

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Avaliação da ação repelente dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em ixodídeos parasitas do coelho-bravo com vista ao controlo da Doença Hemorrágica Viral

ANA RITA FERREIRA BRANCO

ORIENTADORA:
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca

2022

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DA AÇÃO REPELENTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS*)
E DE EUCALIPTO (*EUCALYPTUS GLOBULUS*) EM IXODÍDEOS PARASITAS DO COELHO-BRAVO
COM VISTA AO CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL

ANA RITA FERREIRA BRANCO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

ORIENTADORA:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca

VOGAIS:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

2022

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Ana Rita Ferreira Branco

Título da Tese ou Dissertação: Avaliação da ação repelente dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em ixodídeos parasitas do coelho-bravo com vista ao controlo da Doença Hemorrágica Viral

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2022

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

Clínica

Produção Animal e Segurança Alimentar

Morfologia e Função

Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Resultados obtidos no âmbito de um projeto de investigação, que ainda não foram apresentados em poster e/ou publicados em revista científica.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 25 de julho de 2022

Assinatura:

Ana Rita Branco



(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

“What is there that is not a poison?
All things are poison, and nothing is without poison.
Solely the dose determines that a thing is not a poison.”
Theophrastus Von Hohenheim (Paracelsus) (1493–1541)

Agradecimentos

Agradeço a Deus toda a Sua Criação e Bênçãos; pela oportunidade de seguir o caminho da arte médica veterinária no auxílio dos nossos seres queridos animais e pela descoberta e prática do conhecimento em prol da saúde e bem-estar animal e conservação da natureza.

Agradeço à Mãe Natureza toda a Sua Divina Vida e Beleza que nos acolhe em harmonia e infinita serenidade, inspiração e sustento.

Agradeço a dedicação e o contributo de todos os ilustres, inventores, pioneiros e habilidosos que assinalaram a história por fraternidade e em benefício à humanidade.

Agradeço à minha mãe, ao meu pai, à minha mana, ao meu cunhado e família por toda a ajuda, carinho e por serem o alicerce de tudo.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Doutora Isabel Fonseca por todo o seu acompanhamento, apoio, disponibilidade, dedicação, rigor e contribuição no desenvolvimento deste projeto e todos os seus ensinamentos indispensáveis.

Agradeço ao Mestre Fábio Abade pela iniciativa, atenciosidade e prontidão prestada, pela conceção e design da caixa de acrílico utilizada nos ensaios e toda a sua colaboração fulcral na sequência deste projeto.

Agradeço à Mestre Sara Zúquete pelo auxílio no manuseamento e criação dos ixodídeos e toda a ajuda dada, à Dr.^a Lídia Gomes pelo apoio e zelo e à Dr.^a Elisa Luz pela sua amável disponibilidade.

Agradeço à Prof.^a Doutora Ana Cristina Figueiredo e à Dr.^a Fausta Parracho por toda a atenção facultada e exatidão na compreensão de ideias.

Agradeço a toda equipa do VetOeiras por me terem recebido e proporcionado um período de estágio enriquecedor a vários níveis. Agradeço toda a ajuda, apoio, conhecimento transmitido, partilha, disponibilidade e espírito de equipa; levo comigo as experiências, o exemplo, o brio profissional, a dedicação e o carinho pelos nossos animais!

Agradeço ao CIISA, ao AL4AnimalS, à FMV e a todos os elementos que a representam, pelo apoio e ensino, o qual foi contributo essencial à minha formação e desenvolvimento.

Agradeço aos meus queridos professores por todo o carinho, inspiração e partilha.

Agradeço a vários profissionais da área, em especial à Dr.^a Margarida Raposo por ser uma mentora e partilhar comigo o desafio gratificante que esta profissão outorga.

Agradeço aos meus amigos e colegas que foram, são e serão imprescindíveis.

A todos os animais, os quais me ensinam e me dão tanto, agradeço-os a todos.

A todos os que não mencionei e que fazem parte desta minha jornada, um muito obrigada.

Apoio Financeiro

O trabalho laboratorial do presente projeto foi financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) e pelo Laboratório Associado para Ciência Animal e Veterinária (AL4AnimalS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (UIDB/00276/2020, LA/P/0059/2020) e Projeto MSc - CIISA 3, 2019.



Avaliação da ação repelente dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em ixodídeos parasitas do coelho-bravo com vista ao controlo da Doença Hemorrágica Viral

Resumo

O coelho-bravo, *Oryctolagus cuniculus*, é presa chave para o equilíbrio do ecossistema. Face ao enorme declínio da sua população na Península Ibérica e sendo os ixodídeos um dos vetores do Vírus da Doença Hemorrágica Viral (VDHV), urge a necessidade de criar formas de controlo sustentáveis. Sendo que, a aplicação de repelentes de artrópodes à base de óleos-essenciais (OE) é uma medida crucial e promissora face às exigências ambientais e evidências obtidas.

O presente estudo piloto teve como finalidade avaliar a ação repelente, através de bioensaios *in vitro*, dos OE de *Eucalyptus globulus* e de *Thymus vulgaris*, a 2,5% e 5%, em ninfas e adultos *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

Para a obtenção de espécimes recorreu-se à sua captura e, quando necessário, procedeu-se à sua criação em laboratório. As fêmeas ingurgitadas, *D. marginatus*, submetidas a criação, ao fim de 19 dias do seu acondicionamento, confirmou-se a ovopostura numa das fêmeas, tendo outra iniciado a ovopostura no dia seguinte. Porém, ao fim de 34 e 56 dias na primeira e segunda fêmea respetivamente, os ovos aparentaram estar secos. Em relação às ninfas *H. marginatum* ingurgitadas, constatou-se o início das ecdises 25 dias após terem sido acondicionadas, o qual se prolongou por mais de 45 dias, obtendo cerca de 94,12% de mudas. Este estudo piloto abrangeu 6 bioensaios com 14 *D. marginatus*, 12 *R. sanguineus* e 54 *H. marginatum*. Para avaliar a ação repelente dos OE às espécimes utilizadas, recorreu-se a uma caixa de acrílico com o sistema Hemotek™, sangue de coelho-bravo e alguns estímulos que incitam o comportamento de busca do hospedeiro. No controlo negativo foi utilizado o óleo de coco, *Cocos nucifera*, inodoro. Foi realizada a contagem de ixodídeos em relação à distância ao limite exterior do papel de filtro, a observação da passagem pelo papel de filtro embebido no OE e a contagem de ixodídeos mortos no final de cada ensaio.

Os resultados obtidos indicam que nenhum dos OE, a 2,5% e 5%, conseguiu repelir totalmente os ixodídeos, pois verificou-se a passagem pelo papel de filtro que continha o OE e não foram evitadas todas as aproximações. Porém, parecem sugerir que tenha ocorrido alguma atividade repelente, sendo ligeiramente mais evidente no OE de *T. vulgaris*. Por outro lado, parece ter existido alguma atividade acaricida nos OE testados, em ambas as concentrações. A continuação, amplificação e aprimoramento deste estudo é fulcral para obter um repelente à base de OE, para o controlo de vetores e das doenças transmitidas por estes, com um valor substancial de repelência e passível de ser usado no coelho-bravo, em ambiente selvagem.

Palavras-chave: Ixodídeos, óleo essencial, tomilho, eucalipto, coelho-bravo.

Evaluation of the repellent action of thyme (*Thymus vulgaris*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) essential oils in wild rabbit's parasitic ixodids for Hemorrhagic Viral Disease control

Abstract

The European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, is a key prey for the balance of the ecosystem. Given the huge decline of the population in the Iberian Peninsula and the fact that ixodids are one of the vectors of the Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV), there is an urgent need to create sustainable forms of control. The application of arthropod repellents based on essential oils (EO) is a crucial and promising measure given the environmental requirements and evidence obtained.

The aim of the present pilot study was to evaluate the repellent action of the *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris* EO, both at 2.5% and 5%, used *in vitro* bioassays against nymphs and adults *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus* and *Rhipicephalus sanguineus*.

The specimens were obtained through capture and when necessary, reared under laboratory conditions. Oviposition was observed in two engorged *D. marginatus* females, 19 and 20 days after their conditioning. Additionally, the eggs appeared to be dry after 34 and 56 days for the first and second female respectively. Regarding the engorged nymphs of *H. marginatum*, the beginning of the nymphal ecdysial period was found 25 days after their conditioning, and lasted for more than 45 days. Also, there were 94.12% of ecdysis obtained.

This study comprised 6 trials with 14 *D. marginatus*, 12 *R. sanguineus* and 54 *H. marginatum*. It was used an acrylic box with a Hemotek™ system, European rabbit blood and other types of stimuli to incite the host-seeking behavior. Coconut oil (*Cocos nucifera*) odorless was used as negative control. The number of ixodids was counted taking into account their distance from the outer limit of the filter paper. Also, the passage of the ixodids through the filter papers embedded with the substance under investigation was observed. The dead ixodids were counted at the end of each trial.

The data obtained showed that none of the EO, at 2.5% and 5%, were able to completely repel the ixodids. The ixodids were able to cross the filter papers containing EO. None of the EO were able avoided all approaches. Nonetheless, it seems that some repellent activity was observed, being slightly more evident with the *T. vulgaris* EO. On the other hand, the EO tested, both at 2.5% and 5%, also showed some acaricidal activity.

It is important to improve and to continue the development of this kind of studies to find a suitable EO-based repellent with a substantial repellency value, for the control of vectors and vector-borne diseases, particularly useful in the wild European rabbit population.

Keywords: Ixodid ticks, essential oil, thyme, eucalyptus, European rabbit

Índice

Agradecimentos	iv
Apoio financeiro	v
Índice de figuras	x
Índice de gráficos	xii
Índice de tabelas	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Relatório das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Coelho-bravo	3
2.2. Doença Hemorrágica Viral do Coelho	3
2.2.1. Etiologia	4
2.2.2. Transmissão e disseminação	5
2.2.3. Resistência Viral	5
2.2.4. Patogenia e Principais lesões	6
2.2.5. Formas da DHV e imunidade natural	7
2.2.6. Controlo da doença, erradicação, vigilância, prevenção e tratamento	8
2.3. Ixodídeos	11
2.3.1. As sensilhas e a posição de “questing”	13
2.3.2. Órgão de Haller	13
2.4. Efeitos das substâncias químicas e terminologia de controlo	14
2.4.1. Repelente	16
3. Breve introdução histórica do uso das plantas e o contributo da etnobotânica	17
4. Compostos orgânicos voláteis	17
5. Plantas aromáticas e medicinais e a flora portuguesa	18
6. Óleos essenciais	19
6.1. Interesses e vantagens	20
6.2. Desvantagens e contra-indicações	21
6.3. Composição química e quimiotipos	23
6.4. Atividade repelente e formas de melhorar o tempo de ação	24
6.5. Óleo essencial de eucalipto	26
6.6. Óleo essencial de tomilho	27

II.	AVALIAÇÃO DA AÇÃO REPELENTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM IXODÍDEOS PARASITAS DO COELHO-BRAVO COM VISTA AO CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL	
1.	Objetivos.....	29
2.	Materiais e métodos.....	29
2.1.	Captura e identificação de ixodídeos.....	29
2.1.1.	Criação de ixodídeos em laboratório.....	30
2.1.2.	Caixa de acrílico com os sistemas de alimentação Hemotek™.....	32
2.1.3.	Sistema de alimentação de membrana Hemotek™ 5W1.....	34
2.1.4.	Óleos essenciais e a sua diluição e o controlo negativo.....	34
2.1.5.	Preparatórios dos ensaios.....	35
3.	Análise estatística descritiva e metodologia de análise.....	39
4.	Resultados.....	39
4.1.	Caracterização e composição das amostras.....	39
4.2.	Criação de <i>D. marginatus</i> em laboratório.....	40
4.3.	Criação de <i>H. marginatum</i> em laboratório.....	42
4.4.	Ensaio laboratoriais com o OE de <i>E. globulus</i> e o OE de <i>T. vulgaris</i>	43
4.4.1.	Ensaio nº1 - ação do OE de <i>E. globulus</i> a 2,5% em <i>H. marginatum</i>	44
4.4.2.	Ensaio nº2 – ação do OE de <i>E. globulus</i> a 2,5% em <i>D. marginatus</i> e <i>R. sanguineus</i>	46
4.4.3.	Ensaio nº 3 – ação do OE de <i>T. vulgaris</i> a 2,5% em <i>H. marginatum</i>	48
4.4.4.	Ensaio nº 4 – ação do OE de <i>E. globulus</i> a 5% em <i>H. marginatum</i> e <i>R. sanguineus</i>	50
4.4.5.	Ensaio nº 5 – ação do OE de <i>T. vulgaris</i> a 5% em <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i>	52
4.4.6.	Ensaio nº 6 – ação do óleo de coco inodoro em <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i>	54
5.	Discussão.....	56
5.1.	Captura, identificação e criação dos ixodídeos.....	56
5.2.	Ensaio com o OE de <i>E. globulus</i> diluído a 2,5% e a 5%.....	59
5.3.	Ensaio com o OE de <i>T. vulgaris</i> diluído a 2,5% e 5%.....	60
5.4.	Controlo negativo e controlo positivo.....	61
5.5.	Considerações do estudo piloto.....	62
6.	Limitações do estudo.....	64
III.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	65
IV.	BIBLIOGRAFIA.....	67
V.	ANEXOS.....	73

Índice de Figuras

Figura 1. Aspeto de epistaxis num coelho com DHV (Dr. J.P. Teifke, Federal Research Institute for Animal Health, Riems, Germany).	8
Figura 2. Microfotografia electrónica de varrimento ilustrando a superfície dorsal e o órgão terminal (apotele) do I tarso de <i>Dermacentor variabilis</i> do livro “Biology of ticks” dos autores Sonenshine e Roe (2014).....	14
Figura 3. Aspeto do sistema de hidrodestilação laboratorial, com o aparelho de Clevenger (a). Figueiredo et al. (2017c).....	19
Figura 4. Eucaliptos (<i>E. globulus</i>) numa área florestal, em Leiria, Portugal (Fotografia original).	27
Figura 5. Tomilhos (<i>T. vulgaris</i>) em cultivo em Évora, Portugal (Fotografia de Aromáticas d’ Palma).....	28
Figura 6. Captura de ixodídeos com recurso ao método de arrastamento de bandeira (Fotografia original).	30
Figura 7. Aspeto das fêmeas ingurgitadas e dos frascos “greiner bio-one” (Fotografias originais).	31
Figura 8. Aspeto das ninfas ingurgitadas em frascos após a sua colheita e posteriormente colocadas numa placa de Petri e uma ninfa numa placa de Petri para observação com o estereomicroscópio binocular (Fotografias originais).	31
Figura 9. Aspeto de uma fêmea ingurgitada no interior do frasco, antes e após a sua colocação estufa incubadora, interior e o manuseio da estufa, frascos tapados contendo as ninfas no seu interior e frascos e placas de Petri contendo os ixodídeos no interior da estufa (e) (Fotografias originais)..	32
Figura 10. Aspeto da caixa de acrílico e do sistema Hemotek™ (Fotografias originais).	33
Figura 11. Aspeto do sistema Hemotek™ (Fotografias originais).	34
Figura 12. Tubos com EDTA contendo o sangue de coelho-bravo, recipiente de refeição, película “Parafilm® “M” esticada com o anel de vedação “O-rings”, enchimento do recipiente de refeição com sangue, medição da temperatura da placa de aquecimento com o termómetro digital (Fotografias originais).	36
Figura 13. Aspeto do pelo de coelho-bravo sobre o anel de papel de filtro embebido em óleo de coco e do anel de papel de filtro embebido em OE de <i>T. vulgaris</i> a 2,5% (Fotografias originais).	37
Figura 14. Aspeto de uma fêmea <i>Ixodes spp.</i> ingurgitada e de uma fêmea <i>Ixodes spp.</i> , não ingurgitada, parasitas de um cão (Fotografias originais).....	40
Figura 15. Fotografias das fêmeas <i>D. marginatus</i> em oviposição (Fotografias originais).....	40
Figura 16. Aspeto da primeira fêmea em ovopostura (Fotografias originais).	41
Figura 17. Aspeto do estereomicroscópio binocular, da fêmea <i>D. marginatus</i> após 23 dias de se constatar a perda de brilho dos ovos e após 56 dias de se verificar o início da ovopostura (Fotografias originais).....	41
Figura 18. Aspeto das ecdises de <i>H. marginatum</i> 32 dias, 38 dias, 45 dias e 39 dias após terem sido colocados na estufa (Fotografias originais).	42
Figura 19. Aspeto de um <i>H. marginatum</i> em posição de “questing”, a 2 cm de distância do anel de papel de filtro embebido no OE <i>E. globulus</i> a 5%.	51

Figura 20. Aspeto de um <i>H. marginatum</i> a interagir com o pelo que se encontrava por cima do papel de filtro do controlo negativo	51
Figura 21. Aspeto de dois ixodídeos, um em repouso e o outro em movimento, sobre o anel de papel de filtro embebido com o óleo de coco inodoro.	55
Figura 22. Morfologia externa de espécimes de <i>R. sanguineus</i>	80
Figura 23. Morfologia externa de espécimes de <i>H. marginatum</i>	80
Figura 24. Morfologia externa de espécimes de <i>D. marginatus</i>	80

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Média do número de <i>H. marginatum</i> por intervalo de distância (ensaio nº1).....	45
Gráfico 2. Média do número de <i>D. marginatus</i> e <i>R. sanguineus</i> por intervalo de distância (ensaio nº2).....	47
Gráfico 3. Número de <i>D. marginatus</i> e <i>R. sanguineus</i> imóveis, desde a sua colocação, ao longo do tempo (ensaio nº2).....	47
Gráfico 4. Média do número de <i>H. marginatum</i> por intervalo de distância (ensaio nº 3).....	49
Gráfico 5. Número de <i>H. marginatum</i> imóveis, desde a sua colocação, ao longo do tempo (ensaio nº 3).....	49
Gráfico 6. Média do número de <i>H. marginatum</i> e <i>R. sanguineus</i> por intervalo de distância (ensaio nº 4).....	51
Gráfico 7. Média do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> por intervalo de distância (ensaio nº 5).....	53
Gráfico 8. Média do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> por intervalo de distância (ensaio nº 6).....	55

Índice de Tabelas

Tabela 1. Possíveis efeitos na locomoção, repouso, fertilidade, acasalamento, postura, sobrevivência e alimentação dos artrópodes na presença de determinada substância química.	15
Tabela 2. Definições propostas por Halos et al. (2012) para um glossário de terminologia do controlo de carraças.....	15
Tabela 3. Objetivos gerais e número, género, modo de captura e origem dos ixodídeos usados relativamente a cada ensaio.....	38
Tabela 4. Número de ixodídeos por espécie, sexo ou fase evolutiva e a soma total e cálculo da percentagem	39
Tabela 5. Informações e alguns resultados relativos a cada ensaio.	43
Tabela 6. Registo do número de <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de <i>E. globulus</i> a 2,5%	44
Tabela 7. Registo do número de <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo.....	44
Tabela 8. Registo do número de <i>H. marginatum</i> imobilizados no centro da caixa	44
Tabela 9. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>R. sanguineus</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de <i>E. globulus</i> a 2,5%	46
Tabela 10. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>R. sanguineus</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo	46
Tabela 11. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>R. sanguineus</i> imobilizados no centro da caixa.....	46
Tabela 12. Registo do número de <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de <i>T. vulgaris</i> a 2,5%	48
Tabela 13. Registo do número de <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo.....	48
Tabela 14. Registo do número de <i>H. marginatum</i> imobilizados no centro da caixa	48
Tabela 15. Registo do número de <i>H. marginatum</i> e <i>R. sanguineus</i> , e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de <i>E. globulus</i> a 5%	50
Tabela 16. Registo do número de <i>H. marginatum</i> e <i>R. sanguineus</i> , e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo	50
Tabela 17. Registo do número de <i>H. marginatum</i> e <i>R. sanguineus</i> imobilizados no centro da caixa.....	50
Tabela 18. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de <i>T. vulgaris</i> a 5%	52
Tabela 19. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo	52
Tabela 20. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> imobilizados no centro da caixa em determinados minutos (min) desde o início do ensaio.	52
Tabela 21. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o óleo de coco inodoro	54

Tabela 22. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro sem nenhuma substância	54
Tabela 23. Registo do número de <i>D. marginatus</i> e <i>H. marginatum</i> imobilizados no centro da caixa.....	54
Tabela 24. Extrações do OE, definidas internacionalmente, por destilação ou processo mecânico.....	74
Tabela 25. Lista de material utilizado e respetivas especificações.	78

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ATP - Adenosina 5'- trifosfato

CDC - Centros de Controlo e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

CID - Coagulação Intravascular Disseminada

CVMP - Comité dos Medicamentos para Uso Veterinário

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

DEET - N,N-dietil-3-metilbenzamida

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DHV - Doença Hemorrágica Viral do Coelho

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMA - Agência Europeia de Medicamentos (do inglês *European Medicines Agency*)

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês *United States Environmental Protection Agency*)

FDA - *Food and Drug Administration*

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

ISO - *International Organization for Standardization*

ICNF - Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

INIAV, I. P. - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P.

VM - Vírus da mixomatose

OE - Óleo(s) Essencial/Essenciais

OIE/WHOA - Organização Mundial de Saúde Animal (do francês *Office International des Epizooties*) atual WHOA (do inglês *World Organisation for Animal Health*)

PAM - Plantas Aromáticas e Medicinais

PMD - p-mentano- 3,8-diol

RCVs - Calicivírus não patogénicos de coelhos (do inglês *nonpathogenic rabbit caliciviruses*)
spp. - espécies

VDHV - Vírus da Doença Hemorrágica Viral (genogrupos G1 – G5)

VDHV_a - Vírus da Doença Hemorrágica Viral (genogrupo G6)

VDHV₂ - Vírus da Doença Hemorrágica Viral estirpe 2

VLPs - Partículas do Tipo Viral (do inglês *virus-like particles*)

VP60 - Proteína Estrutural Maioritária da Cápside (60 Kda)

I. INTRODUÇÃO

1. Relatório das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O estágio curricular, incluído no décimo primeiro semestre da estrutura curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi desenvolvido na área científica de Sanidade Animal. O mesmo foi dividido em duas instituições: o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Departamento de Sanidade Animal (DAS) na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, situada no Pólo Universitário da Ajuda e no Hospital Veterinário VetOeiras, situado em Oeiras. Este decorreu no período de 11 de outubro de 2019 a 12 de setembro de 2020, tendo existido uma suspensão entre 12 de março de 2020 a 2 de julho de 2020 face à situação excecional e medidas de saúde pública. Cumpriram-se cerca de 1122 horas, sob orientação da Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca.

O estágio concretizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias deu origem à presente dissertação, este iniciou a 11 de outubro de 2019 e terminou a 27 de julho de 2020. O qual teve como orientação e coordenação a Professora Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca e colaboração o Mestre Fábio Alexandre Abade dos Santos e como finalidade desenvolver o projeto “*Development of an arthropod vector repellent using microencapsulated plant essential oils*” financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

As atividades desenvolvidas permitiram a elaboração de um desenho experimental, a captura de ixodídeos de vida livre utilizando o método de arrastamento de bandeira e diretamente em animais parasitados, o acondicionamento de ixodídeos vivos e mortos, a criação de ixodídeos com possibilidade de monitorizar as ecdises e as ovoposturas, a identificação de espécimes de ixodídeos com o auxílio de um estereomicroscópio binocular com recurso a chaves dicotómicas, o conhecimento sobre as características morfo-anatómicas e do ciclo de vida de diferentes ixodídeos e a testagem de substâncias com possível ação repelente contra ixodídeos utilizando um método *in vitro*. Conferindo assim, a aquisição e consolidação de aptidões da prática laboratorial, o treino e aprofundamento de conhecimentos na área de Parasitologia e o dinamismo do raciocínio e do método científico.

O estágio realizado no Hospital Veterinário VetOeiras sob a coordenação do Dr. José Diogo Gonçalves dos Santos, iniciou a 3 de fevereiro de 2020 e terminou a 12 de setembro de 2020. Este teve um horário compreendido em turnos com rotatividade semanal. Sendo que existia um turno rotativo das 9h00min às 17h00min e outro das 16h00min às 24h00min durante a semana e um turno atribuído por escala das 9h00min às 24h00min ao sábado com folga na segunda-feira seguinte.

