENRA, T.O.S. et al. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p. 3471-3476, 2013.

SHAH, J. et al. Nanoemulsion based vehicle for effective ocular delivery of moxifloxacin using experimental design and pharmacokinetic study in rabbits. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 230, 2019.

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

SHYMA, K. P. et al. Acaricidal effect of herbal extracts against cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* using in vitro studies. **Parasitol Res**, p. 1919–1926, 2014.

SILVA, F. F. M. et al. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 34, 2018.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quím. Nova**, v.32, n.6, p.1389-1393. 2009.

SILVA, J. D. F. et al. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Quím. Nova**, Vol. 38, No. 9, 1196-1206, 2015.

SILVEIRA NETO, O.J.; TAVEIRA, R.Z.; AMARAL, A.G.; MARTINS, T.R.; OLIVEIRA, B.C. Avaliação da suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em bovinos leiteiros na região do Oeste Goiano, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p 54-59, 2017.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, p. 589–594, 2010.

SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-10, 2016.

SOUZA, D. R. Q. A. et al. Influência do cotensoativo em sistemas microemulsionados na quebra de emulsão de petróleo. **rUnPetro**, p. 33–42, 2016.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409- 427, 2016.

STINGHEL, M. L. et al. Infecção do trato urinário: estudo de sensibilidade e resistência bacteriana em pacientes internados. **Revista de Medicina**, v. 101, n. 1, e-171057, 2022.

SYED, H. K.; PEH, K. K. Identification of phases of various oil, surfactant/ co-surfactants and water system by ternary phase diagram. **Acta Pol Pharm.**, v. 71, n. 2, p. 301-9, 2014.

TALEUZZAMAN, M.; JAHANGIR, A.; GILANI, S. J. Quantification and Identification of Bioactive Eugenol in *Myristica fragrans* Seed Using Validated High Performance Thin Layer Chromatography Technique. **Pharm Anal Acta**, v. 8, n. 563, p. 2, 2017.

TAVARES, M. S., REIS, I. A. O.; SANTOS, S. B. Elaboração de microemulsão da planta *Maytenus rigida* mart. (Celastraceae) com atividade antimicótica. **Interfaces Científicas Saúde e Ambiente**, Aracaju- SE, v. 8, n. 1, p. 29 – 42, 2019.

TAYLOR M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

THOMPSON, D. et al. Metabolic activation of eugenol by myeloperoxidase and polymorphonuclear leukocytes. **Chem Res Toxicol.**, v. 2, n. 3, p. 186-92, 1989.

THORSELL, W.; MIKIVER, A.; TUNÓN, H. Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L. **Phytomedicine**, v.13, n. 1-2, p. 132-134, 2006.

THOSAR, N. et al. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: an in vitro study. **Eur J Dent**. v. 7, p. 71, 2013.

TIBURTINO, G. L. et al. Obtenção de um diagrama pseudoternário utilizando tween 80 como tensoativo", p. 915-924. In: Encontro Regional de Química & Encontro Nacional de Química, 4. **Anais...** [Blucher Chemistry Proceedings]. São Paulo: Blucher, 2015.

TORRES-SANTOS, P. T. et al. Avaliação in vitro da resistência do carrapato *Rhipicephalus microplus* a diferentes carrapaticidas. **RVZ**, v. 28, p. 1-9, 2022.

TORRES, P. P. T. S. et al. Avaliação tomográfica das doenças fúngicas no tórax: abordagem por padrões e sinais. **Radiol Bras.**, v. 51, n. 5, p. 313–320, 2018.

VALENTE, P.P. et al. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.113, p. 417–423, 2014.

VERÍSSIMO, J. C. **Controle de carrapatos nas pastagens**: Fatores que afetam a fase livre de carrapatos. Nova Odessa, Instituto de Zootecnia, 2. ed. rev. e ampl. p. 02-17, 2015.

WAN, J. et al. A sustainable, eugenol-derived epoxy resin with high biobased content, modulus, hardness and low flammability: synthesis, curing kinetics and structure–property relationship. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, n. 1080, 2016.

WOLFFENBUTTEL, A. N. **Bases químicas dos óleos essenciais e aromaterapia**: Abordagens técnica e científica. Belo Horizonte: Ed. Laszlo, 2016. 494 p.

XAVIER, F. J. S. **Síntese e avaliação in vitro da atividade leishmanicida de novos adutos de moria-baylis-hillman (ambh) híbridos com os constituintes eugenol-carvacrol e timol**. Tese (doutorado), Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) - Programa de Pós-Graduação em Química - UFPB/CCEN, João Pessoa, 2017.

XU, H., et al. *Streptococcus oralis* and *Candida albicans* synergistically activate μ calpain to degrade E-cadherin from oral epithelial junctions. **J. Infect. Dis.** v.214, n. 6, p. 925–934, 2016.

ZERINGOTA, V. et al. Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 2675-2679, 2013.

ZHANG, Y. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 9, p. 883–8.