Nesse período, a estagiária teve a oportunidade de auxiliar e participar nas diferentes áreas clínicas em contexto hospitalar e na unidade de fisioterapia e reabilitação sob a

supervisão de um médico veterinário. As diferentes áreas acompanhadas foram medicina interna, reprodução e obstetrícia, neurologia, endocrinologia, oncologia, imagiologia, fisioterapia e reabilitação, cardiologia, cirurgia, anestesiologia, odontologia, urgências e cuidados intensivos, internamento, dermatologia, ortopedia e oftalmologia, em pequenos animais e animais exóticos.

Desta forma, foi possível acompanhar e auxiliar nas consultas, na contenção dos animais, na obtenção da anamnese, na realização de exames físicos, na colheita de amostras e sua posterior análise ou requisição a laboratórios externos, na realização de meios de diagnóstico complementares e na discussão de casos clínicos. Do mesmo modo, permitiu executar o acompanhamento pré-cirúrgico, cirúrgico e pós-cirúrgico e a monitorização anestésica, a preparação e a administração de fármacos, a monitorização de animais em tratamento e em estado crítico. Ao mesmo tempo, foi oportuno assistir e auxiliar em múltiplas cirurgias, muitas das quais de referência e com a junção de técnicas de anestesia locorregional.

Por fim e não menos importante, foi proporcionada a aprendizagem de ser resiliente, do valor do espírito de equipa e do poder da comunicação, clara e eficiente, com diferentes detentores de animais e equipa de trabalho.

Em síntese, este período de estágio interdisciplinar possibilitou o desenvolvimento de um projeto científico em Parasitologia e a integração numa equipa hospitalar de referência, aplicando e desenvolvendo conhecimentos teóricos e práticos de Medicina Veterinária.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Coelho-bravo

O coelho-bravo, *Oryctolagus cuniculus*, é um mamífero nativo da Península Ibérica e considerado basilar nos ecossistemas mediterrânicos, uma vez que, é presa essencial para vários predadores (ICNF 2017). Desta forma, contribui para a recuperação de predadores ameaçados, como o lince ibérico, *Lynx pardinus*, e a águia-imperial-ibérica, *Aquila adalberti* (ICNF 2017; Spickler 2020).

Saliente-se ainda que, é uma espécie cinegética ibérica que assume importância no sector venatório a nível socioeconómico e na gestão de recursos, vital para assegurar o equilíbrio ecológico (ICNF 2017).

Todavia, estima-se que as suas populações tenham sofrido um declínio aproximado de 80% da sua população original devido a distintos fatores (ICNF 2017; Spickler 2020). Os quais incluem epizootias graves, a Mixomatose e a Doença Hemorrágica Viral do Coelho (DHV) (ICNF 2017).

2.2 Doença Hemorrágica Viral do Coelho

A DHV “foi descrita pela primeira vez em 1984, na China” segundo Liu et al. (1984), citado por Ohlinger et al. (1990, p. 3331). A DHV é uma doença viral emergente do coelho europeu, selvagem e doméstico (*O. cuniculus*) altamente contagiosa que origina uma hepatite aguda fatal (Le Gall-Reculé et al. 2013; OIE 2018; Gleeson and Petritz 2020).

Os surtos de DHV têm ocorrido tanto na Europa como em outras partes do mundo, os quais ocasionam perdas económicas e prejuízos na vida selvagem (Gleeson and Petritz 2020). Atualmente, é enzoótica nas populações selvagens da Europa (Le Gall-Reculé et al. 2013), da Austrália e da Nova Zelândia, sendo que nestes dois últimos foi introduzido como agente de biocontrolo (Kovaliski 1998) e, portanto, o seu impacto é aceite como favorável (Gleeson and Petritz 2020).

Esta doença constitui uma importante causa de mortalidade, em que uma proporção variável de coelhos morre de acordo com a estirpe do vírus da DHV; 70-90% com o Vírus da Doença Hemorrágica Viral (genogrupos G1 – G5) (VDHV) ou com o Vírus da Doença Hemorrágica Viral (genogrupo G6) (VDHV_a) e 5-70% com o Vírus da Doença Hemorrágica Viral estirpe 2 (VDHV₂) (OIE 2018; Gleeson and Petritz 2020), e de alta morbidade (OIE 2018). Por conseguinte, é notificável pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE/WHO) (Gleeson and Petritz 2020).

2.2.1 Etiologia

O agente etiológico da DHV é o vírus da doença hemorrágica viral dos coelhos (VDHV), um calicivírus pertencente ao género *Lagovirus* e à família Caliciviridae (Ohlinger et al., 1990; Gall-Reculé et al. 2013; Hall et al. 2017), assim como, o vírus da síndrome da lebre castanha europeia (EBHSV) e outros calicivírus não patogénicos de coelhos (RCVs) (Hall et al. 2017; Gleeson and Petritz 2020).

O VDHV é hemaglutinante conquanto não é passível de cultivo *in vitro* (Capucci et al. 1998). O virião sem envelope é pequeno com aproximadamente 35 a 40 nm (Ohlinger et al., 1990; Capucci et al. 1998; Gall-Reculé et al. 2013; Gleeson and Petritz 2020). O genoma é composto por RNA de cadeia simples (ss) com polaridade positiva (RNA +), o capsídeo possui uma simetria icosaédrica e a proteína estrutural maioritária é a VP60 (Xu and Chen 1989; Ohlinger et al., 1990; Capucci et al. 1998; Gall-Reculé et al. 2013; Gleeson and Petritz 2020).

Assim como outros vírus de RNA, o calicivírus apresenta uma alta taxa de mutação genética e por isso pode-se aplicar-lhes o conceito de 'quasispecies' (Capucci et al. 1998).

Os dados epidemiológicos e a comparação genética e antigénica indicam a existência de três grupos principais de VDHV (OIE 2018):

- i. o VDHV clássico, abrangendo os genogrupos G1-G5, relatado pela primeira vez na República Popular da China em 1984 segundo Liu et al. (1984), citado por OIE (2018, p. 1390). O qual foi relatado em mais de 40 países da Europa, África, Ásia, América e Oceânia, sendo endémico na sua maioria (OIE 2018);
- ii. o subtipo VDHVa/Genogrupo 6 identificado na Europa em 1996 (Capucci et al., 1998; Schirrmeier et al., 1999) e atualmente também notificado na América, Oceânia e Ásia (OIE 2018);
- iii. a nova variante de VDHV, provisoriamente denominado por VDHV2 ou VDHVb, uma variante emergente que substitui o VDHVa clássico como estirpe primária das populações da Europa e Austrália (Gall-Reculé et al. 2013; Gleeson and Petritz 2020; Spickler 2020). Esta variante foi detetada em 2010, na França, e provocou a morte, tanto de coelhos vacinados contra a DHV como de coelhos selvagens (Le Gall-Reculé et al. 2011; Gall-Reculé et al. 2013) e, rapidamente se propagou pela bacia do Mediterrâneo (Malta e Tunísia) e Austrália (OIE 2018).

De acordo com Le Gall-Reculé et al. (2013), o VDHV2 não derivou do VDHV clássico, ainda que tenha surgido de modo desconhecido e emergencial. E em contraste com o VDHV e o EBHSV, que são estritamente específicos e restritos ao *Oryctolagus* e ao *Lepus* respetivamente (Hall et al. 2017), a variante VDHV2 também foi relatada em várias espécies do género *Lepus* (Le Gall-Reculé et al. 2011), como, por exemplo, a *Lepus europaeus* (Hall

et al. 2017). Spickler (2020) enuncia que o VDHV e o VDHV2 pertencem a serotipos diferentes e há pouca ou nenhuma proteção cruzada (Spickler 2020).

2.2.2 Transmissão e disseminação

A transmissão viral ocorre por contato direto através de animais infetados, carcaças, fluidos corporais (por exemplo, urina, fezes e secreções respiratórias) e pelos, e por contato indireto através de fômites (por exemplo, alimentos contaminados) e vetores (por exemplo, insetos) (Gleeson and Petritz 2020; Spickler 2020). Verifica-se também que a via principal de transmissão é a via oral (Marcato et al. 1991; OIE 2018; Spickler 2020), seguida da conjuntival, aerógena e pele (por exemplo, traumas cutâneos) (Marcato et al. 1991).

É de realçar que os insetos vetores são considerados uma fonte importante de infecção ou transmissão; e com frequência o modo de propagação do vírus à distância (Kovaliski 1998; OIE 2018; Spickler 2020). E segundo os autores Naumann et al. (1991), citados por Kovaliski (1998, p. 427), a existência de variações nos surtos de DHV pode dever-se à influência do clima na atividade e migração dos insetos vetores.

Do mesmo modo, existem evidências na Europa que sugerem que outros hospedeiros, não suscetíveis ao VDHV, nomeadamente predadores como as raposas, *Vulpes vulpes*, e os cães, *Canis lupus familiaris*, possam ser vetores mecânicos, segundo os autores Delcarmen et al. (1994), citado por Kovaliski (1998, p. 427). Sob o mesmo ponto de vista, Spickler (2020) descreve que as aves e os mamíferos que se alimentam de coelhos infetados podem ser portadores mecânicos e excretar nas fezes o vírus viável.

2.2.3 Resistência Viral

Sabe-se que a sobrevivência do vírus é influenciada pela temperatura ambiente (Marcato et al. 1991); e que os calicivírus são altamente resistentes ao meio ambiente, ao congelamento e à decomposição das carcaças (Gleeson and Petritz 2020). Ademais, os lagovírus dos coelhos quando estão protegidos por tecidos orgânicos são muito resistentes à inativação, como, por exemplo, em um estudo o VDHV permaneceu viável por 20 dias em carcaças de coelhos em decomposição, mantidas a 22 °C (Spickler 2020). Por outro lado, quando o VDHV se dispersa nas excreções e é inexistente a matéria orgânica, fica viável durante algumas semanas, podendo perder parte da sua infecciosidade em 1 a 2 semanas (Spickler 2020). Spickler (2020) menciona também que o VDHV pode sobreviver à exposição de 50 °C por uma hora, ao pH de 3,0 e a ciclos de congelamento-descongelamento.

2.2.4 Patogenia e Principais lesões

A DHV é caracterizada principalmente por uma evolução hiperaguda ou aguda (apenas cerca de 5-10% dos coelhos apresentam um curso clínico subagudo-crônico) segundo a OIE (2018) e os autores Cancellotti et al. (1989), citados por Marcato et al. (1991, p. 372).

O período de incubação da DHV, por VDHV/VDHVa, varia entre 1 a 3 dias e a morte comumente sucede 12h-36h após o início da pirexia (> 40 °C) (Abrantes et al. 2012; OIE 2018).

Os láparos são suscetíveis à doença a partir da 5^a-6^a semana de vida, até à qual são por natureza resistentes (Gall-Reculé et al. 2013; OIE 2018). E a sua suscetibilidade aumenta progressivamente até à 8^a/9^a semana, quando estes tornam-se totalmente vulneráveis, antes desse período a infeção é subclínica (Gall-Reculé et al. 2013). É de salientar que, o curso da infeção mencionado acima, diz respeito à infeção por VDHV clássico ou VDHVa, no entanto, quando o agente etiológico é o VDHV2, os láparos com mais de 15-20 dias de idade apresentam sinais clínicos e podem sucumbir (OIE 2018).

A virémia e a replicação viral são responsáveis pelo dano endotelial sistémico e pela necrose grave dos hepatócitos, que podem resultar na ativação massiva dos mecanismos de coagulação do sangue; os quais traduzem-se num processo de coagulação intravascular disseminada (CID) e/ou hemorragias, podendo culminar num choque fatal (Marcato et al. 1991). Em outras palavras, Marcato et al. (1991) descrevem que a inflamação e necrose do fígado, são o fator central da patogénese da doença e acrescentam que, a reação antígeno-anticorpo é responsável por provocar trombozes microvasculares e subsequente necrose hepática. Marcato et al. (1991) referem que a morte súbita é a consequência da falência multiorgânica, resultante do edema, congestão e hemorragia pulmonar, necrose do córtex adrenal, alterações circulatórias nos rins e necrose hepática.

De modo análogo, os achados anatomo-histopatológicos são essencialmente devido à insuficiente coagulação, resultante da síndrome de CID; por conseguinte há congestão e hemorragia generalizada nos diferentes órgãos e tecidos, tais como, a traqueia, os pulmões, o fígado, os rins, o intestino, entre outros (Marcato et al. 1991). Além disso, Marcato et al. (1991) salientam que o fígado é o órgão mais afetado, o qual apresenta lesões necróticas e inflamatórias resultantes do efeito citolítico direto do agente etiológico e das trombozes microvasculares que este suscita indiretamente. De igual maneira, descrevem que as lesões microscópicas do fígado são as de maior significado diagnóstico e que é possível observar icterícia no tecido subcutâneo e nas orelhas (Marcato et al. 1991).

Assim sendo, a alta correlação entre os achados histológicos típicos de hepatite, a deteção da proteína viral por imunohistoquímica e a deteção de viriões por imuno-electromicroscopia são de grande valor de diagnóstico (Marcato et al. 1991).

2.2.5 Formas da DHV e imunidade natural

A DHV pode apresentar-se clinicamente sob a forma hiperaguda, aguda ou subaguda.

A forma hiperaguda observa-se no primeiro surto numa população suscetível (Marcato et al. 1991). Os coelhos infetados morrem subitamente e por norma, sem manifestar qualquer sinal clínico (Marcato et al. 1991). Porém, de forma esporádica, podem apresentar hematúria, hemorragia vaginal e/ou epistaxis espumosa (Figura 1) (Marcato et al. 1991).

A forma aguda é altamente prevalente em áreas epidémicas, afetando coelhos adultos ou jovens com mais de dois meses de idade (Marcato et al. 1991). Os coelhos infetados normalmente exibem depressão, anorexia e relutância ao movimento, com base no Xu ZJ e Chen (1988), citado por Xu e Chen (1989). Nos primeiros estados da doença e quando esta se está a desenvolver, com frequência, a temperatura corporal atinge ou excede os 41 °C; e em estados terminais a temperatura corporal diminui para valores abaixo do valor normal, com base no Xu ZJ e Chen (1988), citado por Xu e Chen (1989). Ademais, na maioria dos casos ocorre taquipneia e cianose da pele e mucosas e em alguns casos, observa-se distensão abdominal, constipação ou diarreia e hematúria, de acordo com o Chen (1986), citado por Xu e Chen (1989). Eventualmente, poderão ficar em decúbito lateral e mover os membros em “pedale”; e nos momentos que precedem a morte, alguns coelhos poderão demonstrar bastante agitação e emitir vocalizações ou perecerem durante as convulsões, de acordo com o Chen (1986), citado por Xu e Chen (1989). De acordo com o Xu et al. (1985) citado por Xu e Chen (1989), mencionam que cerca de 20% dos coelhos apresentam epistaxis espumosa (Figura 1). Do mesmo modo, o curso agudo da doença decorre entre 12h a 36 h de acordo com o Chen (1986), citado por Xu e Chen (1989). Além disso, Marcato et al. (1991) acrescentam que, em alguns casos, após algumas semanas da recuperação, sofrem de icterícia grave das mucosas seguida da morte.

A forma subaguda ocorre nas fases posteriores a um curso epidémico (Marcato et al. 1991). O quadro clínico é semelhante ao observado na forma aguda; os coelhos manifestam depressão, anorexia e pirexia durante 2 a 3 dias, de acordo com o Chen (1988) citado por Xu e Chen (1989) e, em geral, sobrevivem ficando resistentes à reinfeção (Marcato et al. 1991). O hemograma, com frequência, revela leucopenia grave de acordo com o Chen (1986) citado por Xu e Chen (1989). A leucopenia ocorre pela diminuição de cerca de 39% do número total de linfócitos, contudo, já foram reportados, ocasionalmente, coelhos infetados com leucocitose de acordo com o Chen et al. (1987) citado por Xu e Chen (1989). Paralelamente, a OIE (2018) evidencia que a forma subclínica-crónica é caracterizada por icterícia grave e generalizada, perda de peso e letargia; e a morte poderá ocorrer após 1 a 2 semanas, porém, em alguns casos, é verificada a seroconversão e a sobrevivência.

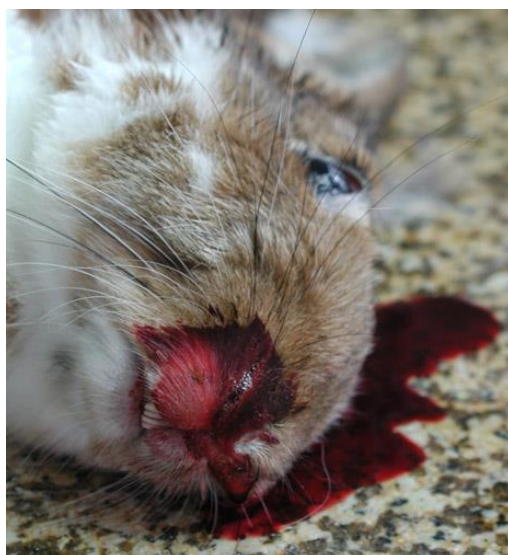


Figura 1. Aspeto de epistaxis num coelho com DHV (Fotografia original de Dr. J.P. Teifke, Federal Research Institute for Animal Health, Riems, Germany, com o crédito e permissão de Center for Food Security and Public Health at Iowa State University, College of Veterinary Medicine).

Realça-se que após a infeção natural a imunidade é robusta (OIE 2019), já que os coelhos que sobrevivem desenvolvem títulos elevados de anticorpos anti-VDHV (Ohlinger et al. 1990) e esta mantém-se por um longo período de tempo, superior a 1 ano (OIE 2018). Além disso, como o vírus é resistente no ambiente e a doença torna-se endémica nas populações, é provável que os coelhos recuperados sejam incessantemente expostos ao vírus para estimular de novo a imunidade (OIE 2019).

2.2.6 Controlo da doença, erradicação, vigilância, prevenção e tratamento

A fim de conter o(s) surtos(s) em zonas livres da doença, é fulcral que haja uma resposta célere (Spickler 2020). Quando se suspeita ou se encontra um caso de DHV deve-se seguir as diretrizes nacionais e/ou locais para a sua notificação (Spickler 2020).

Os países livres da doença poderão colocar restrições na importação dos lagomorfos (animal vivo, carcaça e outros produtos derivados) de áreas endémicas, uma vez que devido à resistência do vírus, a importação poderá ser um meio significativo de disseminação para outras regiões geográficas (Gleeson and Petritz 2020).

Ainda que a erradicação seja impossível (Vaz et al. 2018), a vacinação de coelhos de estimação ou de cunicultura, está integrada no controlo indireto da doença em países endémicos (OIE 2018). As vacinas disponíveis são para o VDHV2, VDHV/VDHV_a ou ambos os serotipos (vacinas bivalentes) (Spickler 2020). Para tal, desde 2015, é utilizada uma vacina inativada de suspensão hepática clarificada preparada a partir de fígados de coelhos infetados de forma experimental, inicialmente administrada duas vezes com um intervalo de 2 semanas, e posteriormente inoculada anualmente (OIE 2018; OIE 2019). Os coelhos vacinados criam

rapidamente uma imunidade protetora e estável (OIE 2018).

Mediante o exposto, a OIE (2018) sugere a vacinação combinada com ambos antigénios ou homóloga à estirpe de VDHV causal. Por outro lado, a vacinação dos coelhos de produção é dispensável quando são aplicadas boas práticas de biossegurança e não existem surtos na área em que se inserem, já que vivem um curto período, cerca de 80 dias, e possuem resistência inata à doença até à 6^a-8^a semanas para VDHV/VDHV_a, sem incluir o VDHV₂ (OIE 2018).

Em muitos países, as vacinas de VDHV ou VDHV_a, estão disponíveis comercialmente e são comumente utilizadas. Já, as vacinas para o VDHV₂ foram registadas em França e Espanha (OIE 2019). Não obstante podem ser preparadas e utilizadas autovacinas (OIE 2019).

Em França, foi desenvolvida e logo comercializada em alguns países europeus, uma vacina que combina uma vacina tradicional inativada contra a DHV e uma vacina viva atenuada do vírus mixoma (VM) para administração intradérmica (OIE 2018). Do mesmo modo, também foi desenvolvida e está disponível no mercado, uma vacina recombinante com o VM atenuado que expressa a VP60 do VDHV, e foi demonstrado que protege contra o VDHV e o VM (OIE 2018). Além disso, a administração de extratos de *Nicotiana clevelandii* infetadas com a quimera PPV-NK VP60 com extratos de folhas de batatas portadoras do promotor 35S modificado, induziram uma eficiente resposta imunitária para o VDHV (OIE 2018). Porém, até ao momento, as vacinas com o uso de plantas transgênicas não foram registadas e, portanto, não estão disponíveis no mercado (OIE 2018).

É de realçar que o nível de proteção cruzada induzida pela vacinação com as vacinas VDHV/VDHV_a é baixo ou nulo para a nova variante VDHV₂, uma vez que não previne infeções para este novo vírus, nem perdas resultantes (OIE 2018; Vaz et al. 2018; Spickler 2020). Portanto, por ser um subtipo antigénico distante ou mesmo um segundo serotipo de VDHV, é recomendado que a vacinação seja combinada com ambos os tipos antigénicos ou que se utilize uma vacina homóloga à estirpe de VDHV identificada durante a epidemia ou surto (OIE 2018). Além disso, as vacinas inativadas específicas para VDHV₂ existentes no mercado, induzem imunidade de curta duração, entre 6 a 12 meses (Vaz et al. 2018).

Todavia, a aplicação destas vacinas para o controlo da mixomatose e da DHV nas populações cinegéticas revela-se pouco eficaz por muitas razões (Vaz et al. 2018), como, por exemplo, requiere a captura, recaptura e manipulação de cada animal, com o risco de poder causar a morte; não existe transmissão horizontal da resistência adquirida; é limitada e reduzida a transmissão vertical da imunidade; necessita-se de revacinações periódicas de 6 a 12 meses; é necessário que os coelhos estejam sãos com uma boa condição física e sem parasitas, e que não lhes seja provocado stress, para assegurar uma boa resposta imunitária (Vaz et al. 2018).

Assim sendo, em Portugal, as vacinas atualmente disponíveis e autorizadas para a prevenção da DHV, incluindo a VDHV2, e a mixomatose, são adequadas apenas à cunicultura, às detenções de coelho doméstico como animal de companhia ou para consumo privado e às explorações de produção cinegética do coelho-bravo (Vaz et al. 2018).

No nosso país, na sequência do Despacho nº 4757/2017, de 31 de Maio, foi criado o Grupo de Trabalho +Coelho coordenado pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I. P.), através do qual foi elaborado e colocado em curso um “Plano de Ação para o Controlo da DHV dos coelhos” com o propósito de inverter o declínio contínuo das populações de coelho-bravo (Vaz et al. 2018). A par disso, o projeto +Coelho, pretende criar uma vacina de administração oral, para a estirpe VDHV2, de partículas do tipo viral (VLPs), contendo apenas a cápside, (Vaz et al. 2018). Esta poderá ser ajustável à evolução das estirpes de campo de VDHV2 e por conter apenas a cápside, é considerada inócua e segura, tendo em conta que não há libertação do vírus com capacidade de infectar ou de material genético, RNA, do vírus na natureza (Vaz et al. 2018). Ademais, permite que, quando se suspende a vacinação por 6-12 meses, o rasto imunológico induzido é eliminado, possibilitando avaliar, através de testes serológicos, se os vírus continuam em circulação (Vaz et al. 2018). A forma oral é apropriada para o coelho-bravo em liberdade, pois permite ser misturada com um isco e colocada à disposição no campo, em zonas onde foi detetada a presença do vírus, deixando de ser necessário a captura e a manipulação dos animais (Vaz et al. 2018).

No processo de erradicação, procede-se a medidas de supressão tais como o descarte seguro de carcaças e o despovoamento, o vazio sanitário, a desinfecção das instalações, o conjunto de boas práticas no repovoamento da exploração (por exemplo, quarentenas estritas), contudo quando o vírus estiver estabelecido na natureza é inexequível a sua erradicação (OIE 2018; Spickler 2020). Para verificar a persistência da DHV, interrompe-se a estratégia de vacinação num número variável de coelhos, começando com um pequeno grupo de sentinela (OIE 2018; Spickler 2020). E mesmo que se alcance a erradicação, é necessário desenvolver e/ou participar de redes de vigilância epidemiológica (Spickler 2020).

Em Portugal, conforme o “Manual de Boas Práticas Sanitárias” no âmbito do Projeto +Coelho, recomendam-se também várias medidas sanitárias para a prevenção, para evitar a disseminação viral e a contaminação ambiental e para o controlo dos principais agentes patogénicos que afetam a lebre, *Lepus granatensis*, e o coelho-bravo (*O. cuniculus*) (Vaz et al. 2018). Em áreas onde está confirmada a circulação do vírus, podem-se aplicar as seguintes medidas sanitárias: averiguar a mortalidade, remover e enviar os cadáveres para pontos de recolha definidos pelo projeto +Coelho, incentivar a vacinação dos coelhos domésticos de áreas próximas, usar redes mosquiteiras, desinfetar semanalmente os bebedouros, usar pedilúvios e rodolúvios antes da saída da zona de caça afetada, fazer o controlo de vetores

nas aberturas das tocas, percorrer as áreas de caça afetadas no final e deve-se recolher amostras dos animais caçados e enviar para o INIAV, I. P. para diagnóstico (Vaz et al. 2018).

Ademais, em relação às explorações de produção cinegética, recomenda-se a vacinação, com vacinas inativadas, contra a Mixomatose e a DHV dos coelhos-bravos para repovoamento (Vaz et al. 2018). O desenvolvimento de imunidade após a vacinação começa aos 8 dias e a proteção imunitária permanece até por um período mínimo 6 meses (Vaz et al. 2018). Também se recomenda o controlo de pragas, insetos e roedores (Vaz et al. 2018). Em caso de suspeita de doença e/ou ocorrência de mortalidade nas explorações de produção cinegética do coelho-bravo, deve ser efetuado o diagnóstico laboratorial e, se confirmado proceder-se à eutanásia seguida da incineração dos animais (Vaz et al. 2018). Adicionalmente, procede-se à desinfeção de todas as instalações e atuação no combate de insetos e outros vetores (OIE 2018; Vaz et al. 2018).

De maneira geral, quanto à gestão cinegética do coelho-bravo, recomendam-se registar e comunicar as ocorrências de alterações do estado de saúde da fauna cinegética, de vida livre ou de cativeiro, à Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) ou ao Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) e colaborar na recolha de amostras para obter um diagnóstico laboratorial (Vaz et al. 2018).

Em suma, através da vigilância da DHV, observação dos animais doentes e amostragem de animais doentes e sãos, tanto da cunicultura como em populações selvagens, consegue-se conhecer o estado sanitário das populações, perceber o impacto da doença e adequar as medidas de intervenção (Vaz et al. 2018). Indubitavelmente, o controlo biológico bem-sucedido das populações selvagens de lagomorfos traz benefícios a nível económico e de conservação, já que potencia a cunicultura e permite a recuperação de espécies ameaçadas (Gleeson and Petritz 2020).

No que diz respeito ao tratamento, atualmente é limitado a cuidados de suporte (Spickler 2020). É eficaz a administração parentérica de soros hiperimunes anti-VDHV para os coelhos que ainda não apresentam sinais clínicos, pois confere uma proteção imediata, embora temporária (Spickler 2020). A OIE (2018) indica a utilização de soros hiperimunes anti-VDHV com o propósito de reduzir as perdas económicas inerentes e limitar a propagação do agente etiológico.

2.3 Ixodídeos

A maior percentagem de seres vivos do Reino Animal é constituída pelos insetos, e devido ao impacto significativo no setor sanitário, como agentes patogénicos ou vetores de doenças do Homem e/ou animais, e no sector agrícola, como causadores de prejuízos nas culturas, é deveras importante o seu controlo (Regnault-roger 1997; Sonenshine and Roe 2014). Estes possuem sistemas quimiossensoriais que permitem detetar e distinguir uma

grande diversidade de substâncias químicas, as quais são essenciais à sua sobrevivência e reprodução (Hallem et al. 2006). Do mesmo modo, os artrópodes vetoriais detetam o odor, a temperatura e o CO₂ que o hospedeiro emana, conseguindo assim, localizá-lo e alimentar-se do seu sangue (Sonenshine and Roe 2014). Concomitantemente, podem transmitir agentes infecciosos; inclusive, as carraças são o artrópode que transmite a maior variedade dos mesmos (Sonenshine and Roe 2014).

As carraças são ectoparasitas hematófagos obrigatórios e temporários, que se encontram na maior parte das regiões do mundo (Sonenshine and Roe 2014). De forma genérica, as carraças podem ser reconhecidas pela sua forma achatada (quando não estão ingurgitadas), possuírem 3 pares de patas na fase larvar e 4 pares de patas na fase de ninfa e adulto, e terem um hipostoma armado com numerosos dentes recurvados (Sonenshine and Roe 2014).

As ações nefastas das carraças envolvem ações diretas como soluções de continuidade na pele, intoxicações e espoliação de sangue; e ações indiretas como a transmissão de um grande número e variedade de agentes patogénicos (Bowman 2014).

Estão descritas quase 900 espécies de carraças, as quais pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea, (Sonenshine and Roe 2014; Nava et al. 2017). Esta superfamília contém duas grandes famílias, Argasidae (carraças moles com ausência de escudo dorsal) e Ixodidae (carraças duras com escudo dorsal) e uma terceira família, Nuttalliellidae, representados por uma única espécie do género Nuttalliella (Bowman 2014).

Os ixodídeos tendem a permanecer grandes períodos na vegetação e quando surge a passagem do hospedeiro anexam-se e alojam-se neste durante vários dias, até que por fim, se libertam e caem no solo (Bowman 2014).

O ciclo biológico compreende duas ecdises, a primeira de larva para ninfa e a segunda de ninfa para adulto (Bowman 2014). As larvas, as ninfas e os adultos fazem uma única refeição sanguínea e, normalmente, são necessários vários dias para um ingurgitamento completo (Bowman 2014). A fêmea faz uma única postura de milhares de ovos (Bowman 2014).

Os ixodídeos dividem-se consoante o número de hospedeiros que parasitam: sendo de 1 hospedeiro, quando completam as ecdises sem sair do hospedeiro; de 2 hospedeiros, quando as ninfas ingurgitadas caem do hospedeiro para realizar a muda e de 3 hospedeiros quando as larvas e as ninfas caem do hospedeiro para realizar a muda (Bowman 2014).

A importância destes conhecimentos para o controlo dos ixodídeos deve-se a que é mais fácil o controlo dos ixodídeos que se alimentam de uma única espécie, inclusive no caso de um ixodídeo de 3 hospedeiros pertencentes à mesma espécie (Bowman 2014). Porque, apenas se necessita aplicar o tratamento de controlo numa única espécie de hospedeiro; por

outro lado, quando se trata de um ixodídeo de 3 hospedeiros que parasita três espécies diferentes de vertebrados, o controle é dificultado (Bowman 2014).

2.3.1 As sensilhas e a posição de “questing”

Conforme o mencionado anteriormente, os ixodídeos permanecem quiescentes na vegetação por longos períodos até serem incitados pelos estímulos dos animais que passam (Wilkinson 1953; Bowman 2014). Logo, os ixodídeos manifestam apetência, ao estender e abanar o primeiro par de patas, em direção a estes estímulos, com o objetivo de detetar moléculas odoríferas (Wilkinson 1953; Sonenshine and Roe 2014). Esta posição de “busca do hospedeiro” designada por “questing” pelos autores de língua inglesa, é fortemente estimulada pela respiração e, principalmente, pelo odor dos hospedeiros (Wilkinson 1953).

Através das sensilhas, as carraças detetam estímulos que influenciam o seu comportamento (Sonenshine and Roe 2014). Estas podem ser classificadas pela sua função, como, por exemplo, quimiosensilhas, mecanosensilhas, fotossensilhas ou termosensilhas; pela sua forma, como, por exemplo, sensilha setiforme; ou simultaneamente pela sua função e forma, sensilhas multifuncionais, como, por exemplo, mecano-quimiosensilhas (Sonenshine and Roe 2014).

As sensilhas encontram-se dispersas pelo corpo, apêndices articulados e órgãos quimiossensoriais especializados, tal como, o órgão de Haller, o órgão palpar no segmento terminal do IV articulo dos palpos, as quelíceras e os olhos (Sonenshine and Roe 2014).

É de referir que as quelíceras, detetam sinais químicos presentes nos fluidos do hospedeiro, como, por exemplo, a adenosina 5'- trifosfato (ATP); e o órgão palpar, deteta compostos químicos não voláteis, como, por exemplo a ureia e o ácido láctico, que podem ser encontrados na pele do hospedeiro (Sonenshine and Roe 2014).

2.3.2 Órgão de Haller

Na superfície dorsal da extremidade distal do tarso do primeiro par de patas localiza-se a adaptação morfológica mais proeminente que regula o comportamento e deteta o hospedeiro, o órgão de Haller (Figura 2) (Sonenshine and Roe 2014).

O órgão de Haller é um importante órgão sensorial que é constituído por cápsulas que encerram múltiplas sensilhas sensoriais, olfativas e gustativas, e, por conseguinte, possui a capacidade de localizar com precisão o hospedeiro, a uma distância de 1 a 2 metros (Sonenshine and Roe 2014). Estas são compostas por quimiorreceptores e termorreceptores, que detetam moléculas odoríferas, o calor e outros estímulos externos (Sonenshine and Roe 2014).

O órgão de Haller é formado por:

- i. uma cápsula posterior que contém numerosas sensilhas expostas ao exterior através de uma pequena abertura (Figura 2)
- ii. uma fenda anterior, distal à cápsula posterior, contendo 6 a 7 sensilhas olfativas e sensilhas com poros na ponta, que podem ter funções gustativas, mecanossensoriais entre outras (Figura 2) (Sonenshine and Roe 2014).

O órgão de Haller está presente em todos os estádios pós-embrionários e possui capacidade regenerativa e/ou adaptativa; o que pode determinar para cada estágio a escolha por determinado hospedeiro (Sonenshine and Roe 2014).

É de realçar, que os recetores sensoriais químicos são classificados como olfativos quando detetam substâncias químicas transportadas pelo ar e gustativos quando reconhecem substâncias químicas presentes nos fluidos, tal como, o sangue (Sonenshine and Roe 2014).

Com base no referido anteriormente, salienta-se que há estudos que se concentram em compreender a comunicação química das carraças com o fim de desenvolver novos métodos de controlo, já que o sistema sensorial é um sistema suscetível (Sonenshine and Roe 2014).

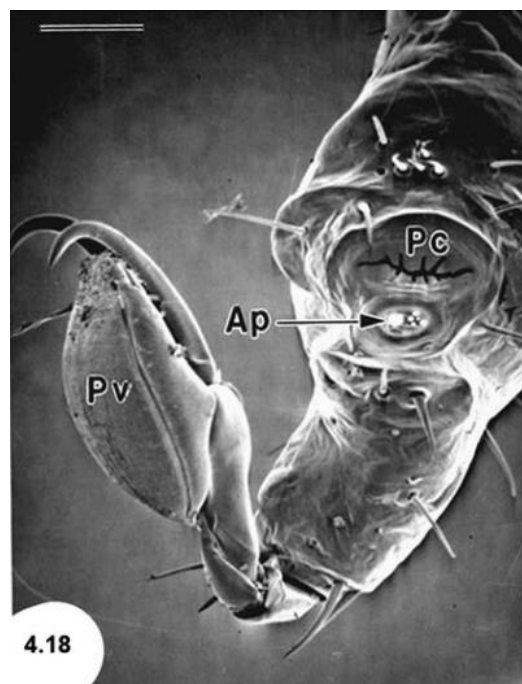


Figura 2. Microfotografia electrónica de varrimento ilustrando a superfície dorsal e o órgão terminal (apotele) do I tarso de *Dermacentor variabilis*. Fenda anterior do órgão de Haller (Ap), cápsula posterior do órgão de Haller (Pc), Pulvilho (Pv) (Fonte: “Biology of ticks” dos autores Sonenshine e Roe (2014) com direitos autorais e reproduzido com a permissão do licenciador através da PLSclear).

2.4 Efeitos das substâncias químicas e terminologia de controlo

As substâncias químicas, dependendo da sua natureza, podem afetar insetos e artrópodes e produzir um ou mais dos efeitos descritos na Tabela 1:

Tabela 1. Possíveis efeitos na locomoção, repouso, fertilidade, acasalamento, postura, sobrevivência e alimentação dos artrópodes na presença de determinada substância química.

Locomoção	<ul style="list-style-type: none"> i. Continua em movimento sem alterar a trajetória, virar-se ou mudar de direção (Dethier et al. 1960). ii. Cessa o movimento por inibir ou deter (Dethier et al. 1960). iii. Diminui a velocidade do movimento (resposta não direcionada) por inibir ou deter (Dethier et al. 1960). iv. Aumenta a velocidade de rotação por estimular a locomoção (Dethier et al. 1960). v. Aumenta a velocidade do movimento (resposta não direcionada) por estimular a locomoção (Dethier et al. 1960). vi. Inicia um movimento por estimular a locomoção (Dethier et al. 1960). vii. Diminui a velocidade de rotação (resposta não direcionada) (Dethier et al. 1960). viii. Direciona-se para a fonte (resposta direcionada) por ser atrativo (Dethier et al. 1960). ix. Afasta-se da fonte (resposta direcionada) por ser repelente (Dethier et al. 1960).
Repouso	<ul style="list-style-type: none"> i. Inicia um movimento (Dethier et al. 1960). ii. Permanece em repouso (Dethier et al. 1960).
Alimentação	<ul style="list-style-type: none"> i. Cessa o ato de se alimentar ou provoca a interrupção do contato entre o artrópode e o hospedeiro (Dethier et al. 1960; Halos et al. 2012). ii. Impede ou previne que se alimente (Halos et al. 2012). iii. Não interfere (Dethier et al. 1960.)
Fertilidade, acasalamento, postura, sobrevivência	<ul style="list-style-type: none"> i. Inicia ou estimula (Dethier et al. 1960). ii. Inibe (Dethier et al. 1960). iii. Interfere com a fertilidade do ovo e subsequente desenvolvimento de fases do ciclo de vida fora do hospedeiro. (Halos et al. 2012). iv. Provoca a morte do artrópode (Halos et al. 2012).

Do mesmo modo Halos et al. (2012) sugerem as definições da nomenclatura do controlo das carraças, tal como exposto em seguida na Tabela 2:

Tabela 2. Definições propostas por Halos et al. (2012) para um glossário de terminologia do controlo de carraças.

Termo	Definição
Repelência <i>sensu stricto</i>	Efeito irritante que provoca o afastamento e a queda da carraça após o contato com o pelo do animal tratado.
Interferência na fixação	Interferência no processo de fixação, incluindo a inibição da fixação, a retirada das peças bucais na fase de fixação ou o desprendimento das carraças já fixadas.
Expulsão	Interrupção do mecanismo de fixação e a queda da carraça do hospedeiro, isto é, causa o desprendimento das carraças fixas ou impede a fixação de mais carraças infestantes.
Efeito dissuasor alimentar	Interferência no processo de alimentação, evitando qualquer refeição sanguínea.
Efeito letal	Capacidade de induzir a morte, efeito acaricida <i>sensu stricto</i> .

2.4.1 Repelente

A aplicação de repelentes é uma medida crucial para a prevenção e controlo da fixação dos ixodídeos ao hospedeiro e da transmissão das doenças transmitidas por vetores (Farooq et al. 2022).

O termo repelência para os artrópodes, que mantêm um contacto de longa duração com o hospedeiro, é difícil de definir e é necessário melhorar e compreender o significado de repelência, especificando-o para cada ectoparasita (Halos et al. 2012).

De forma geral, o efeito repelente significa a evitação do contato dos ectoparasitas com o animal tratado (EMA 2021). Os repelentes de artrópodes são definidos como substâncias que fazem com que o artrópode se afaste ou evite totalmente o contato e a refeição sanguínea com o animal tratado e/ou caía do hospedeiro (Halos et al. 2012; EMA 2021; Farooq et al. 2022). As substâncias com efeito repelente para os ixodídeos, dependendo da sua natureza, poderão causar diversas reações (EMA 2021).

Farooq et al. (2022) diferenciam o significado de repelente espacial *versus* repelente tópico. O repelente de artrópodes espacial evita a aproximação do artrópode ao hospedeiro e atua como uma barreira entre o vetor e o hospedeiro (Farooq et al. 2022). Possui assim, a capacidade de manter os artrópodes afastados do animal tratado ao impedir que estes alcancem o hospedeiro através do bloqueio de estímulos ou da formação de vapores ao redor do hospedeiro que são desagradáveis para os ixodídeos (Farooq et al. 2022).

O repelente de artrópodes tópico evita que o artrópode se fixe no hospedeiro, tendo a capacidade de fazer com que o artrópode caía do hospedeiro, quando este consegue alcançá-lo (Farooq et al. 2022). Ao contrário dos repelentes espaciais, estes não são só desenvolvidos para afastar os ixodídeos, mas também para provocar o efeito de irritação nos ixodídeos, impedindo assim, a sua permanência no corpo do animal tratado (Farooq et al. 2022).

De acordo com as diretrizes do Comité dos Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP) da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) apresentadas sobre as substâncias antiparasitárias para tratamento e prevenção de infestação de carraças no cão e no gato (*Felis catus*) referem que o efeito repelente de ixodídeos, pode ser caracterizado pelo *sensu stricto* e pelo *sensu lato* (EMA 2021). O efeito repelente, *sensu stricto*, é determinado por um efeito irritante sobre os ixodídeos (EMA 2021). Isto é, em 6 a 8 horas, tem a função de afastar o ixodídeo do animal tratado e de provocar a queda do ixodídeo após o contacto com o pelo do hospedeiro (EMA 2021). O efeito repelente, *sensu lato*, inclui outros efeitos que ocorrem até 24 horas após a infestação inicial, como a inibição da fixação ou o desprendimento (interrupção da fixação de ixodídeos que estão em processo de fixação) (EMA 2021).

Comumente, a grande maioria dos repelentes para uso veterinário contém um ou mais piretróides, como, por exemplo, a permetrina, a cipermetrina e a tetrametrina (Bowman 2014).

3. Breve introdução histórica do uso das plantas e o contributo da etnobotânica

Desde a antiguidade, ainda que houvesse pouca informação sobre a fisiologia e o metabolismo dos voláteis do Reino Vegetal, constatou-se que as flores e as partes vegetativas das plantas libertam uma multiplicidade de compostos voláteis que exercem efeitos no comportamento de outros seres vivos (Pichersky and Gershenzon 2002). Ademais, antes do aparecimento dos produtos químicos sintéticos, as plantas e as substâncias derivadas eram utilizadas para repelir ou matar insetos nocivos, como, por exemplo, os antigos chineses clássicos contêm diversas prescrições de repelentes à base de plantas (Curtis 2018); na medicina tradicional do Irão diferentes preparações de plantas, incluindo óleos e extratos, são aplicados há muito tempo devido à sua atividade farmacológica e baixa toxicidade (Pirali-Kheirabadi et al. 2009); e também na Europa e na América do Norte, há uma forte história do uso de óleos extraídos das plantas que remonta a tempos antigos (Maia and Moore 2011).

Maia and Moore (2011) referem que a etnobotânica é a procura das plantas medicinais por meio de entrevistas a conhecedores do folclore e da medicina tradicional, permitindo assim a descoberta de novos repelentes à base de plantas. Como, por exemplo, o estudo de Casas et al. (2001) no vale de Tehuacan-Cuicatlan, no México, onde participaram 68 camponeses que partilharam o seu conhecimento sobre a flora, tais como, o nome local, as formas de uso, as técnicas de preservação e de preparação, as formas de manuseamento, o valor económico e a disponibilidade sazonal.

A etnobotânica é o método mais direto para identificar as plantas com um uso potencial em comparação com a triagem geral de todas as plantas de uma determinada área (Maia and Moore 2011). Um outro método possível é a bioprospeção, que consiste em rastrear sistematicamente as plantas para um determinado modo de ação, este é um meio mais dispendioso e trabalhoso para identificar novos repelentes (Maia and Moore 2011).

4. Compostos orgânicos voláteis

As plantas sintetizam misturas complexas de compostos, dos quais alguns são libertados naturalmente na atmosfera (compostos orgânicos voláteis), outros podem ser extraídos por destilação ou expressão (compostos orgânicos voláteis) e outros requerem outro tipo de método de extração específico (compostos não voláteis) (Pichersky and Gershenzon 2002; Figueiredo 2017a). Os compostos orgânicos voláteis são produzidos em estruturas secretoras especializadas que minimizam o risco de autotoxicidade e concomitantemente permitem a presença de altos níveis de componentes metabólicos em partes onde são essenciais para a função defensiva e/ou atraente (Figueiredo et al. 2008). O tipo e a localização destas estruturas são, em geral, característicos da família da planta (Figueiredo

et al. 2008).

Reconhece-se que os compostos voláteis das flores tendem a ser atrativos para espécies polinizadoras específicas e os compostos voláteis dos órgãos vegetativos, nomeadamente aqueles que são libertados após atividade herbívora, repulsam a ingestão por outros animais, sinalizam a presença dos animais herbívoros aos predadores e atraem os parasitas correspondentes (Pichersky and Gershenzon 2002). Uma vez que, quando são submetidas a qualquer tipo de lesão traumática, as plantas podem produzir novos compostos, que não estavam presentes anteriormente (Figueiredo et al. 2008). Em simultâneo, estes compostos influenciam as plantas da proximidade que ao detetarem-nos ativam também os seus mecanismos de defesa (Pichersky and Gershenzon 2002). Além disso, os compostos voláteis atuam também como mecanismo de defesa direta, como, por exemplo, quando apresentam toxicidade direta aos insetos (Pichersky and Gershenzon 2002).

Os mediadores químicos, usados na comunicação entre diferentes espécies, tal como mencionados anteriormente, designam-se por aleloquímicos, e exercem como tal um leque diversificado de influências sobre os insetos, como, por exemplo, repelência, dissuasão, melhora da polinização, aumento da oviposição ou ação ovicida e/ou larvicida (Regnault-roger 1997). As propriedades repelentes das plantas, por norma, têm sido investigadas por fracionamento do óleo essencial (OE), seguido por testes de repelência nas frações individuais (Curtis 2018).

5. Plantas aromáticas e medicinais e a flora portuguesa

Dentro da infinidade de espécies de plantas, encontram-se as plantas aromáticas e medicinais (PAM) (Regnault-roger 1997). Designam-se aromáticas por conterem compostos voláteis que lhes conferem um odor e sabor característico (Regnault-roger 1997).

As PAM são mencionadas desde a antiguidade pelo seu uso como especiarias, ervas aromáticas ou plantas medicinais como, por exemplo, na confeção de alimentos para realçar o sabor, na preservação de alimentos, para embalsamar os mortos, para incorporar em bálsamos ou unguentos curativos (Regnault-roger 1997). Só mais tarde, serviram com o propósito industrial, na perfumaria, na cosmética, no fabrico de detergentes, na farmácia, na química fina e na indústria alimentar (Regnault-roger 1997).

A periferia do Mediterrâneo é rica em PAM (Regnault-roger 1997) e a flora portuguesa é composta por cerca de 3800 espécies, das quais 500 espécies são PAM (Figueiredo et al. 2014). O reconhecimento das PAM possibilita a salvaguarda do património florestal, o melhoramento da gestão do espaço rural, a proteção de recursos hídricos, a limitação da erosão dos solos e a conservação da biodiversidade (Figueiredo et al. 2007; Figueiredo et al. 2008).

Dentro das PAM da flora portuguesa, grande parte pertence às famílias Apiacea,

Asteraceae, Lamiaceae, Mirtaceae, Oleaceae, Liliaceae, Rosaceae, Leguminosae, Rutaceae, Hypericaceae, Pinaceae, Cupressaceae, Lauraceae e Malvaceae que são ricas em metabolitos secundários, os quais estão presentes nos OE (Figueiredo et al. 2007; Figueiredo et al. 2008).

6. Óleos essenciais

Os OE são misturas complexas de compostos orgânicos de diferente natureza química e com diferentes volatilidades, que incluem os hidrocarbonetos, os álcoois, os aldeídos, as cetonas, os ácidos, os éteres e os ésteres (Barton 2000; Figueiredo et al. 2007; Figueiredo et al. 2014). Os OE não existem, de forma natural, na planta, pois são um produto que deriva da extração (Figueiredo 2017a). Esta é realizada através de metodologias específicas, que pelo seu valor e para a sua padronização, se encontram devidamente normalizadas e definidas internacionalmente (Regnault-roger 1997; Figueiredo et al. 2014, Figueiredo et al. 2017b; Arafa et al. 2020).

Deste modo, com base na Farmacopeia Europeia, Council of Europe (2010), e a FAO (1992), citados por Figueiredo et al. (2017b), um OE é internacionalmente definido como o produto isolado da planta ou de suas partes, exclusivamente através da destilação (Figura 3) ou por processo mecânico (Figueiredo et al. 2014; Figueiredo et al. 2017b), sem empregar qualquer solvente orgânico (Figueiredo et al. 2007), conforme detalhado na Tabela 24 do Anexo 1.

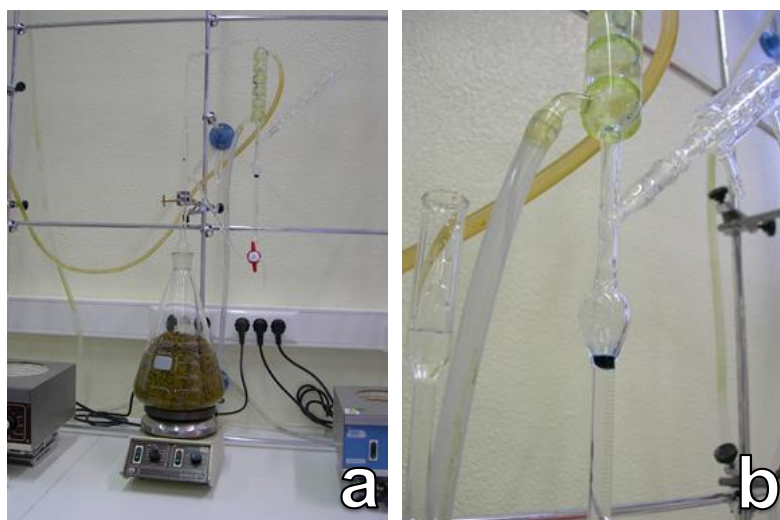


Figura 3. Aspeto do sistema de hidrodestilação laboratorial, com o aparelho de Clevenger (a). Pormenor da ampola de recolha do OE do aparelho de Clevenger, no qual, o OE de tonalidade azul encontra-se na fase superior e o hidrolato transparente encontra-se na fase inferior. Fonte: “Voláteis e óleos essenciais: parte II” dos autores Figueiredo et al. (2017c) com direitos autorais e reproduzido com a permissão da Revista Técnico-Científica Agrícola AGROTEC e da autora Figueiredo AC.

Portugal integra a International Organization for Standardization (ISO), Organização Internacional de Normalização de Óleos Essenciais, ISO/TC 54, através da Comissão Técnica de Óleos Essenciais (CT 5) (Figueiredo et al. 2014). Desta forma, assegura as especificações,

certifica a qualidade, garante a segurança, assegura a eficácia, identifica a gama de variação dos componentes predominantes e paralelamente, reconhece a variabilidade química e a existência intrínseca de quimiotipos¹ (Figueiredo et al. 2014).

Para além da ISO, organizações de referência como a Association Française de Normalisation (AFNOR), a European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR), a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), a European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP), as Farmacopeias (Portuguesa, Europeia, entre outras), a Flavor and Extract Manufacturers Association (FMA), a German Commission E Monographs, o USA Food Chemical Codex (FCC), a World Health Organization (WHO) e também a obra denominada “Plantas aromáticas e óleos essenciais : composição e aplicações” publicação da Fundação Calouste Gulbenkian; providenciam monografias e especificações sobre os OE e sobre as PAM (Figueiredo et al. 2014).

Os OE estão entre os compostos mais valiosos provenientes das plantas (Figueiredo et al. 2007), e são utilizados em diversas áreas, tais como a indústria farmacêutica, a indústria alimentar, a indústria de cosmética e perfumaria, (Batish et al. 2006; Batish et al. 2008; Figueiredo et al. 2017b) e a indústria agrícola. Nesta última, são utilizados para controlo de pragas e doenças com o benefício de não terem efeito acumulativo no ambiente e apresentarem um largo espectro de ação que restringe o desenvolvimento de estirpes patogénicas resistentes (Figueiredo et al. 2007; Figueiredo et al. 2008).

6.1. Interesses e vantagens

Devido aos desafios atuais no combate à poluição ambiental e pelos efeitos nocivos dos produtos sintéticos, há um interesse crescente por práticas agrícolas ecológicas e por produtos de origem natural, o que leva a um aumento do desenvolvimento de produtos comerciais, para uso humano e animal, com matérias-primas naturais e da pesquisa de abordagens alternativas para o controlo de pragas ou vetores, entre as quais alternativas botânicas como, por exemplo, os OE (Trumble 2002; Batish et al. 2008; Ellse and Wall 2014; Chattopadhyay et al. 2015).

Embora, atualmente, os repelentes sintéticos sejam muito mais utilizados do que os OE, os repelentes de artrópodes à base de plantas têm tido um desenvolvimento promissor e as evidências obtidas demonstram o valor potencial dos OE, os quais têm sido muito utilizados como compostos de controlo de piolhos, ácaros e carraças (Maia and Moore 2011; Ellse and Wall 2014; Lee 2018). Os OE estão na composição de muitos dos repelentes comerciais para

¹ Os quimiotipos são grupos quimicamente distintos dentro da mesma espécie de plantas fenotipicamente idênticas, que diferem no tipo ou proporção dos seus constituintes químicos (Figueiredo 2017a).

perfumar ou como atividade repelente, como, por exemplo, os OE de hortelã-pimenta, gerânio, pinheiro, tomilho e patchouli (Maia and Moore 2011).

O controlo de ectoparasitas, designadamente ixodídeos, em animais usando inseticidas sintéticos neurotóxicos têm progressivamente desenvolvido resistências (Foil et al. 2004; Ellse and Wall 2014). Foil et al. (2004) mencionam que *Boophilus microplus* desenvolveram resistência a muitas das classes de acaricidas, incluindo, organoclorados (dicloro-difenil-tricloroetano, DDT), piretróides, organofosforados e formamidinas (amitraz). Além disso, Pirali-Kheirabadi et al. (2009) referem que *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* têm desenvolvido resistência aos acaricidas sintéticos utilizados.

Em consonância com o exposto acima, o interesse e a procura pelos OE deve-se sobretudo a:

- i. serem de origem natural e ecológicos (Chung et al. 2013; Chattopadhyay et al. 2015; Figueiredo 2017a);
- ii. serem biodegradáveis e não deixarem resíduos nos alimentos e no meio ambiente (Batish et al. 2008; Chung et al. 2013; Tabaria et al. 2017; Figueiredo 2017a);
- iii. serem eficazes na proteção contra as picadas de insetos ou artrópodes sugadores de sangue e terem um largo espectro de ação (Batish et al. 2008; Chattopadhyay et al. 2015);
- iv. possuírem, em geral, baixa toxicidade para os mamíferos, quando o seu uso cumpre as doses médias diárias aceites (Batish et al. 2008; Figueiredo et al. 2008);
- v. apresentarem menor toxicidade do que os pesticidas e inseticidas sintéticos, e, portanto, causam menor ecotoxicidade (Batish et al. 2008; Figueiredo 2017a);
- vi. terem a capacidade de desempenhar, simultaneamente, mais do que uma função dos seus equivalentes sintéticos (Figueiredo 2017a);
- vii. poderem ser mais económicos (Batish et al. 2008; Figueiredo 2017a);
- viii. possuírem uma vasta gama de ações, reduzindo o risco de desenvolvimento de estirpes patogénicas resistentes (Figueiredo et al. 2008);
- ix. poderem apresentar eficácia ovicida nos ectoparasitas (Ellse and Wall 2014);
- x. ser possível extraí-los de recursos naturais autossustentáveis (Tabaria et al. 2017).

6.2. Desvantagens e contra-indicações

Deve-se ter em conta que os produtos de origem natural nem sempre são mais seguros do que os produtos sintéticos e também não estão isentos de originar efeitos colaterais indesejados, como no caso dos OE, que advém sobretudo pelo seu uso indevido (Figueiredo 2017a; Lee 2018).

Sabe-se que alguns dos componentes das plantas podem causar efeitos deletérios na saúde, tanto humana como animal, e podem inclusive levar à morte (Trumble 2002). Portanto,

é necessário ter atenção aos compostos dos repelentes à base de plantas (Maia and Moore 2011) e não presumir que por serem naturais sejam seguros, até porque entre eles alguns serão mais seguros do que outros (Trumble 2002). Por exemplo, Curtis (2018) menciona que a rotenona, substância extraída da planta do género *Derris*, é muito mais tóxica para os humanos do que a maioria dos inseticidas sintéticos (Curtis 2018). Logo, a premissa de que qualquer produto natural é mais seguro do que qualquer produto sintético é revogada (Curtis 2018).

Além disso, a maioria das plantas usadas como repelentes são também utilizadas na indústria alimentar ou na perfumaria, o que pode levar à associação dos OE como opções naturais mais seguras que o N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) (Maia and Moore 2011). No entanto, muitos dos OE podem causar dermatite de contato, como, por exemplo, *Thymus vulgaris* a 2% em 0,1% de trans-2-hexenal pode causar irritação cutânea segundo os autores Strickman et al. (2009), citados por Maia e Moore (2011, p. 10).

Trumble (2002) refere que grande parte dos produtos naturais, incluindo os produtos para o controlo de insetos, não foram avaliados escrupulosamente quanto à eficácia e segurança, submetidos a ensaios rigorosos e carecem de regulamentos que forneçam limitações relativas à composição ou à quantidade de ingredientes. Ademais, o mesmo autor sublinha que mesmo que estes sejam benignos, não impede que se misturados ou preparados indevidamente possam causar malefícios.

Em consonância com o exposto acima, algumas desvantagens do uso dos OE são:

- i. poderem provocar irritação cutânea, sobretudo se houver exposição à luz solar (Maia and Moore 2011);
- ii. o efeito repelente é dependente da formulação e da concentração (Maia and Moore 2011);
- iii. a composição química é inevitavelmente variável (Figueiredo et al. 2007; Figueiredo et al. 2008);
- iv. a instabilidade das condições fisiológicas, ambientais, climáticas e geopolíticas podem afetar negativamente os suprimentos e preços (Figueiredo et al. 2007; Figueiredo et al. 2008);
- v. se não proveniente de uma fonte sustentável e agricultura biológica, podem ter sido aplicados fertilizantes e pesticidas sintéticos no cultivo das plantas (Maia and Moore 2011);
- vi. serem substâncias voláteis, e não atingirem uma longa duração, como, por exemplo, 8 horas de duração como um repelente ideal (Štefanidesová et al. 2017);
- vii. na sua maioria, suscetíveis ao oxigénio e à luz (Chung et al. 2013);
- viii. ao volatilizarem rapidamente requerem repetidas aplicações (Chattopadhyay et al. 2015) ou de outro método ou fórmula para aumentar o tempo de ação;

- ix. necessidade de avaliar a sua atividade em condições de campo (Batish et al. 2008);
- x. os efeitos sobre outros organismos não-alvos, incluindo polinizadores e predadores naturais, podem não ter sido avaliados. Batish et al. (2008) referem que apesar do OE de eucalipto possuir um vasto espectro de ação contra fungos, bactérias, insetos, ácaros e ervas daninhas e pode ser usado no controlo de pragas, de forma segura para o ambiente; na forma de vapor apresenta toxicidade elevada e desconhecem-se os seus efeitos sobre os organismos não-alvos.

Em vista disso, o conhecimento da composição química dos OE é fulcral para a compreensão dos possíveis mecanismos de tolerância e/ou efeitos secundários (Figueiredo 2017a).

6.3. Composição química e quimiotipos

A quimiodiversidade bem como a biodiversidade são inerentes à vida (Gershenzon and Dudareva 2007). Os organismos vivos produzem inúmeros compostos orgânicos, de baixo peso molecular, designados metabólitos secundários (Gershenzon and Dudareva 2007). Apesar de se terem desenvolvido inúmeros estudos relativos à síntese, biossíntese e atividades biológicas destas substâncias, o conhecimento sobre o seu desempenho na natureza é escasso, especialmente para os terpenos (Gershenzon and Dudareva 2007).

Os OE são uma mistura complexa constituída principalmente por substâncias de natureza terpénica, os terpenóides (compostos de terpenos), a par dos alcaloides, uma variedade de fenóis (Figueiredo et al. 2007), óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas e hidrocarbonetos (Zygdlo and Grosso 1995; Batish et al. 2008). Algumas destas substâncias são encontradas em produtos farmacêuticos (Figueiredo et al. 2007).

À temperatura ambiente, por norma, os OE encontram-se em estado líquido e podem ser miscíveis com solventes orgânicos, mas não com água (Barton 2000, Figueiredo et al. 2007).

A espécie da planta pode ser averiguada pela composição do OE (Zygdlo and Grosso 1995), e tanto a mistura total ou como alguns de seus constituintes, podem ser usados para fins quimiotaxonómicos (Figueiredo et al. 2008). Porém, apesar da análise química do OE ser significativa para a padronização (Trumble 2002), a comparação da composição descrita em diferentes estudos é por vezes difícil ou até impossível, pois são propensos à variabilidade e existe um grande número de elementos envolvidos (Figueiredo et al. 2008). Por exemplo, o tipo de material vegetal utilizado (folhas, flores, caules, raízes, madeira, frutos, casca, pericarpo ou sementes), assim como, o estágio de desenvolvimento do órgão ou material vegetal que é extraído, irá ter variações, dado que as plantas possuem diferentes estruturas secretoras com distribuição heterogénea (Figueiredo et al. 2008; Figueiredo et al. 2014). Além

disso, fatores como a sazonalidade, condições de cultivo e ambientais (altitude, exposição solar, fatores edáficos, método de extração entre outros), diferenças genéticas, origem geográfica, condições de armazenamento e preparação (contaminações, oxidação, resinificação), as distintas metodologias de isolamento e análise, e de um modo genérico, por se tratar de um produto natural inevitavelmente é variável por natureza (Barton 2000; Tawatsin et al. 2001; Batisha et al. 2006; Figueiredo et al. 2007; Figueiredo et al. 2008; Ruppert-Aulabaugh 2014). Contudo, não invalida a exigência intrínseca de uma garantia de constância e qualidade, tal como um bioproduto, a fim de garantir a eficácia e segurança (Figueiredo 2017a).

Além disso, a especificação bioquímica, como a identificação da presença de quimiotipos é deveras relevante, pois sabe-se que diferentes quimiotipos podem apresentar desempenhos distintos numa atividade ou propriedade biológica (Ruppert-Aulabaugh 2014; Figueiredo 2017a). Embora nem todos os OE apresentem quimiotipos e apenas alguns quimiotipos estão disponíveis no mercado (Ruppert-Aulabaugh 2014), existem OE de diversas espécies que possuem vários quimiotipos como, por exemplo, o *Thymus* spp. (Figueiredo 2017a).

6.4. Atividade repelente e formas de melhorar o tempo de ação

Pirali-Kheirabadi et al. (2009) mencionam que foram relatadas propriedades repelentes dos OE em carraças e Lee (2018) refere que vários estudos demonstram que os OE têm efeitos repelentes significativos, inclusive, com uma concentração baixa, tal como, Štefanidesová et al. (2017) constataram a sua interferência na procura do hospedeiro pelos *Dermacentor reticulatus*.

Bissinger and Roe (2010) acrescentam que a atividade repelente para as carraças é determinada por distintos fatores, tais como, a taxa de evaporação no local de aplicação, o contacto ou a repelência espacial, a taxa de entrega ao recetor e a potência do composto no desencadeamento da ação repelente. Ao nível da sensilha, a potência da atividade repelente é sujeita à receção do repelente no recetor, à afinidade do recetor ao repelente, à degradação do repelente e à potência do repelente no recetor em incitar uma ação repelente eficaz (Bissinger and Roe 2010). Além disso, a eficácia de um OE não depende só de um constituinte isolado, mas sim dos constituintes como um todo, devido à existência de efeitos sinérgicos e antagónicos entre si (Figueiredo 2017a), ou em alguns casos, com outros compostos (Regnault-roger 1997).

Devido à sua volatilidade, os efeitos de repelência são de curta duração (Lee 2018) e, portanto, é necessário e possível aumentar o tempo de repelência (Maia and Moore 2011; Lee 2018). Do mesmo modo, Lee (2018) acrescenta que compreender o modo de ação dos repelentes bem como saber como os repelentes modulam a deteção de odor pelos insetos

permitirá planejar e criar melhores fórmulas de repelentes.

Ademais, Bissinger e Roe (2010) referem que para atingir altos níveis de repelência, equivalente a 6 horas ou mais, é essencial que haja um favorecimento entre todos os fatores relevantes na função de repelente, mencionados anteriormente.

Assim sendo, diversos métodos foram descritos para melhorar a eficácia da ação repelente dos OE (Lee 2018), apresentam-se em seguida alguns exemplos:

- i. os resultados de Sakulkua et al. (2008) constataram que um aumento da concentração de glicerol e de surfactante na emulsão (processo de homogeneização de alta pressão) do OE de *Cymbopogon nardus* encapsulado resultou na diminuição da volatilidade e aumento do tempo de proteção;
- ii. Tawatsin et al. (2001) comprovaram que o tempo de repelência para os mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus* e *Culex quinquefasciatus* foi significativamente maior quando foi incorporado vanilina, a 5%, aos OE de *Curcuma longa*, *Cymbopogon winterianus*, *Citrus hystrix* e *Ocimum americanum*;
- iii. o uso de agentes fixadores melhora a eficácia repelente (Lee 2018), como, por exemplo, Moore et al. (2007) inferiram que a sua adição ao p-mentano- 3,8-diol (PMD) e ao OE das folhas de *Cymbopogon citratus* ou de *Cymbopogon flexuosus* fez com que o tempo de volatilização fosse adiado e conseqüentemente aumentasse a sua eficácia;
- iv. a formulação de um adesivo em polímeros à base de OE é considerada um repelente de liberação lenta eficaz para *Aedes (Stegomyia) albopictus* e seguro no modelo animal, pois não se observou mudanças significativas nos parâmetros respiratórios, hematológicos e bioquímicos nos ratos Wistar, *Rattus norvegicus* (Chattopadhyay et al. 2015). E após 14 dias de exposição, os ratos não sofreram qualquer alteração histopatológica do parênquima pulmonar (Chattopadhyay et al. 2015);
- v. o uso de vários OE de forma sinérgica tem sido reportado que pode fornecer maior atividade repelente do que o obtido com um único OE (Lee 2018);
- vi. o uso de formulações à base de cremes e de misturas de polímeros aumentam o efeito repelente (Lee 2018);
- vii. a microencapsulação ou nanoemulsão (Lee 2018) permite melhorar o efeito de liberação e a estabilidade face aos fatores ambientais dos OE, obtendo assim, um efeito repelente de longa duração (Chung et al. 2013). Chung et al. 2013, constaram que as microcápsulas de OE de *T. vulgaris* demonstraram uma volatilização controlada e um efeito repelente de longa duração, e com a maior eficiência e estabilidade quando incorporado com o emulsificante lauril sulfato de sódio.

Acresce que, os estudos toxicológicos associados às ciências multiômicas permitem

encontrar novos repelentes, monitorizar a exposição, acompanhar as respostas celulares a diferentes doses, avaliar os mecanismos de ação e prever riscos inerentes (Lee 2018).

6.5. Óleo essencial de eucalipto

O género *Eucalyptus* refere-se a uma árvore nativa da Austrália, que pertence à família Myrtaceae, de grande envergadura com folhagem perene e perfumada, da qual se extrai o OE (Batish et al. 2008). *Eucalyptus* spp. abrange cerca de 700 espécies, as quais são cultivadas em várias partes do mundo, incluindo Portugal (Figura 4) (Barton 2000).

Sabe-se que, as matérias-primas e os produtos derivados de *Eucalyptus* spp. têm sido usados ao longo da história, e está relatado que as folhas de *Eucalyptus* spp. faziam parte da medicina tradicional dos povos aborígenes da Austrália e que os primeiros colonizadores europeus tiveram interesse no óleo (Barton 2000; Batish et al. 2008).

As folhas de eucalipto, *E. globulus* Labill, possuem a classificação GRAS (Generally Recognized as Safe) da FDA e a aprovação, quando em quantidade mínima necessária e na forma apropriada, para a incorporação em produtos alimentares para consumo humano (FDA 2022).

O 1,8-cineol é o composto químico presente no OE de *Eucalyptus* spp. com maior relevância, o qual tem o nome comercial de eucaliptol (Barton 2000). Este composto é biodegradável e não há indicação de provocar ecotoxicidade, além disso, possui diversas propriedades, como, por exemplo, bactericida, herbicida, inseticida e alelopático, porém, é de referir que os outros constituintes, mesmo que presentes em pequenas quantidades têm uma importância, uma função e um potencial específico (Barton 2000).

No que diz respeito às suas características, sabe-se que é um líquido incolor entre os 0 °C e os 177 °C e possui um odor intenso característico (Barton 2000). Este é considerado um agente letal e tem diferentes propriedades e um largo espectro de ação, que inclui atividade antimicrobiana, fungicida, inseticida, repelente (nomeadamente para o controlo de ixodídeos), herbicida, acaricida, nematicida e dissuasor alimentar para os herbívoros (Barton 2000; Batish et al. 2008; Madreseh-Ghahfarokhi et al. 2019), solvente industrial e aditivo para os combustíveis (Barton 2000). Realça-se que é considerado um repelente de insetos registado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e aprovado para uso tópico em humanos (Lee 2018). Contudo, o único repelente à base de plantas para uso público defendido pelo CDC (Centros de Controlo e Prevenção de Doenças) é o PMD, o qual é um derivado do *Eucalyptus* spp., e está comprovado ser seguro para a saúde humana (Lee 2018).



Figura 4. Eucaliptos (*E. globulus*) numa área florestal, em Leiria, Portugal (Fotografia original).

6.6. Óleo essencial de tomilho

Os OE da família Lamiaceae são comumente empregues como repelentes de insetos, dentro dos quais, o OE da planta *T. vulgaris* (Figura 5) é considerado um repelente eficaz (Maia and Moore 2011; Chung et al. 2013; Štefanidesová et al. 2017).

Os constituintes maioritários do OE de *T. vulgaris*, por norma, são o timol, o linalol, o cariofileno, o carvacrol e o p-cimeno (Štefanidesová et al. 2017; Tabaria et al. 2017).

Tabaria et al. (2017) mencionam que há estudos que mostram que o timol e o carvacrol presentes, apresentam toxicidade contra vetores, nomeadamente artrópodes, e destacam que estes monoterpenóides são promissores para fórmulas acaricidas e repelentes eficazes no controlo de *Ixodes ricinus*. E concomitantemente, com segurança e baixa toxicidade para o meio ambiente, saúde humana e animal, assim como, com baixo nível de resíduos nos produtos de origem animal (Tabaria et al. 2017).

Em seguida apresentam-se alguns estudos que corroboram a atividade repelente do OE de *T. vulgaris* e de alguns de seus constituintes (Arafa et al. 2020):

- i. No projeto experimental de Štefanidesová et al. (2017) demonstraram que o OE de *T. vulgaris*, a 3%, repeliu 68,2% de *D. reticulatus* adultos;
- ii. Arafa et al. (2020) indicam que a repelência do timol (99% pureza) foi dependente da concentração e demonstraram que o timol a 10% (concentração maior usada no estudo) repeliu 85,7% das larvas de *R. annulatus*;
- iii. No estudo realizado por Soutar et al. (2019) em condições de campo, verificaram que a taxa de queda das ninfas de *I. ricinus* que alcançavam as calças impregnadas com o OE de *T. vulgaris* (100% puro) a 5% foi de 70,4%, superior ao OE de *Origanum*

- vulgare*, OE *Rosmarinus officinalis* e ao etanol testados, e muito equivalente e ligeiramente superior ao DEET a 20%, em que a taxa de queda foi de 64,7%, dentro dos 3 minutos após a primeira contagem a seguir à caminhada;
- iv. Chung et al. (2013) demonstraram que o OE de *T. vulgaris* em microcápsulas manifestou elevada atividade repelente e eficaz, superior a 90%, nas larvas de *Plodia interpunctella*;
 - v. Tabaria et al. (2017) demonstraram que tanto o carvacrol como o timol nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1%, 2% e 5% repeliram mais de 90% das larvas de *I. ricinus* e registaram também efeito acaricida.



Figura 5 - Tomilhos (*T. vulgaris*) em cultivo em Évora, Portugal (Fotografia com o crédito e reproduzido com a permissão de Aromáticas d' Palma, projeto de Agricultura Biodinâmica).

II. AVALIAÇÃO DA AÇÃO REPELENTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EM IXODÍDEOS PARASITAS DO COELHO-BRAVO COM VISTA AO CONTROLO DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL

1. Objetivos

Face ao enorme declínio da população de coelho-bravo na Península Ibérica e sendo os ectoparasitas vetores do VDHV, urge a necessidade de criar formas de controlo sustentáveis.

No presente estudo piloto pretendeu-se avaliar a ação repelente dos OE de *E. globulus* e de *T. vulgaris* sobre os ixodídeos. Por conseguinte, os objetivos do trabalho experimental foram:

- i. seleção de OE extraídos de PAM presentes no território português, a fim de serem posteriormente testados contra os ixodídeos;
- ii. captura de ixodídeos e posterior identificação;
- iii. criação de ixodídeos em laboratório;
- iv. testagem da eficácia da ação repelente dos OE de *E. globulus* e de *T. vulgaris*, em concentrações de 2,5% e 5%, em ninfas e adultos de *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

2. Materiais e métodos

2.1. Captura e identificação de ixodídeos

As capturas de ixodídeos podem ser realizadas na fase de vida livre ou na fase parasitária. Para a captura de ixodídeos na fase de vida livre foi utilizado o método de arrastamento de bandeira que consistiu na passagem de uma toalha turca, limpa e de cor branca, sobre a vegetação. Posteriormente, após verificar a existência de carraças agarradas à toalha, estas foram cuidadosamente colhidas e devidamente acondicionadas em frascos de plástico com tampa de rosca, juntamente com algumas ervas. De seguida, alguns espécimes foram colocados no frigorífico até ao momento da sua identificação e/ou utilização no ensaio ou colocados na estufa, conforme detalhado em 2.1.1.



Figura 6. Captura de ixodídeos com recurso ao método de arrastamento da bandeira (Fotografia original).

A técnica de arrastamento da bandeira foi realizada na área florestal de Santa Catarina da Serra, no distrito de Leiria e na Herdade do Infantado, localizada em Samora Correia, no distrito de Santarém, próximo a tocas de coelhos selvagens.

A captura de carraças em fase de vida parasitária foi feita diretamente em bovinos, *Bos taurus*, num gato e num cão. Cada animal parasitado foi inspecionado visualmente e por palpação, de modo a detetar a presença de carraças. As carraças foram retiradas cuidadosamente da pele do animal de modo a manter as suas peças bucais intactas. Posteriormente foram acondicionadas, tal como descrito anteriormente.

Para conservar a vitalidade e reduzir o impacto da manipulação, os ixodídeos utilizados foram identificados até ao género previamente a cada ensaio. No final do mesmo, verificou-se a sua vitalidade e foram colocados em frascos contendo álcool etílico a 70°. Neste sentido, procedeu-se à identificação da espécie, com o auxílio de um estereomicroscópio binocular e as chaves dicotómicas de características morfo-anatómicas dos autores Estrada-Peña (2000) e Estrada-Peña et al. (2004).

2.1.1. Criação de ixodídeos em laboratório

A criação em condições de laboratório é essencial para investigar, entre outros objetivos, a resistência a acaricidas (Elhachimi et al. 2021) e/ou repelentes.

No dia 21 de outubro de 2019, 5 fêmeas ingurgitadas, recolhidas de bovinos (Figura 7), e no dia 1 de novembro de 2019, após colheita de 68 ninfas ingurgitadas pelo método de arrastamento de bandeira na Herdade do Infantado, localizada em Samora Correia, no distrito de Santarém (Figura 8), procedeu-se ao seu acondicionamento na estufa incubadora (Figura

9). As fêmeas ingurgitadas e as ninfas ingurgitadas, colocaram-se, individualmente e/ou em conjunto, num frasco identificado, coberto por “tule” e uma tampa perfurada ou em placas de Petri identificadas (Figura 7 e 9). Nos frascos e nas placas de Petri, foi colocado um pedaço de papel de filtro no seu interior para absorver as fezes dos artrópodes e o excesso de humidade (Figura 7).

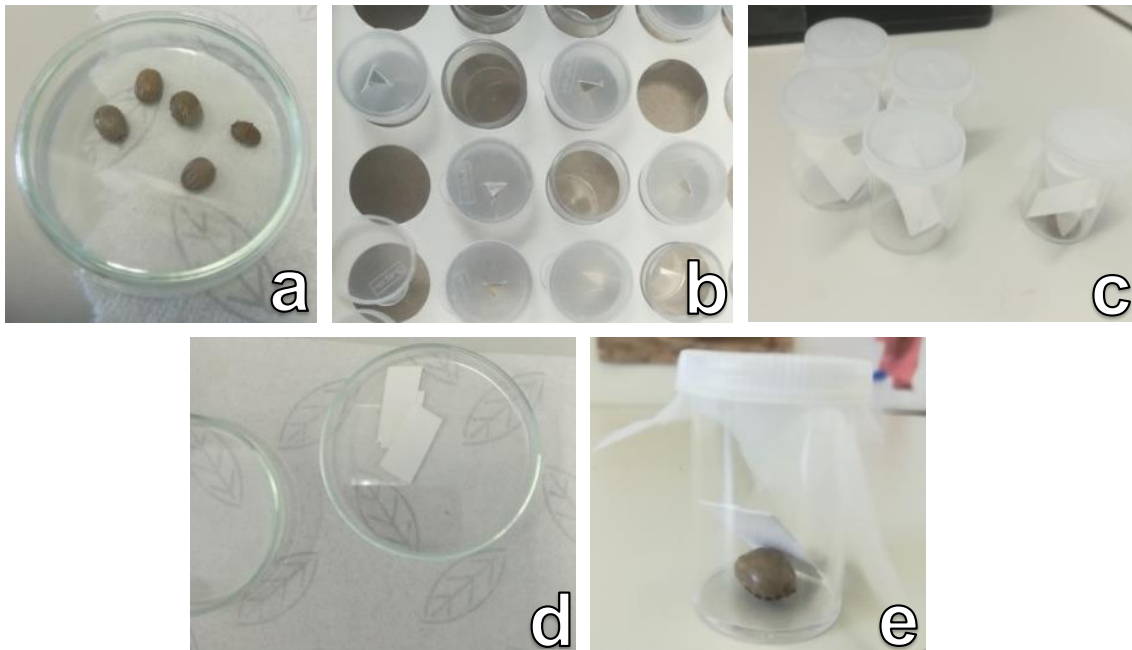


Figura 7. Aspeto das fêmeas ingurgitadas, em vista superior, antes do início da experiência (a), frascos e respetivas tampas perfuradas (b), quatro frascos cobertos com tule e respetiva tampa perfurada contendo no seu interior uma fêmea ingurgitada (c), retângulos de papel de filtro (d) e vista lateral do frasco tapado com um pedaço de tecido tipo “tule” e tampa perfurada, contendo no seu interior um retângulo de papel de filtro e uma fêmea ingurgitada (e) (Fotografias originais).

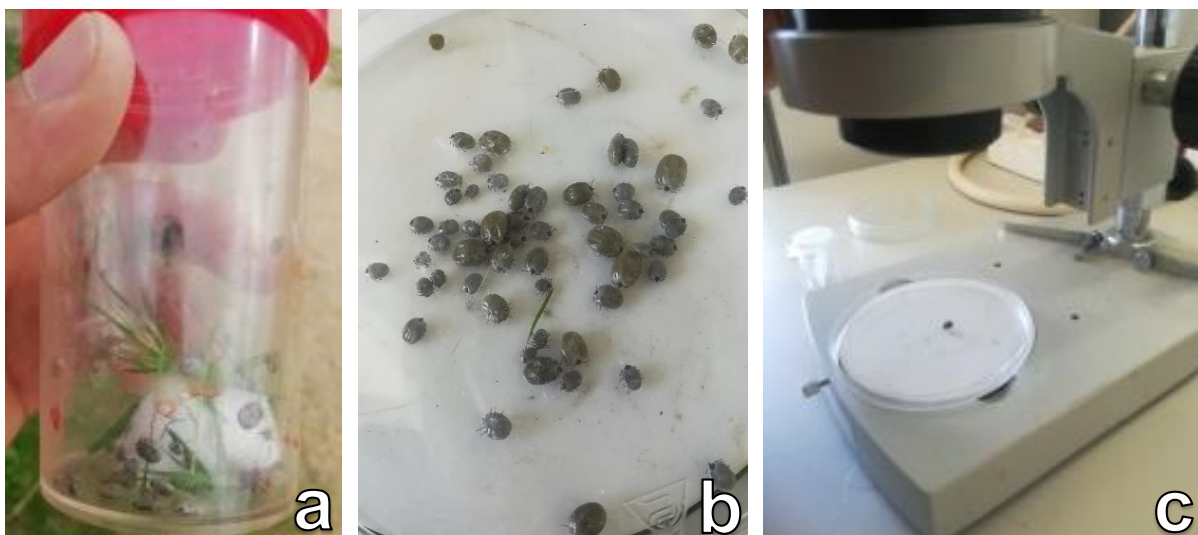


Figura 8. Aspeto dos ixodídeos em frasco de plástico após a sua colheita (a), ninfas ingurgitadas colocadas numa placa de Petri (b) e uma ninfa numa placa de Petri para observação com o estereomicroscópio binocular (c) (Fotografias originais).

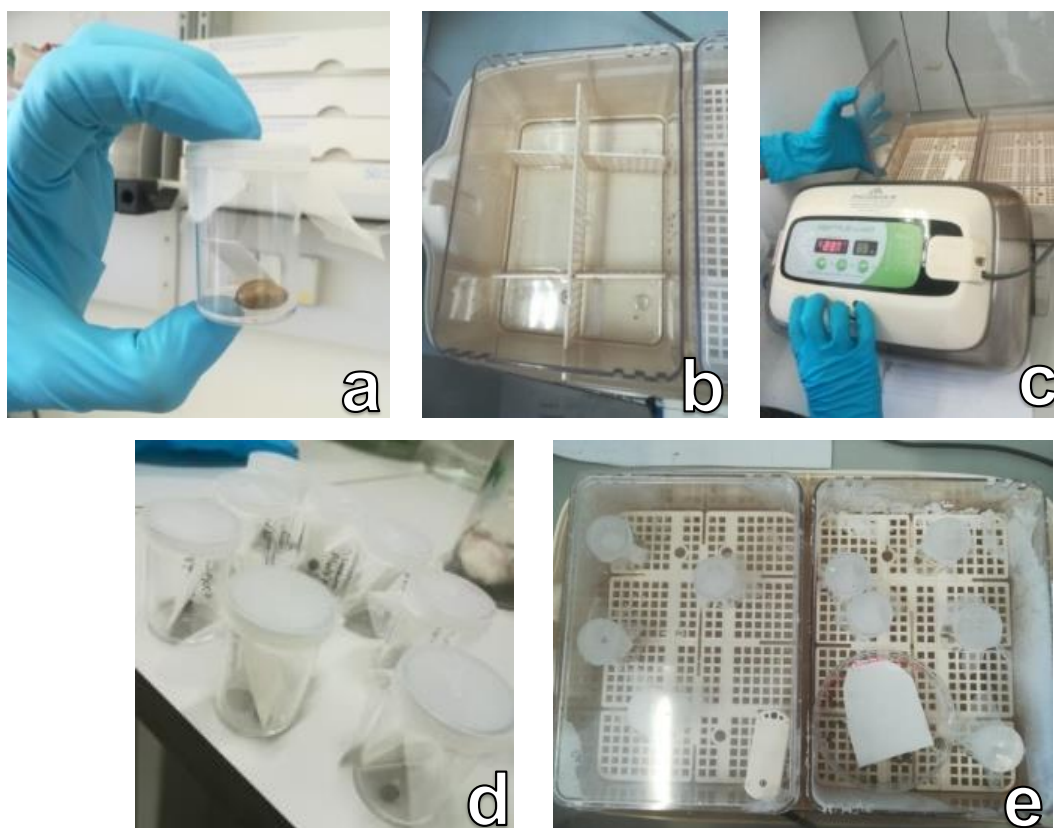


Figura 9. Aspeto de uma fêmea ingurgitada no interior do frasco antes da sua colocação na estufa (a), interior da estufa incubadora (b), manuseio da estufa incubadora (c), frascos tapados contendo as ninfas no seu interior (d) e frascos e placas de Petri contendo os ixodídeos no interior da estufa (e) (Fotografias originais).

Na introdução das fêmeas ingurgitadas, a estufa mantinha em seu interior uma temperatura de aproximadamente 25°C, semelhante ao realizado pelos autores Darvishi et al. (2014). Porém, após 11 dias, quando na introdução das ninfas ingurgitadas, alterou-se a temperatura da estufa para que durante 3 horas do dia estivesse a 28 °C e as restantes 21 horas do dia a 25 °C. A estufa continha no seu interior uma solução saturada de NaCl a 85% em água e a humidade relativa iniciou-se com 75±1 % e sofreu variações ao longo do tempo, entre 69% a 85%, semelhante ao realizado pelos autores Darvishi et al. (2014). É de salientar que durante toda a criação não foi fornecida qualquer iluminação artificial controlada.

De modo assíduo foi feito o acompanhamento e observação dos ixodídeos, e quando disponível introduziu-se gelo seco como estimulante. Possibilitando assim, a monitorização das fêmeas ingurgitadas e futuras ovoposturas, com o propósito de obter a eclosão de um número considerável de larvas a serem utilizadas nos ensaios. Paralelamente, no seguimento das possíveis mudas das ninfas, à medida que o ixodídeo quitiniza deverá ser retirado da estufa e guardado em ambiente escuro.

2.1.2. Caixa de acrílico com os sistemas de alimentação Hemotek™

Em cada ensaio, os ixodídeos foram introduzidos numa caixa de material acrílico

criada no âmbito deste projeto, que continha duas ligações para o sistema de alimentação Hemotek™.

No centro da tampa da caixa encontrava-se uma abertura circular que permitia a entrada de ixodídeos, no momento de início do ensaio, e durante o ensaio encontrava-se tapada por uma placa de Petri. A partir do 2º ensaio, criaram-se duas novas aberturas circulares, uma no lado esquerdo e outra no lado direito da abertura central, na direção do recipiente de refeição do Hemotek™. Ambas aberturas, do lado esquerdo e do lado direito, foram cobertas por uma rede mosquiteira no 2º e 3º ensaio e a partir do 4º ensaio por uma rede de malha fina esticada num aro amovível.

Para identificar as distâncias dos ixodídeos aos papéis de filtro, foram tracejadas circunferências na placa amovível, cujos os raios tinham 0,5 cm de diferença e o centro era o respetivo recipiente de refeição.

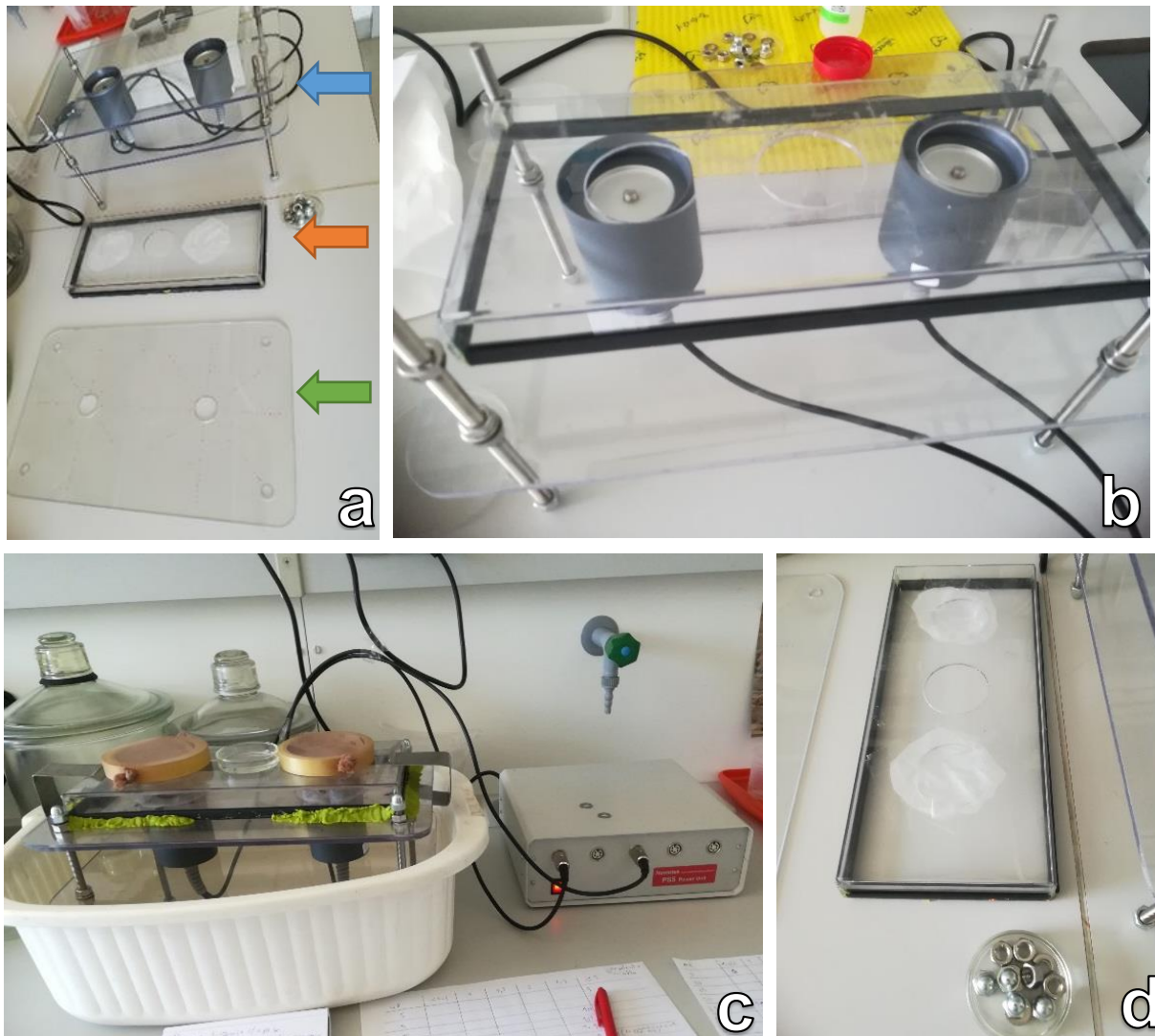


Figura 10. Aspeto da parte inferior (seta azul), da tampa da caixa (seta laranja) e da placa amovível (seta verde) da caixa de acrílico (a), aspeto da caixa de acrílico montada (b), aspeto da caixa de acrílico montada e com o sistema Hemotek™ ligado (c) e tampa com as duas aberturas cobertas com a rede mosquiteira e do conjunto das porcas hexagonais e cegas (d) (Fotografias originais).

2.1.3. Sistema de alimentação de membrana Hemotek™ 5W1

O sistema Hemotek™ 5W1 é uma tecnologia de alimentação de membrana concebida para alimentar artrópodes hematófagos (Figura 11). Este inclui:

- i. uma fonte de alimentação PS5 que se liga à rede elétrica e se conectam os alimentadores FU1;
- ii. alimentadores FU1 com respetivo cabo que se conecta ao painel frontal da fonte de alimentação PS5. O corpo de plástico do alimentador FU1 sustende uma pequena placa de aquecimento com um pino para inserir o recipiente de refeição;
- iii. recipientes metálicos de refeição em forma de disco, com uma área para alimentação de 660 mm² e com capacidade de 1 ml de sangue;
- iv. anéis de vedação “O-rings” para fixar a película no respetivo recipiente de refeição;
- v. termómetro digital e sonda que permite a medição da temperatura da placa de aquecimento do alimentador.

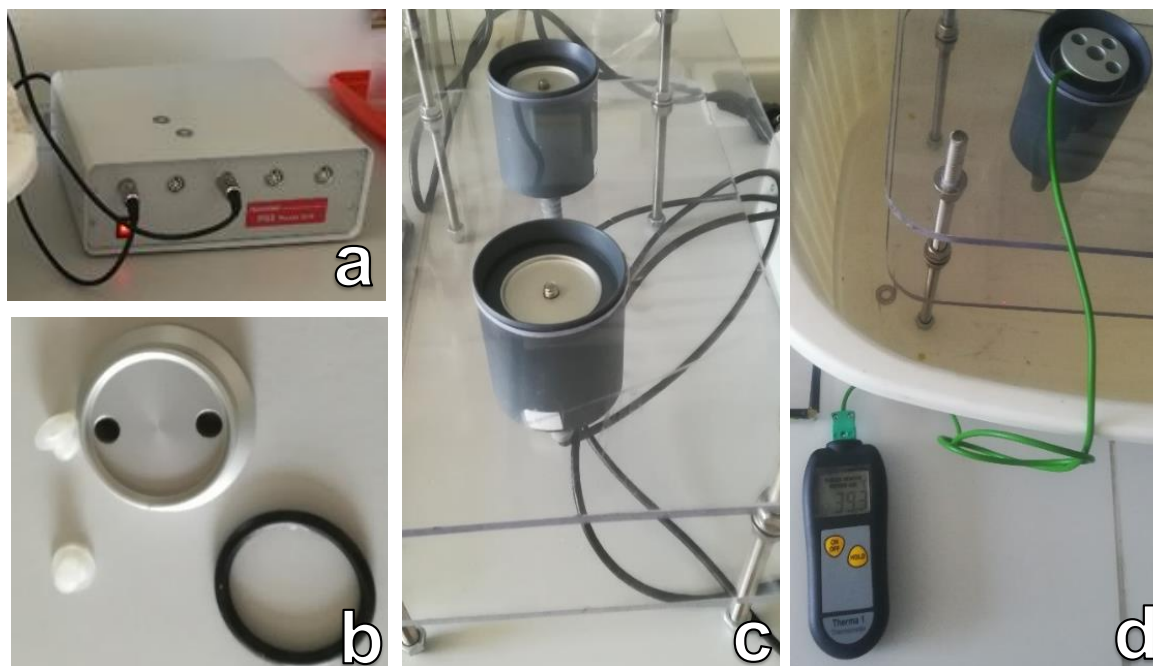


Figura 11. Aspeto da fonte de alimentação PS5 (a), aspeto de um recipiente metálico de refeição, um anel de vedação “O-ring” e duas tampas de plástico para introdução nos orifícios do recipiente de refeição (b); aspeto dos dois alimentadores FU1 inseridos na caixa de acrílico e em que se pode observar o pino no centro da placa de aquecimento (c), aspeto da medição da temperatura da placa de aquecimento, antes do início do ensaio, através da sonda e termómetro digital (d) (Fotografias originais).

2.1.4. Óleos essenciais e a sua diluição e o controlo negativo

Os OE selecionados foram adquiridos na “Blossom Essence” e tiveram como preferência serem integrais, puros e de extração de plantas em território português. Também se procurou que existisse a mínima possibilidade de conterem compostos sintéticos. Pois, para além de ser pretendido um produto sustentável, a qualidade de não conter outros compostos adicionados, pressupõem a fiabilidade do produto utilizado e de seus resultados.

Com isto, detalha-se que:

- i. o OE de *E. globulus* Labill, 100 % puro, utilizado foi extraído por destilação por arrastamento de vapor das folhas, as quais foram coletadas de eucaliptos, espontâneos em Proença-a-Nova, Portugal. Através da análise cromatográfica identifica-se que o constituinte com maior percentagem é o 1,8-cineol, com valores percentuais entre 70% e 85% (Anexo 2);
- ii. o OE de *T. vulgaris* L. quimiotipo (CT) Timol, 100 % puro, utilizado foi extraído por destilação por arrastamento de vapor das partes aéreas floridas, as quais foram apanhadas de tomilhos em cultivo em Barrancos, Portugal. Através da análise cromatográfica identifica-se que o constituinte com maior percentagem é o timol, com valores percentuais entre 43% e 49 % (Anexo 3).

Nos ensaios testaram-se os OE de *E. globulus* e de *T. vulgaris*, 100% puros, em diluições de 2,5% e de 5%. A sua diluição foi executada conforme descrito em seguida.

No 1.º e 2.º ensaio utilizou-se a diluição de 2,5% do OE de *E. globulus* e no 3.º ensaio utilizou-se a mesma diluição para o OE de *T. vulgaris*. Para fazer a diluição retirou-se uma alíquota de 25 µl do respetivo OE e adicionou-se 975 µl de óleo de coco, *Cocos nucifera*, inodoro, num tubo de Eppendorf agitando até total dissolução. Obteve-se, assim, OE de *E. globulus* a 2,5% para o 1º e 2º ensaio e OE de *T. vulgaris* a 2,5% para o 3º ensaio.

No 4.º e 5.º ensaio utilizou-se a diluição de 5% do OE de *E. globulus* e do OE de *T. vulgaris* respetivamente. Para fazer a diluição retirou-se uma alíquota de 50 µl do OE e adicionou-se a 950 µl de óleo de coco inodoro, num tubo de Eppendorf agitando até total dissolução. Obteve-se, assim, OE *E. globulus* a 5 % para o 4.º ensaio e OE de *T. vulgaris* a 5% para o 5.º Ensaio.

No 6.º ensaio não foi feita qualquer diluição, pois a substância a ser testada foi o óleo de coco inodoro a 100% e não houve nenhuma substância colocada no controlo negativo. O óleo de coco, inodoro, é uma gordura comumente utilizada para diluir os OE. Este ensaio teve o propósito de verificar se o óleo de coco, inodoro, funcionava como um controlo negativo, isto é, que não tivesse qualquer interferência com a locomoção e o posicionamento dos ixodídeos.

2.1.5. Preparatórios dos ensaios

Antes do início de cada ensaio, fez-se um conjunto de etapas preparatórias, conforme explicado em seguida.

Selou-se a abertura de cada recipiente de refeição com película "Parafilm® "M" e prendeu-se com um anel "O-ring". A película excedente foi retirada com uma tesoura. De seguida, agitou-se levemente o tubo com ácido etilendiamino tetra-acético, EDTA, contendo

o sangue venoso de coelho-bravo colhido no máximo até 5 horas antes do ensaio. Logo, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur encheram-se os recipientes de refeição com o sangue através de um dos dois orifícios de enchimento (Figura 12) e os orifícios foram tapados com tampas de plástico. Os recipientes de refeição foram enroscados no pino da placa de aquecimento do alimentador. Seguidamente, fez-se a ligação do alimentador à fonte de alimentação PS5 através dos respetivos cabos e ligou-se à corrente elétrica, para permitir o aquecimento dos recipientes de refeição contendo o sangue e mediu-se a temperatura com um termómetro digital (Figura 12). O sangue manteve-se à temperatura aproximada de $37,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ no 1º, 2º e 3º ensaio, de $38,5 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ no 4º ensaio, de $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ no 5º ensaio e de $39,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ no 6º ensaio.

Colocou-se cada anel de papel de filtro em volta do respetivo recipiente de refeição e com o auxílio de duas pipetas de Pasteur impregnaram-se os anéis de papel de filtro, um com o óleo de coco (controlo negativo) e o outro com o OE (substância a ser testada) (Figura 13). Por fim, colocaram-se pelos de coelho-bravo por cima de cada anel de papel de filtro (Figura 13). O pelo de coelho-bravo, foi colhido anteriormente ao dia 3 de março de 2020 para os ensaios nº1, nº2 e nº3; e para garantir a presença de odor, colheu-se novamente no dia 12 de julho de 2020 e foi utilizado nos ensaios nº4, nº5 e nº6.

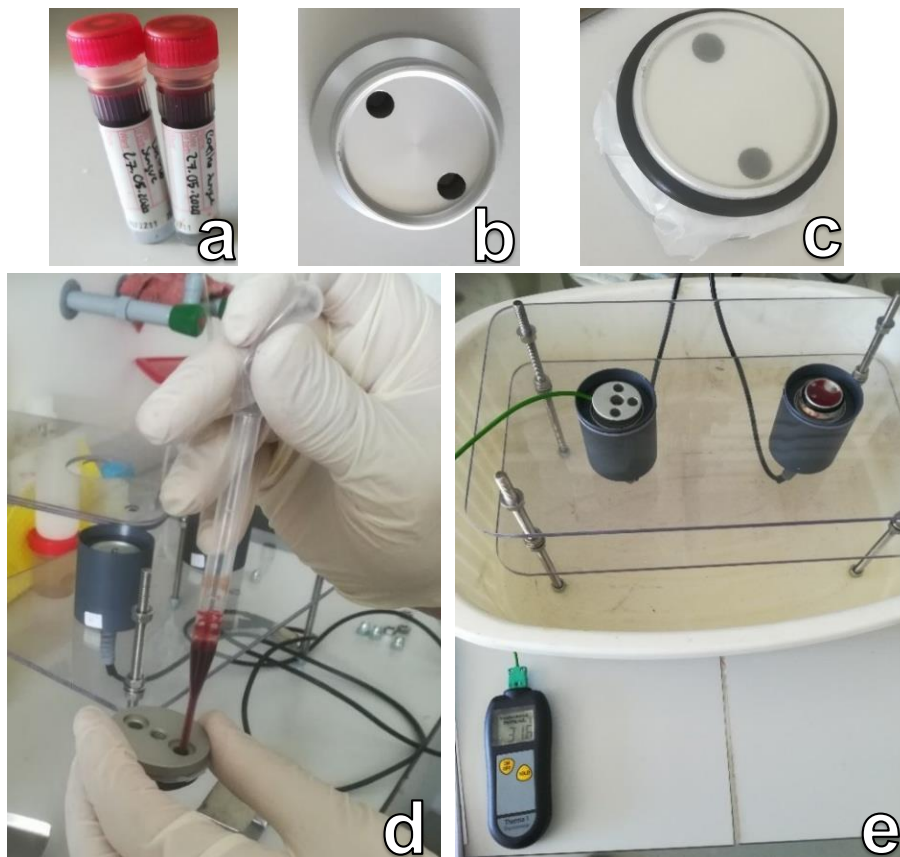


Figura 12. Dois tubos com EDTA contendo o sangue de coelho-bravo (a), recipiente de refeição onde se coloca o sangue com anticoagulante (b), recipiente de refeição vedado com a película “Parafilm® “M” esticada com o anel de vedação “O-rings” (c), enchimento do recipiente de refeição com sangue, através de um dos orifícios de enchimento e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur (d), medição da temperatura da placa de aquecimento com o termómetro digital, antes do início do ensaio (e) (Fotografias originais).

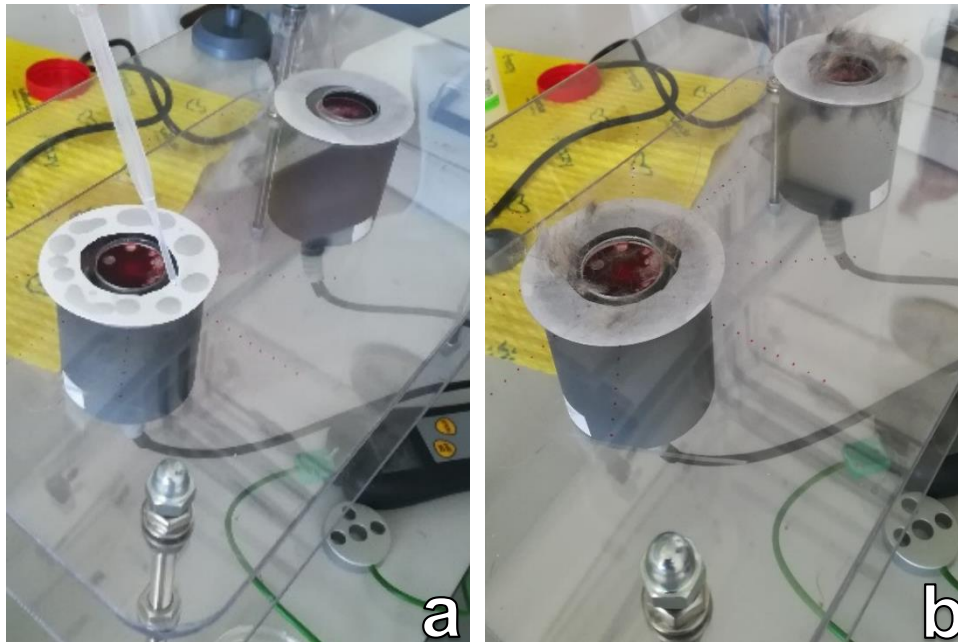


Figura 13. Colocação do óleo de coco, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, sobre o anel de papel de filtro (a) e aspecto da placa de acrílico da caixa, após a colocação do pelo de coelho-bravo sobre o anel de papel de filtro embebido em óleo de coco e o anel de papel de filtro embebido em OE de *T. vulgaris* a 2,5% (b) no momento de preparação para o 2º ensaio (Fotografias originais).

Para o ensaio nº6 fez-se a mesma preparação conforme descrito anteriormente, à exceção de que a substância testada foi o óleo vegetal de coco inodoro, a 100% (substância utilizada como controlo negativo nos ensaios anteriores), e no controlo negativo não foi colocada qualquer substância. Contudo, o anel de papel de filtro do controlo negativo foi cortado ao meio.

Colocou-se um recipiente com água por baixo da caixa de acrílico, como medida de precaução em caso de fuga de ixodídeos (este procedimento foi adotado a partir do 2º ensaio). Do mesmo modo, na ausência de estanquidade da tampa da caixa foram aplicados materiais como fita-cola e/ou plasticina.

Previamente ao início de cada ensaio, os ixodídeos foram transportados, cuidadosamente, dentro de placas de Petri e/ou frascos tapados e juntamente com acumuladores de gelo e/ou numa caixa de esferovite com gelo picado no seu interior. Procurou-se, assim, evitar os estímulos luminosos e inibir o movimento dos ixodídeos a fim de impedir o seu desgaste energético. As informações referentes ao material utilizado e respetivas especificações encontram-se na Tabela 25 do Anexo 4; e os objetivos primordiais de cada ensaio e informações dos ixodídeos utilizados nestes, encontram-se detalhadas na seguinte Tabela 3:

Tabela 3. Ensaios realizados e respetiva descrição.

Nº Ensaio	Fases do ensaio	Ixodídeos		
		Captura e origem	Qtd*	Género
1	-Validação da caixa de acrílico; -Avaliação da ação repelente do OE de <i>E. globulus</i> a 2,5%.	-Método de arrastamento de bandeira na Herdade do Infantado e posterior acondicionamento em laboratório para permitir as ecdises, realizado no dia 1 de novembro de 2019.	10	- <i>Hyalomma</i> .
2	-Averiguação das alterações feitas à caixa de acrílico, que consistiram em duas aberturas na tampa da caixa de acrílico, por cima de cada membrana de refeição cobertas por rede mosquiteira; -Avaliação da ação repelente do OE de <i>E. globulus</i> a 2,5%.	-Método de arrastamento de bandeira na Herdade do Infantado, 3 dias antes do ensaio.	15	- <i>Dermacentor</i> ; - <i>Rhipicephalus</i> .
3	-Validação das alterações da caixa de acrílico, tal como descrito no 2º ensaio; -Avaliação da ação repelente do OE de <i>T. vulgaris</i> a 2,5%.	-Método de arrastamento de bandeira na Herdade do Infantado, 3 dias antes do ensaio.	16	- <i>Hyalomma</i> .
4	-Validação da alteração da rede que cobre as duas aberturas da tampa da caixa de acrílico, que foi substituída por uma rede de malha fina esticada num aro amovível; -Avaliação da ação repelente do OE <i>E. globulus</i> diluído a 5%.	-Método de arrastamento de bandeira na Herdade do Infantado, no dia anterior ao ensaio.	15	- <i>Hyalomma</i> ; - <i>Rhipicephalus</i> .
5	-Validação da alteração da rede, tal como descrito no 4º ensaio; -Avaliação da ação repelente do OE de <i>T. vulgaris</i> diluído a 5%.	-Método de arrastamento de bandeira na Herdade do Infantado, no dia anterior ao ensaio.	12	- <i>Hyalomma</i> ; - <i>Dermacentor</i> .
6	-Avaliação do papel do óleo de coco, inodoro, a 100% como controlo negativo; -Apreciação da possível interferência do anel de papel de filtro.	-Método de arrastamento de bandeira na Herdade do Infantado, 2 dias antes do ensaio.	12	- <i>Hyalomma</i> ; - <i>Dermacentor</i> .

*Qtd - Quantidade

Durante os ensaios, registou-se a observação dos ixodídeos, através de anotações e captação de fotografias e filmagens. Foi registada a contagem de ixodídeos em relação à distância ao limite exterior dos anéis de papel de filtro em tempos estipulados, a observação da passagem pelo papel de filtro contendo a substância a ser testada e a contagem de ixodídeos mortos, por espécie e estágio, no final do ensaio. É de referir que, durante os

ensaios, recorreu-se à introdução de dióxido de carbono, através da respiração (expiração) humana, para o interior da caixa, para induzir o comportamento de busca de hospedeiros (Štefanidesová et al. 2017).

3. Análise estatística descritiva e metodologia de análise

A composição da amostra é independente para cada ensaio, visto que, os ixodídeos foram utilizados uma única vez para que se considerassem viáveis e, dessa forma, alcançar resultados fiáveis.

Uma vez que o número de ensaios realizado foi reduzido, apenas realizou-se uma análise estatística descritiva dos dados recolhidos sob a forma de amostra. Estes reduziram-se através de tabelas e gráficos e foi efetuado o cálculo das médias, com o auxílio das folhas de cálculo do programa Microsoft® Excel® 2019.

4. Resultados

4.1. Caracterização e composição das amostras

Neste estudo piloto, foram incluídos, nos 6 bioensaios, um total de 80 ixodídeos, dos quais 41,25% (n= 33/80) eram machos, 47,50% (n= 38/80) eram fêmeas e 11,25% (n= 9/80) eram ninfas (Tabela 4). No que concerne à espécie, 17,50% (n=14/80) eram *D. marginatus* (Figura 24, Anexo 5), 15,00% (n=12/80) eram *R. sanguineus* (Figura 22, Anexo 5) e 67,50% (n=54/80) eram *H. marginatum* (Figura 23, Anexo 5) (Tabela 4).

Tabela 4. Número de ixodídeos por espécie, sexo e fase evolutiva, e, a soma total e cálculo da percentagem

Nº Ensaio		1	2	3	4	5	6	Total	%
<i>D. marginatus</i>	Ninfas	0	0	0	0	0	0	14	17,50%
	Machos	0	4	0	0	0	1		
	Fêmeas	0	6	0	0	1	2		
<i>R. sanguineus</i>	Ninfas	0	2	0	4	0	0	12	15,00%
	Machos	0	1	0	3	0	0		
	Fêmeas	0	2	0	0	0	0		
<i>H. marginatum</i>	Ninfas	2	0	0	1	0	0	54	67,50%
	Machos	3	0	10	2	7	2		
	Fêmeas	5	0	6	5	4	7		
Total		10	15	16	15	12	12	80	100%

Alguns dos exemplares capturados encontram-se em seguida, na Figura 14 e os exemplares utilizados nos ensaios encontram-se nas Figuras 22, 23 e 24 no Anexo 5.

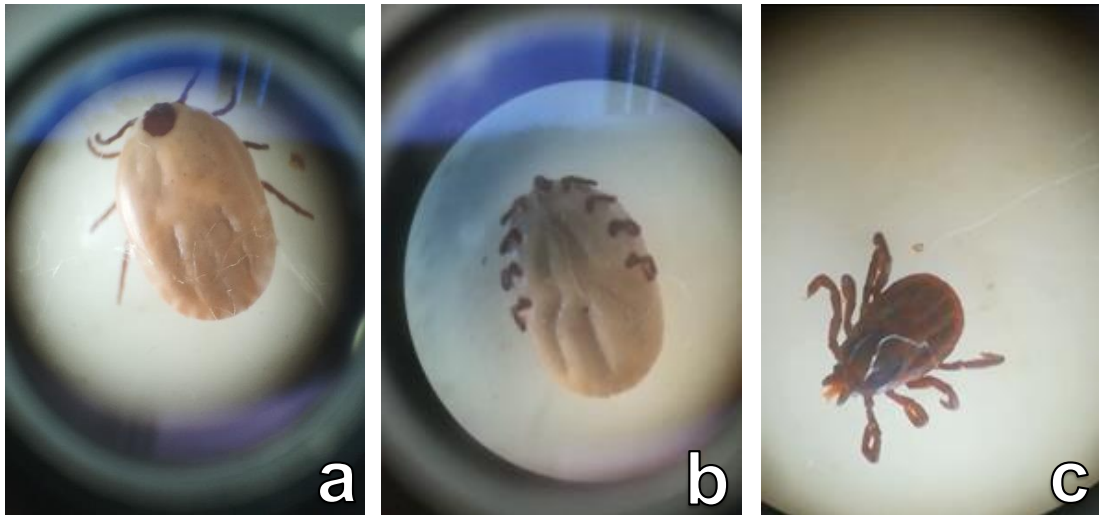


Figura 14. Fêmea *I. ricinus* ingurgitada em vista dorsal (a) e em vista ventral (b) e fêmea *I. ricinus* em vista dorsal (c), parasitas de um cão e observadas através de um estereomicroscópio binocular (Fotografias originais).

4.2. Criação de *D. marginatus* em laboratório

As 5 fêmeas recolhidas de bovinos, foram observadas com o auxílio de um estereomicroscópio binocular e identificadas com as chaves dicotômicas dos autores Estrada-Peña (2000) e Estrada-Peña et al. (2004). Estas encontravam-se ingurgitadas e eram da espécie *D. marginatus*.

Ao fim de 19 dias de terem sido acondicionadas na estufa, verificou-se a ovopostura numa das fêmeas, tendo a outra iniciado a ovopostura no dia seguinte. Após o início da ovopostura, a massa de ovos foi, de forma gradual, expelida por cada fêmea, como se pode observar nas Figuras 15 e 16.

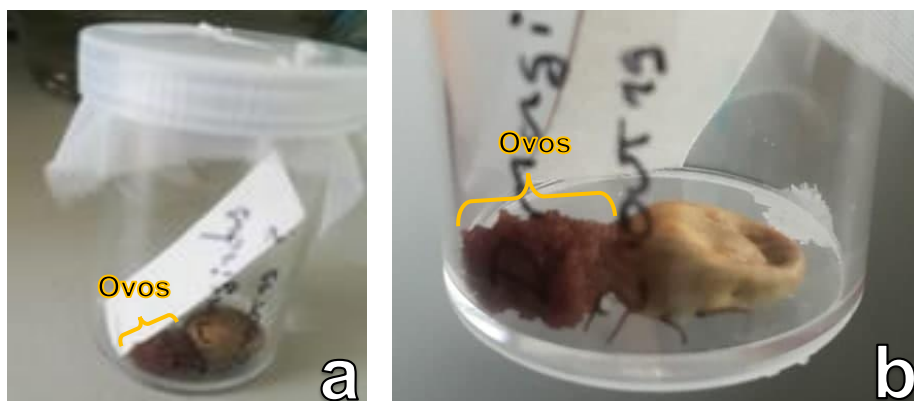


Figura 15. Fotografias das fêmeas *D. marginatus* em oviposição: a segunda fêmea com 1 dia após a deteção da ovopostura (a) e a primeira fêmea com 2 dias após a deteção da ovopostura (b). Massa de ovos assinalados com a chaveta amarela (Fotografias originais).

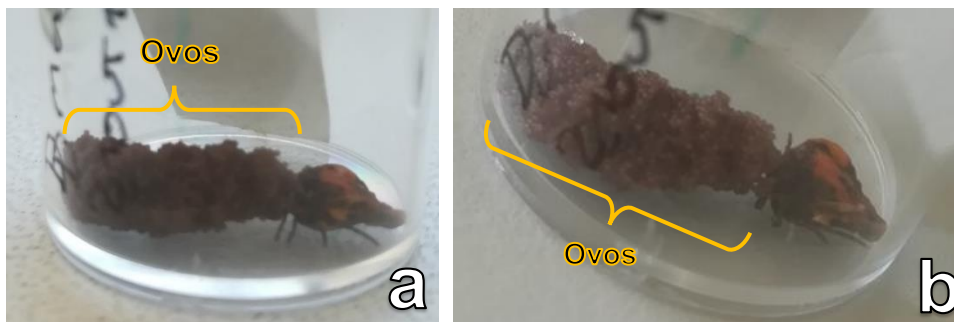


Figura 16. Aspeto da primeira fêmea em ovopostura: 24 dias (a) e 30 dias (b) após a detecção do início da ovopostura. Massa de ovos assinalados com a chave amarela (Fotografias originais).

Os ovos deixaram de ter o brilho natural e aparentavam estar secos, após 34 dias do início da ovopostura da primeira fêmea e 56 dias do início da ovopostura da segunda fêmea (Figura 17). De igual modo, constatou-se a separação das fêmeas à massa de ovos.

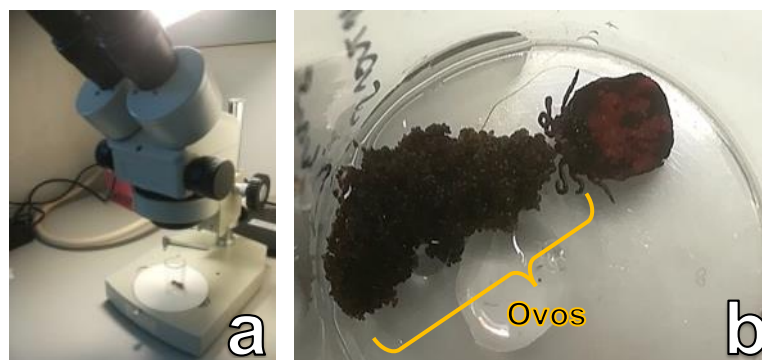


Figura 17. Aspeto do estereomicroscópio binocular para a visualização (a) da fêmea *D. marginatus* após 23 dias de se constatar a perda de brilho dos ovos e após 56 dias de se verificar o início da ovopostura (b). Ovos assinalados com a chave amarela (Fotografias originais).

4.3. Criação de *H. marginatum* em laboratório

Após 25 dias de terem sido acondicionadas na estufa, constatou-se o começo das ecdises dos ixodídeos *H. marginatum* e esta realizou-se por um período superior a 45 dias (Figura 18). Verificou-se que cerca de 94,12% das ninfas conseguiram realizar a muda.

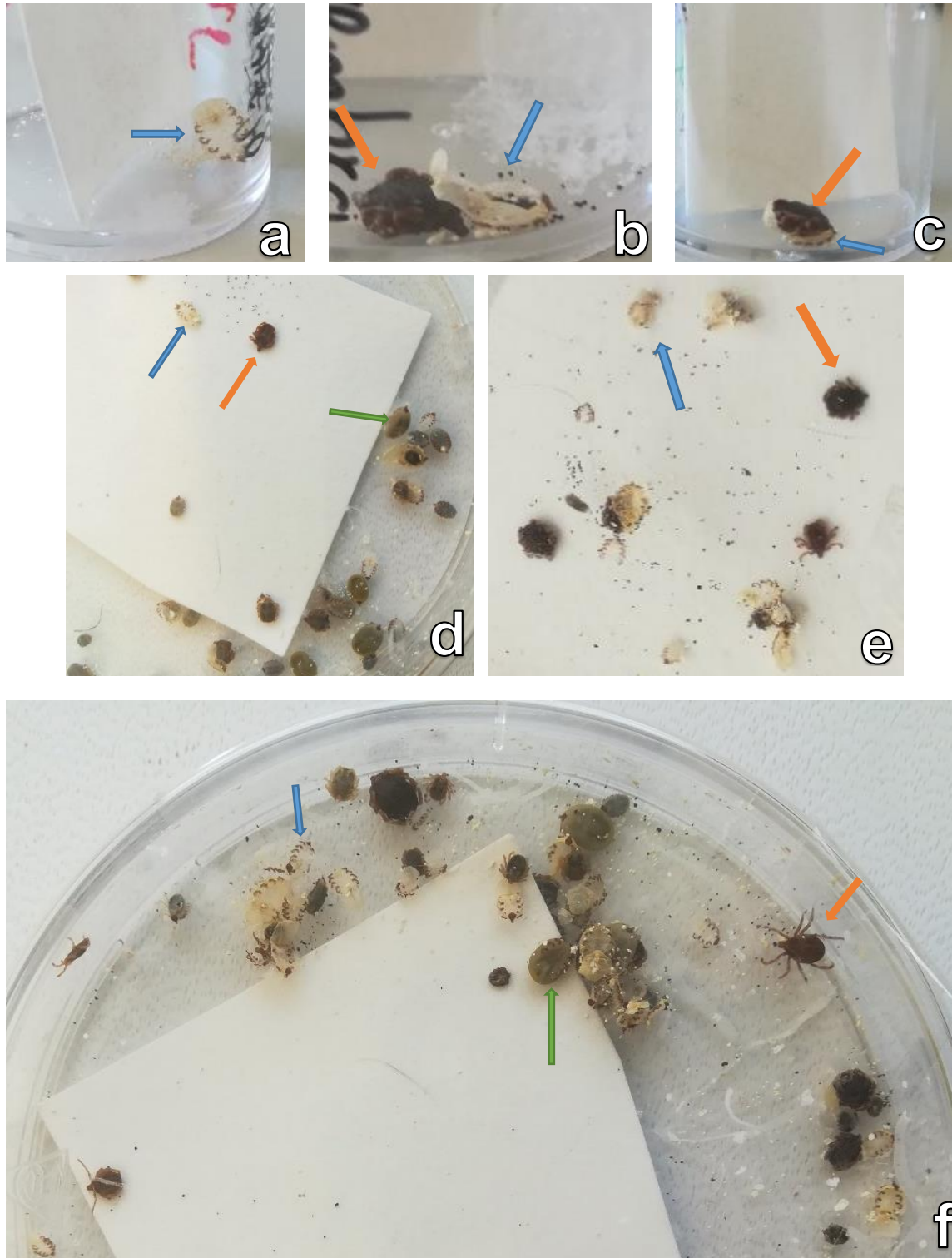


Figura 18. Aspeto das ecdises de *H. marginatum* 38 dias (a), (b), (c), 32 dias (d), 45 dias (e) e 39 dias (f) após terem sido colocados na estufa. Em que se pode observar as ninfas ingurgitadas (seta verde), as cutículas soltas dos artrópodes (seta azul) e os *H. marginatum* já em fase adulta (seta laranja) (Fotografias originais).

Após 124 dias das ninfas *H. marginatum* terem sido acondicionadas na estufa, foram utilizados no 1.º ensaio, 8 *H. marginatum* que atingiram a fase adulta (5 fêmeas e 3 machos) e 2 ninfas *H. marginatum* que não chegaram a fazer a muda.

4.4. Ensaio laboratoriais com o OE de *E. globulus* e o OE de *T. vulgaris*

Algumas informações fundamentais e resultados de cada ensaio encontram-se descritos na Tabela 5:

Tabela 5. Informações e alguns resultados relativos a cada ensaio.

Nº Ensaio	Substância testada	Quantidade de ixodídeos por espécie			Passagem pelo papel de filtro contendo o OE	Quantidade de ixodídeos mortos no final do ensaio por espécie e estágio
		Ninfas	Machos	Fêmeas		
1	OE de <i>E. globulus</i> (2,5%)	2 <i>H. m.</i>	3 <i>H. m.</i>	5 <i>H. m.</i>	Observado	0
2	OE de <i>E. globulus</i> (2,5%)	2 <i>R. s.</i>	4 <i>D. m.</i> 1 <i>R. s.</i>	6 <i>D. m.</i> 2 <i>R. s.</i>	Observado	1 macho <i>D. m.</i> 2 ninfas <i>R. s.</i>
3	OE de <i>T. vulgaris</i> (2,5%)	0	10 <i>H. m.</i>	6 <i>H. m.</i>	Observado	1 fêmea <i>H. m.</i>
4	OE de <i>E. globulus</i> (5%)	1 <i>H. m.</i> 4 <i>R. s.</i>	2 <i>H. m.</i> 3 <i>R. s.</i>	5 <i>H. m.</i>	Observado	1 ninfa <i>R. s.</i>
5	OE de <i>T. vulgaris</i> (5%)	0	7 <i>H. m.</i>	4 <i>H. m.</i> 1 <i>D. m.</i>	Observado	1 macho <i>H. m.</i>
6	Óleo de coco (100%)	0	2 <i>H. m.</i> 1 <i>D. m.</i>	7 <i>H. m.</i> 2 <i>D. m.</i>	Observado	0

Legenda: *H. m.* – *H. marginatus*; *D. m.* – *D. marginatum*; *R. s.* – *R. sanguineus*.

4.4.1. Ensaio nº1 - ação do OE de *E. globulus* a 2,5% em *H. marginatum*

O ensaio teve a duração total de 19 horas, porém a observação de *H. marginatum* foi realizada até aos 210 minutos. As informações relativas à distância de *H. marginatum* ao limite exterior dos anéis de papel de filtro (aproximando-se e afastando-se do papel de filtro), ao longo do tempo encontram-se detalhadas nas Tabelas 6 e 7; e representadas no Gráfico 1. O número de *H. marginatum* que ficaram imobilizados no centro da caixa, desde o início do ensaio, está mencionado na Tabela 8.

Tabela 6. Registo do número de *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de *E. globulus* diluído a 2,5% em óleo coco inodoro) nos minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5					1	3
10	1				1	3
15						2
20						6
35						6
50	1		1			4
65	1					4
80	1					5
95	1					4
120	1 (1*)			1		1
180	1 (1*)					3
210	1 (1*)					3
1140	1 (1*)					3

Tabela 7. Registo do número de *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo (óleo de coco inodoro) em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5	1					5
10						5
15	1					7
20	2					2
35	1					3
50	1					3
65	2					3
80	1					3
95	2					3
120	3 (2*)					4
180	4 (3*)					2
210	4 (3*)					2
1140	4 (3*)					2

*Número de ixodídeos dos quais se encontravam a uma distância menor que <0,5 cm e em posição semelhante à de alimentação por cima da membrana de refeição.

Tabela 8. Registo do número de *H. marginatum* imobilizados no centro da caixa em minutos (min) estipulados, desde o início do ensaio.

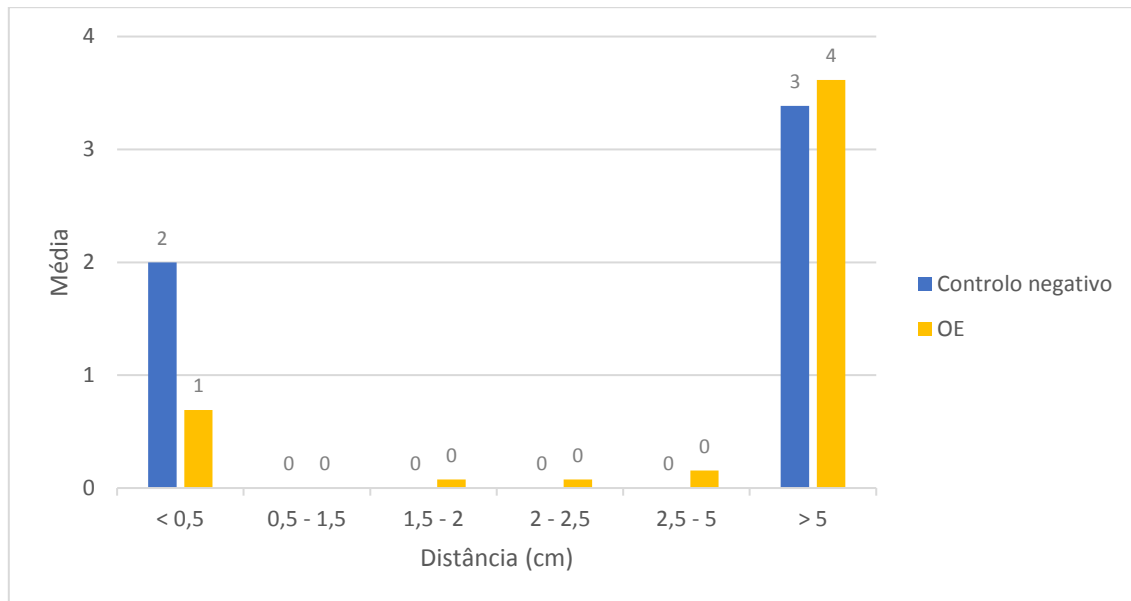
Tempo (min)	5	10	15	20	35	50	65	80	95	120	180	210	1140
Número de ixodídeos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

No início do 1º ensaio, foi observado que *H. marginatum* percorriam a caixa de acrílico com um movimento aleatório e com breves pausas. Sensivelmente a partir dos 9 minutos de ensaio, vários *H. marginatum* começaram a ter tendência de se agrupar e repousar nos cantos, sendo o canto inferior (lado do OE) e o canto superior direito (lado do controlo negativo) os mais procurados. Ao longo do ensaio foi possível observar, inúmeras vezes, *H. marginatum* a atravessarem tanto o papel de filtro que continha o OE, como o que continha

controlo negativo.

No final do 1º ensaio, encontrou-se um *H. marginatum* por cima da membrana de refeição em posição semelhante à de alimentação no lado do OE, três *H. marginatum* na mesma posição por cima da membrana de refeição do lado do controlo negativo e um *H. marginatum* junto ao anel de papel de filtro do controlo negativo (Tabelas 6 e 7).

Gráfico 1. Média do número de *H. marginatum* por intervalo de distância (ensaio nº1).



H. marginatum não estiveram imóveis no centro da caixa, desde o início do ensaio, por isso, não estão representados em gráfico por terem valor nulo.

Os resultados esquematizados no Gráfico 1 revelam que a média de *H. marginatum* que se encontraram a uma distância menor que 0,5 cm do anel de filtro, durante a observação do ensaio, teve um valor numérico superior no lado do controlo negativo. Contudo, a uma distância superior a 5 cm, verificou-se o inverso. Além disso, foi observado que a maioria dos *H. marginatum* encontraram-se a uma distância superior a 5 cm.

4.4.2. Ensaio nº2 – ação do OE de *E. globulus* a 2,5% em *D. marginatus* e *R. sanguineus*

O ensaio teve a duração total de 3 horas. As informações relativas à distância dos ixodídeos ao limite exterior dos anéis de papel de filtro (aproximando-se e afastando-se do papel de filtro), ao longo do tempo encontram-se descritas nas Tabelas 9 e 10; e representadas no Gráfico 2. O número de ixodídeos que ficaram imobilizados no centro da caixa, desde o início do ensaio, está mencionado na Tabela 11 e representado no Gráfico 3.

Tabela 9. Registo do número de *D. marginatus* e *R. sanguineus* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de *E. globulus* diluído a 2,5% em óleo de coco inodoro, em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5						3
10				1		2
15			1			2
20				1		1
35				1		3
50						1
65						3
80	1			1		
95					2	
120	1				3	
180	1			1		2

Tabela 10. Registo do número de *D. marginatus* e *R. sanguineus* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo (óleo de coco inodoro) em minutos (min) estipulados.

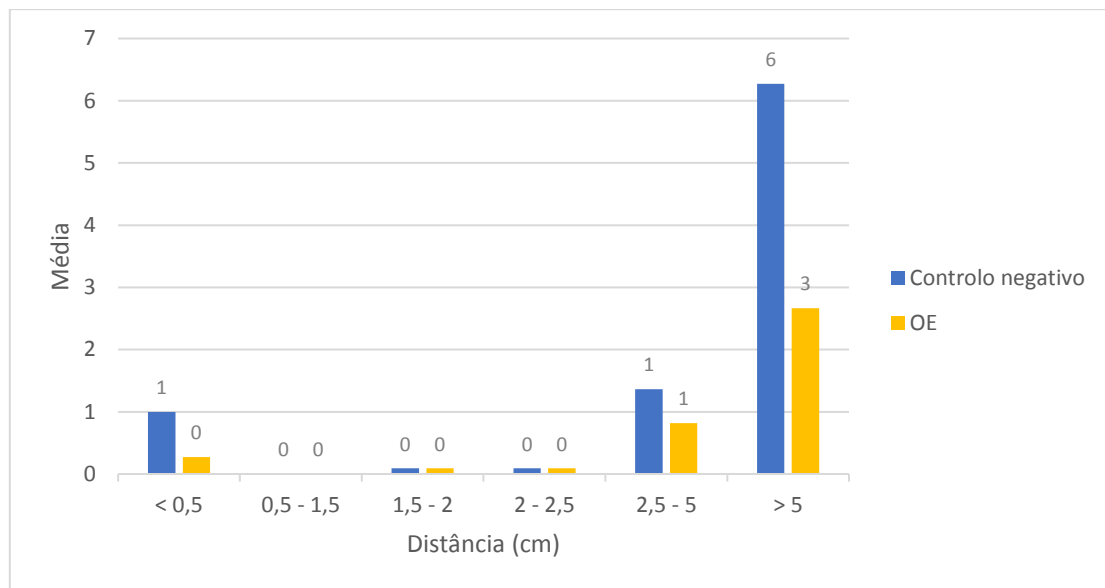
Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5	3				1	4
10	1					7
15					2	6
20	1				2	6
35					1	7
50	2				3	6
65					3	6
80				1		9
95	1				2	7
120	2		1		1	4
180	1					7

Tabela 11. Registo do número de *D. marginatus* e *R. sanguineus* imobilizados no centro da caixa em minutos (min) estipulados, desde o início do ensaio.

Tempo (min)	5	10	15	20	35	50	65	80	95	120	180
Número de ixodídeos	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3

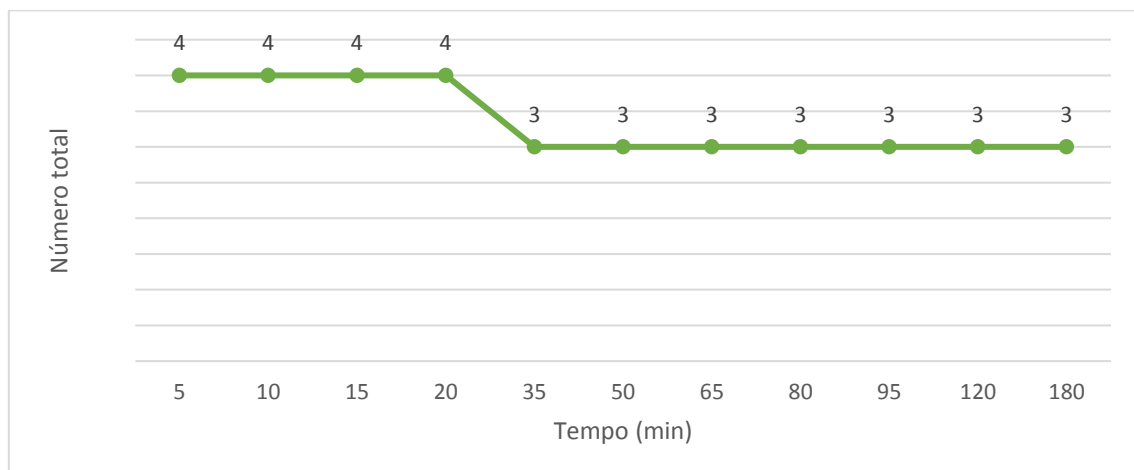
Durante o ensaio nº2 foi possível observar que: a movimentação dos ixodídeos ocorreu preferencialmente pelas laterais da caixa; frequentemente formaram-se agrupamentos de alguns ixodídeos no canto inferior do lado do controlo negativo; houve poucas aproximações a ambas as membranas de refeição e poucas interações e permanência nos pelos do coelho-bravo.

Gráfico 2. Média do número de *D. marginatus* e *R. sanguineus* por intervalo de distância (ensaio nº2).



Os resultados representados no Gráfico 2 demonstram que a média de *D. marginatus* e *R. sanguineus* que se encontraram a uma distância menor que 0,5 cm do anel de filtro, teve um valor numérico superior no lado do controlo negativo. Adicionalmente, a uma distância superior a 5 cm, verificou-se que os ixodídeos encontraram-se duas vezes mais no lado do controlo negativo. A maioria dos ixodídeos encontraram-se a uma distância superior a 5 cm e no lado do controlo negativo.

Gráfico 3. Número de *D. marginatus* e *R. sanguineus* imóveis, desde a sua colocação, ao longo do tempo (ensaio nº2).



Em relação ao Gráfico 3, observou-se que em relação ao número de ixodídeos imobilizados no centro da caixa, verificou-se que apenas um ixodídeo deixou de estar imobilizado no centro da caixa, pelos 35 minutos de ensaio, e 3 ixodídeos não chegaram a deslocar-se.

4.4.3. Ensaio nº 3 – ação do OE de *T. vulgaris* a 2,5% em *H. marginatum*

O ensaio teve a duração total de 3 horas. As informações relativas à distância de *H. marginatum* ao limite exterior dos anéis de papel de filtro (aproximando-se e afastando-se do papel de filtro), ao longo do tempo encontram-se descritas nas Tabelas 12 e 13; e representadas no Gráfico 4. O número de *H. marginatum* que ficaram imobilizados no centro da caixa, desde o início do ensaio, está mencionado na Tabela 14 e exposto no Gráfico 5.

Tabela 12. Registo do número de *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de *T. vulgaris* diluído a 2,5% em óleo de coco inodoro, em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5	1				1	
10					2	2
15	1				1	3
20	1				1	4
35	1				1	3
50					3	2
65	1				1	1
80		1		1	1	4
95			1			4
120						2
180	2					2

Tabela 13. Registo do número de *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo (óleo de coco inodoro) em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5	3		1	1	2	3
10	3			2	4	
15	3	1		3	1	
20	2				1	5
35	3				2	4
50	1				3	5
65			1	1	2	7
80	2				1	4
95	2					7
120	1			2	1	8
180	2	2			1	5

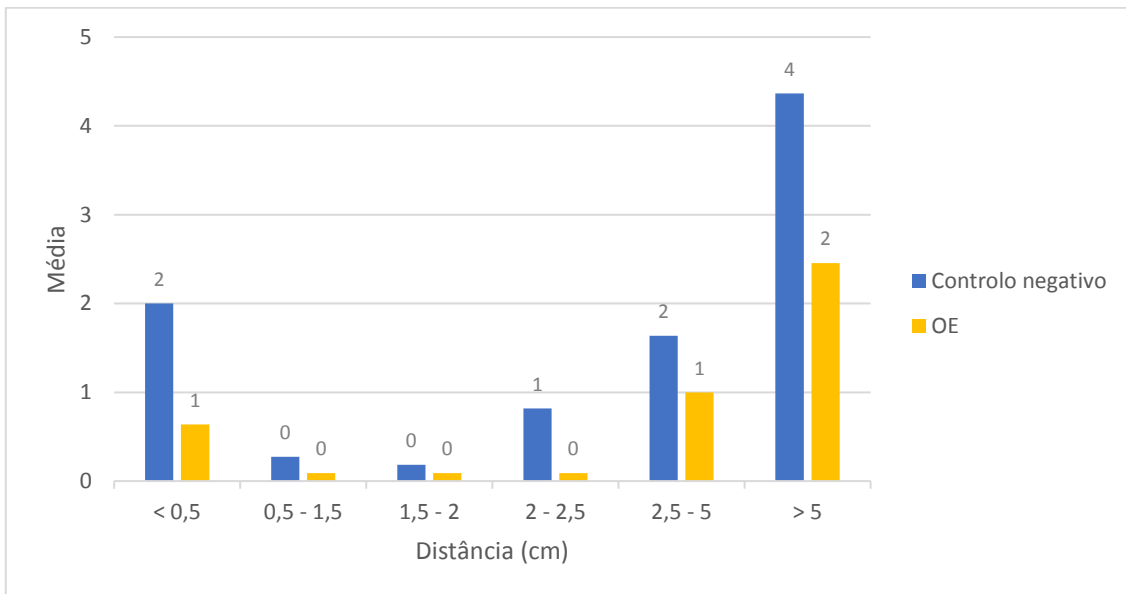
Tabela 14. Registo do número de *H. marginatum* imobilizados no centro da caixa em minutos (min) estipulados, desde o início do ensaio.

Tempo (min)	5	10	15	20	35	50	65	80	95	120	180
Número de ixodídeos	4	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2

Durante o 3º ensaio, observaram-se vários aspetos, tais como: a existência de agrupamento de alguns *H. marginatum* no canto inferior do lado do controlo negativo; alguns *H. marginatum* ficaram imóveis durante o ensaio no centro da caixa (Tabela 14) e um exemplar de *H. marginatum* ficou imóvel próximo ao papel de filtro do controlo negativo, a uma distância de 0,5 cm, até aproximadamente ao minuto 61; a movimentação de *H. marginatum* ocorreu por toda a caixa e existiu aproximação a ambas as membranas de refeição, embora, com maior frequência à do lado do controlo negativo. Acrescenta-se que, existiu pouca interação e pouca permanência nos pelos do coelho-bravo e de uma forma geral, à exceção dos *H. marginatum* que ficaram imobilizados desde o início do ensaio, os ixodídeos apresentavam-

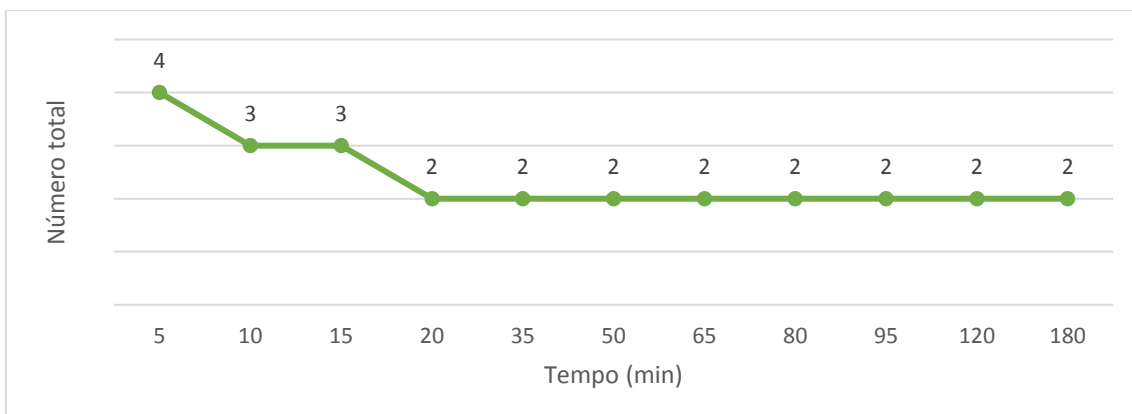
se muito ativos e com uma rápida locomoção.

Gráfico 4. Média do número de *H. marginatum* por intervalo de distância (ensaio nº 3).



Os resultados apresentados no Gráfico 4 revelaram que *H. marginatum*, ao longo do ensaio, encontraram-se sobretudo no lado do controlo negativo e que a média de *H. marginatum* que se encontraram a uma distância menor que 0,5 cm do anel de filtro, teve um valor numérico superior no lado do controlo negativo. O mesmo ocorreu à distância de 2 a 2,5 cm e de 2,5 a 5 cm. Sendo que, à distância superior a 5 cm, verificou-se que *H. marginatum* encontraram-se duas vezes mais no lado do controlo negativo.

Gráfico 5. Número de *H. marginatum* imóveis, desde a sua colocação, ao longo do tempo (ensaio nº 3).



Em relação ao Gráfico 5, observa-se que o número de *H. marginatum* imobilizados no centro da caixa diminuiu até metade. Ou seja, inicialmente encontraram-se 4 exemplares de *H. marginatum* imobilizados no centro da caixa, e sensivelmente aos 20 minutos, apenas 2 destes continuaram imobilizados.

4.4.4. Ensaio nº 4 – ação do OE de *E. globulus* a 5% em *H. marginatum* e *R. sanguineus*

O ensaio teve a duração total de 3 horas. As informações relativas à distância dos ixodídeos ao limite exterior dos anéis de papel de filtro (aproximando-se e afastando-se do papel de filtro), ao longo do tempo encontram-se descritas nas Tabelas 15 e 16; e representadas no Gráfico 6. O número de ixodídeos que ficaram imobilizados no centro da caixa, desde o início do ensaio, está mencionado na Tabela 17.

Tabela 15. Registo do número de *H. marginatum* e *R. sanguineus*, e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de *E. globulus* diluído a 5% em óleo de coco inodoro, em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5						7
10						9
15						8
20						9
35						8
50						9
65						8
80				1		9
95					2	6
120					2	6
180	1(1*)				1	4

Tabela 16. Registo do número de *H. marginatum* e *R. sanguineus*, e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo (óleo de coco inodoro) em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5					1	7
10					1	5
15					1	6
20					1	5
35	1				1	5(3**)
50	2					4(2**)
65				1	1	7
80					1	4
95				1	1	5
120	3					4(1**)
180					3(1**)	6

*Número de ixodídeos dos quais se encontravam a uma distância menor que <0,5 cm e em posição semelhante à de alimentação por cima da membrana de refeição.

**Número de ixodídeos dos quais se encontravam imobilizados.

Tabela 17. Registo do número de *H. marginatum* e *R. sanguineus* imobilizados no centro da caixa em minutos (min) estipulados desde o início do ensaio.

Tempo (min)	5	10	15	20	35	50	65	80	95	120	180
Número de ixodídeos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

De uma forma geral, observou-se o agrupamento de vários ixodídeos no canto inferior do lado do OE; dois ixodídeos imóveis, durante vários minutos, no canto inferior do lado do controlo negativo e alguns ixodídeos a movimentarem-se, de forma dispersa, pela caixa. Foi também observado, várias vezes ao longo do ensaio, a posição de “questing” (Figura 19) e poucas vezes a interação com o pelo (Figura 20). É de referir que, embora poucas vezes, observou-se o comportamento do ixodídeo dirigir-se para o anel de papel de filtro, do OE e do

controlo negativo, e inverter a direção ou desviar-se. Foi também registado que, os ixodídeos movimentaram-se por cima de ambos os anéis de papel de filtro. Adicionalmente, salienta-se que, *H. marginatum* foram os ixodídeos que demonstraram maior atividade de locomoção e foi pelo menos uma vez observado, um ixodídeo passar por cima da membrana de refeição, neste caso a membrana do lado do controlo negativo.

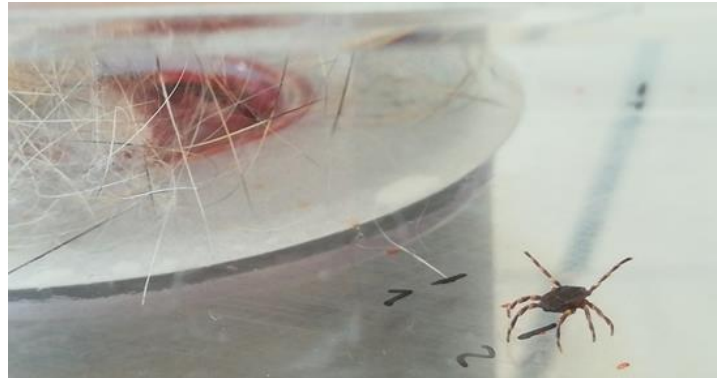


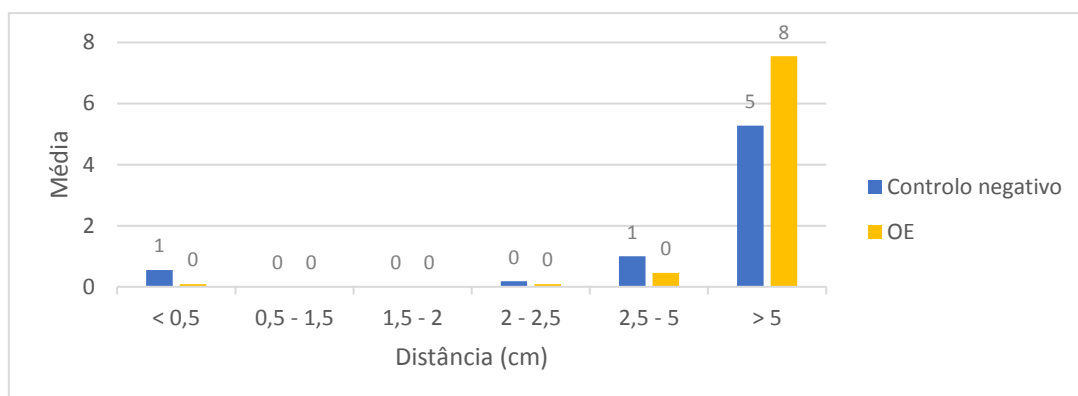
Figura 19. Aspeto de um *H. marginatum* em posição de “questing”, a 2 cm de distância do anel de papel de filtro embebido no OE *E. globulus* a 5%, aos 95 minutos do ensaio nº4.



Figura 20. Aspeto de um *H. marginatum* a interagir, durante algum tempo e com agitação, com o pelo que se encontrava por cima do papel de filtro do controlo negativo, aos 86 minutos do ensaio nº 4.

H. marginatum e *R. sanguineus* não estiveram imóveis no centro da caixa, desde o início do ensaio, por isso, não estão representados em gráfico por terem valor nulo.

Gráfico 6. Média do número de *H. marginatum* e *R. sanguineus* por intervalo de distância (ensaio nº 4).



Mediante a análise do Gráfico 6, verificou-se que a média de ixodídeos que se

encontraram a uma distância menor que 0,5 cm e entre 2,5 cm a 5 cm do papel de filtro, teve um valor numérico superior no lado do controlo negativo. Já à distância superior a 5 cm, verificou-se que, a média de ixodídeos teve 3 valores numéricos a mais no lado do OE. Do mesmo modo, a maioria dos ixodídeos encontraram-se a uma distância superior a 5 cm e maioritariamente no lado do OE.

4.4.5. Ensaio nº 5 – ação do OE de *T. vulgaris* a 5% em *D. marginatus* e *H. marginatum*

O ensaio teve a duração total de 3 horas. As informações relativas à distância dos ixodídeos ao limite exterior dos anéis de papel de filtro (aproximando-se e afastando-se do papel de filtro), ao longo do tempo encontram-se descritas nas Tabelas 18 e 19, e representadas no Gráfico 7. O número de ixodídeos que ficaram imobilizados no centro da caixa, desde o início do ensaio, está mencionado na Tabela 20.

Tabela 18. Registo do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o OE de *T. vulgaris* diluído a 5% em óleo de coco inodoro) em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5						1
10						3
15				2	2	
20				2		
35				2	4	
50				1	4	
65				4	2	
80	1					5
95		1				3
120				1		5
180				3		

Tabela 19. Registo do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o controlo negativo (óleo de coco inodoro) em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5						11
10						9
15					1	7
20					3	7
35	1			1	2	2
50					2	5
65					3	3
80				1	3	2
95				1	2	5
120		1			3	2
180	2(1*)				2	5

*Número de ixodídeos dos quais se encontravam a uma distância menor que <0,5 cm e em posição semelhante à de alimentação por cima da membrana de refeição.

Tabela 20. Registo do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* imobilizados no centro da caixa em minutos (min) estipulados, desde o início do ensaio.

Tempo (min)	5	10	15	20	35	50	65	80	95	120	180
Número de ixodídeos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aos 5 minutos de ensaio, quando se realizava a contagem, verificou-se que um

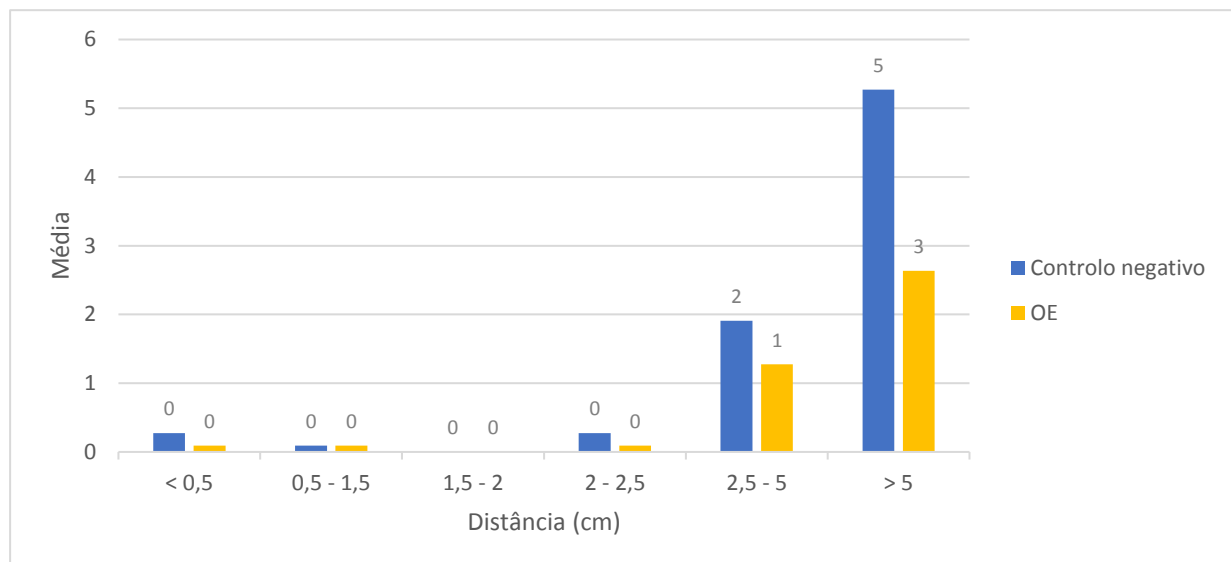
ixodídeo saiu da caixa pelo lado do controlo negativo, o qual foi contabilizado à distância maior que 5 cm. Nos instantes em que se voltou a colocá-lo dentro da caixa, molhou-se acidentalmente com a água contida no recipiente.

Observaram-se, alguns ixodídeos a dirigirem-se para o papel de filtro, do lado do OE e do controlo negativo, e na sua aproximação desviaram a sua trajetória. Contudo, ocorreram várias interações com o pelo e atravessamentos pelo papel de filtro do controlo negativo.

Aos 43 minutos de ensaio, observou-se um ixodídeo em cima da membrana de refeição do lado do OE e quando este se movimentava em direção ao anel de papel de filtro demonstrou várias tentativas seguidas de iniciar o atravessamento do anel, todavia recuava sucessivamente.

De forma geral, *D. marginatus* e *H. marginatum* estiveram constantemente em movimento e raramente formaram agrupamentos.

Gráfico 7. Média do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* por intervalo de distância (ensaio nº5).



D. marginatus e *H. marginatum* não estiveram imóveis no centro da caixa, desde o início do ensaio, por isso, não estão representados em gráfico por terem valor nulo.

Os resultados representados no Gráfico 7 demonstram que a média de *D. marginatus* e *H. marginatum* que se encontraram a uma distância entre 2,5 cm a 5 cm do anel de filtro, teve um valor numérico superior no lado do controlo negativo. E, a uma distância superior a 5 cm, verificou-se que a média de *D. marginatus* e *H. marginatum* teve 2 valores numéricos superiores no lado do controlo negativo. Além disso, *D. marginatus* e *H. marginatum* encontraram-se sobretudo a uma distância superior a 5 cm e no lado do controlo negativo.

4.4.6. Ensaio nº 6 – ação do óleo de coco inodoro em *D. marginatus* e *H. marginatum*

O ensaio teve a duração total de 3 horas e 20 minutos. As informações relativas à distância dos ixodídeos ao limite exterior dos anéis de papel de filtro (aproximando-se e afastando-se do papel de filtro), ao longo do tempo encontram-se descritas nas Tabelas 21 e 22; e representadas no Gráfico 8. O número de ixodídeos que ficaram imobilizados no centro da caixa, desde o início do ensaio, está mencionado na Tabela 23.

Tabela 21. Registo do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro que contém o óleo de coco inodoro, em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5				1		7
10		1				9
15					1	7
20					3	5
35				1	2	9
50				2	1	4
65				2	4	4
80					2	3
95	2			1		2
120				1	2	4
180	3			1	2	2

Tabela 22. Registo do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* e a sua distância em centímetros (cm) ao limite exterior do papel de filtro sem nenhuma substância (controlo negativo) em minutos (min) estipulados.

Tempo (min)	Distância (cm)					
	<0,5	0,5-1,5	1,5-2	2-2,5	2,5-5	>5
5						4
10	1					1
15				1		3
20						4
35						
50						5
65						2
80	1				1	5
95						7
120						5
180						4

Tabela 23. Registo do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* imobilizados no centro da caixa em minutos (min) estipulados desde o início do ensaio.

Tempo (min)	5	10	15	20	35	50	65	80	95	120	180
Número de ixodídeos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Durante o ensaio nº6, foi possível observar a passagem pelo papel de filtro e pelo lado sem papel de filtro do controlo negativo, e a o atravessamento pelo papel de filtro contendo o óleo de coco.

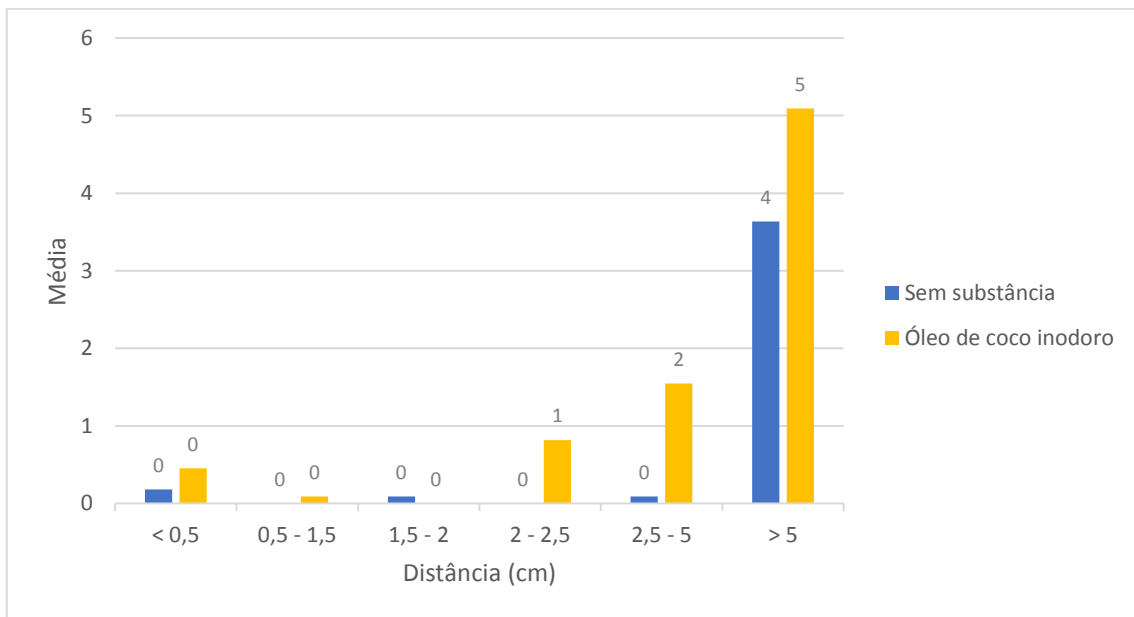
Aos 15 minutos, quando se expirou para dentro da caixa, de imediato, um ixodídeo atravessou o papel de filtro contendo o óleo de coco. Além disso, a partir dos 78 minutos, um ixodídeo repousou durante alguns minutos, por cima do papel de filtro impregnado com o óleo de coco (Figura 21).

De forma frequente, os ixodídeos colocaram-se em posição de “questing”.



Figura 21. Aspeto de dois ixodídeos, um em repouso e o outro em movimento, em cima do anel de papel de filtro embebido com o óleo de coco inodoro, aos 78 minutos do ensaio.

Gráfico 8. Média do número de *D. marginatus* e *H. marginatum* por intervalo de distância (ensaio nº 6).



D. marginatus e *H. marginatum* não estiveram imóveis no centro da caixa, desde o início do ensaio, por isso, não estão representados em gráfico por terem valor nulo.

Os resultados apresentados no Gráfico 8 revelam que a média de *D. marginatus* e *H. marginatum* que se encontraram a uma distância superior a 2 cm estiveram sobretudo no lado do óleo de coco. Concomitantemente, verificou-se que *D. marginatus* e *H. marginatum* encontraram-se a sobretudo a uma distância superior a 5 cm e com uma média com um valor numérico superior no lado do óleo de coco.

5. Discussão

Os objetivos propostos do presente estudo piloto foram cumpridos na sua quase totalidade. Em relação, à criação em laboratório de *D. marginatus*, apenas se conseguiu atingir a ovopostura e o pretendido era obter a eclosão de um número considerável de larvas. Por outro lado, foi alcançada uma grande percentagem de ecdises de *H. marginatum*. Em relação, à testagem da eficácia da ação repelente dos OE de *E. globulus* e de *T. vulgaris*, nas concentrações de 2,5% e 5%, em ninfas e adultos de *H. marginatum*, *D. marginatus* e *R. sanguineus*, apenas foi possível fazer um número reduzido de ensaios devido à falta de exemplares.

5.1. Captura, identificação e criação dos ixodídeos

Embora, se tenha obtido vários ixodídeos através das capturas, não foi possível alcançar o número de exemplares pretendidos para a realização de um maior número de ensaios. Tal pode ter sucedido, devido a uma época onde os artrópodes rarearam devido ao clima e, simultaneamente, a maioria dos animais examinados tenham sido submetidos a tratamentos de controlo de vetores. Do mesmo modo, a toalha utilizada no método de arrastamento da bandeira deveria ter sido impregnada com o odor do coelho-bravo, por exemplo, esfregando-a no corpo de um desses animais, uma vez que poderia aumentar as chances de captura.

É de referir, que durante a separação dos ixodídeos por géneros, antes do ensaio nº 1 e nº 2, acidentalmente, molharam-se alguns ixodídeos com água, pois, os mesmos saíram da placa de Petri onde estavam a ser colocados e caíram numa placa de Petri de tamanho maior que continha água e que evitava que os ixodídeos pudessem dispersar pela bancada. Apesar de ter sido ligeiro, pode ter potenciado ou estar relacionado, com a morte dos ixodídeos, que ocorreu no ensaio nº2; porém, não se descarta a hipótese da existência da ação acaricida do OE *E. globulus* a 2,5%.

Sabe-se que a temperatura é um dos fatores determinantes no ciclo de vida dos ixodídeos. Quando a temperatura diminui, há redução da sua atividade metabólica e o tempo necessário para o seu ciclo de vida aumenta; enquanto que, quando há um aumento da temperatura até um nível ideal, há aumento da atividade metabólica do ixodídeo e, com isso, leva ao encurtamento do tempo do ciclo de vida (Darvishi et al. 2014; Elhachimi et al. 2021). Por essa razão e por querermos manter a viabilidade dos ixodídeos capturados, foi necessário, durante a realização deste trabalho, o controlo da temperatura. Por outro lado, é de salientar que não foi utilizada qualquer tipo de luz artificial, ao contrário dos autores Darvishi et al. (2014), que utilizaram lâmpadas e padronizaram 12 horas de escuridão e 12 horas de claridade.

Ao acondicionarmos as 5 fêmeas *D. marginatus*, colocámos a uma temperatura de 25

°C, aproximada aos 26 ± 1 °C utilizada pelos autores Darvishi et al. (2014). Porém, após 11 dias, ainda que a temperatura escolhida seja preferível para as fêmeas iniciarem a ovopostura, reajustou-se a temperatura para que durante 3 horas do dia estivesse a 28°C, de forma a acomodar os exemplares de *H. marginatum* recém-capturados. Em relação à humidade relativa, esta iniciou-se com $75 \pm 1\%$, contudo, ao longo do tempo e entre manipulações, existiram variações entre 69% e 85% e com uma média aproximada de 73,23%. De acordo com Darvishi et al. (2014) a humidade relativa adequada para a criação de *D. marginatus* situa-se entre 70% e 75% e para as mudas, de ninfas para adultos, de *H. marginatum*, os autores Elhachimi (et al. 2021) utilizaram uma humidade relativa fixa de 84% com grande taxa de sucesso.

A duração do período de pré-oviposição após a alimentação das fêmeas *D. marginatus* e o seu acondicionamento, foi de 19 dias para a primeira fêmea *D. marginatus* e de 20 dias para a segunda fêmea *D. marginatus*. Este período de pré-oviposição foi superior ao obtido pelos autores Darvishi et al. (2014), que foi entre 4 a 6 dias. Porém, este resultado pode ser justificado pelo facto dos autores Darvishi et al. (2014) terem realizado o seu estudo na primavera, contrariamente, ao presente estudo ter sido concretizado no outono. Já que, mesmo em condições de laboratório controladas, os ixodídeos têm ciclos circadianos muito competentes, o que influencia muitíssimo e, por isso, o momento de captura (consoante a estação) é determinante. Realça-se que, de acordo com Darvishi et al. (2014), o período da pré-oviposição tende a ser mais longo no outono e com valores médios de $34,24 \pm 18,29$ dias. E a explicação para esta diferença de tempo poderá ser atribuída à diapausa, mecanismo adaptativo significativo de dormência em circunstâncias ambientais adversas, que permite a sincronização do ciclo de vida com a estação do ano favorável (Darvishi et al. 2014).

Acrescenta-se que, não foi atingida a eclosão das larvas *D. marginatus*, que se esperaria ter ocorrido, após 10 a 24 dias do período de ovopostura em condições de laboratório (Darvishi et al. 2014). E foi detetada, após 34 dias do início da ovopostura da primeira fêmea *D. marginatus* e 56 dias do início da ovopostura da segunda fêmea *D. marginatus*, a perda de brilho natural dos ovos, apresentando-se dessecados. Tal pode ter ocorrido devido a fatores incontroláveis inerentes a questões fisiológicas, por se forçar um ciclo numa altura inadequada à espécie, por se tratar de condições laboratoriais que possuem limitações na igualização da ovopostura em ambiente natural, pelo manuseamento excessivo dos frascos para a sua observação e/ou pelas variações de temperatura e/ou humidade relativa, nomeadamente nos momentos de observação. Por exemplo, no trabalho de Darvishi et al. (2014), os autores retiraram as fêmeas mortas no período de ovopostura, e os ovos foram mantidos no dessecador dentro da estufa a uma temperatura de 26 °C e humidade relativa de 75%. Além disso, nenhuma das outras 3 fêmea iniciou a ovopostura, o que pode ter ocorrido pelas razões citadas acima, ou inclusive por não ter sido fornecido qualquer

estímulo proveniente de um hospedeiro e apenas foi introduzido gelo seco.

Este impasse, limitou o início dos ensaios *in vitro* que estaríamos a planear realizar em meados de dezembro após a eclosão de um número considerável de larvas.

As etapas de vida livre (ecdise, pré-oviposição, oviposição e incubação de ovos), de *H. marginatum*, em condições de laboratório, são rápidas e com poucas perdas a uma temperatura controlada de 28 °C (Elhachimi et al. 2021). Porém, são necessários mais estudos para elucidar se outras temperaturas poderão ser ainda melhores (Elhachimi et al. 2021). Tal como, mencionado acima, no presente trabalho, as ninfas, *H. marginatum* foram acondicionadas a uma temperatura de 25 °C em 21 horas do dia e 28°C nas restantes 3 horas do dia e com uma humidade relativa que variou entre 69% a 85%.

O período de muda das ninfas ingurgitadas *H. marginatum* ocorreu entre 25 até cerca de 45 dias após terem sido acondicionadas na estufa e quase todas as ninfas fizeram a muda para adultos. Já, Elhachimi (et al. 2021), com humidade relativa fixa de 84%, obtiveram as mudas num período mais curto de tempo, entre 15 a 24 dias, quando acondicionadas a 28 °C, contudo, quando acondicionadas a 18 °C obtiveram entre 55 a 85 dias.

De acordo com o observado verificou-se que cerca de 94,12% das ninfas *H. marginatum* realizaram a muda, semelhante ao trabalho de Elhachimi et al. (2021), em que a percentagem de ninfas que mudaram para adultos foi de 90% a 18 °C e 95% a 28 °C.

Ainda que os ixodídeos sejam eurixenos, pretendeu-se realizar os ensaios com ixodídeos possíveis parasitas do coelho-bravo, e por isso, a maioria das capturas foram realizadas em zonas perto das suas tocas. *D. marginatus* é um ixodídeo de três hospedeiros que quando em estádios imaturos parasita mamíferos mais pequenos, como, por exemplo, pequenos roedores e/ou herbívoros domésticos e selvagens, segundo os autores Kolonin (2009), citado por Darvishi et al. (2014), Já, Pereira (et al. 2018), recolheram 7 ninfas e 7 adultos *R. sanguineus s.l.*, 1 ninfa *H. marginatum* e 1 larva *Hyalomma* spp. em 49 coelhos-bravos, no distrito de Beja. Todavia, *H. marginatum* é um ixodídeo de dois hospedeiros, sendo que os adultos se alimentam em grandes mamíferos, enquanto que as larvas e as ninfas se alimentam em pequenos mamíferos e aves terrestres (Elhachimi et al. 2021) Por isso, idealmente deveríamos ter realizado os ensaios com o estágio de larva ou ninfa. Pois, possivelmente, devido ao hipostoma de *H. marginatum* adulto ser grande e inapto para a pele fina do coelho, este é incapaz de realizar a refeição sanguínea em coelhos (Elhachimi et al. 2021).

Desta forma, verificou-se que nos ensaios onde se utilizou *D. marginatus* e *H. marginatum* na fase de adulto, dever-se-ia ter utilizado, preferencialmente, estádios imaturos, pelas razões mencionadas anteriormente.

No mesmo sentido, em relação ao uso de ninfas e adultos *R. sanguineus* no presente estudo, constatamos que Pereira et al. (2018) recolheram tanto ninfas como adultos *R.*

sanguineus a parasitar coelhos-selvagens, conforme é preferido.

5.2. Ensaio com o OE de *E. globulus* diluído a 2,5% e a 5%

Em relação ao ensaio com o OE de *E. globulus* a 2,5% sobre os 10 *H. marginatum*, verificou-se que, no final do ensaio, encontrava-se 1 *H. marginatum* no controlo negativo e 3 *H. marginatum* no lado do OE, em posição semelhante à de alimentação por cima da membrana de refeição. Pode-se atribuir que a escolha da membrana de refeição foi ao acaso ou significar que *H. marginatum* tiveram maior facilidade ou preferência em dirigir-se para a membrana de refeição que não continha o anel embebido no OE. Por outro lado, foi observado que *H. marginatum* atravessaram ambos os anéis de papel de filtro, o que demonstra que o OE de *E. globulus* a 2,5% não foi totalmente eficaz em repelir *H. marginatum*. Realça-se que o número de ixodídeos contabilizados a mais de 5 cm de ambos os papéis de filtro, encontravam-se sobretudo agrupados nos cantos da caixa. Logo, existe a dúvida se a preferência em repousar nos cantos seria independente do lado da caixa ou se a presença do OE poderia influenciar na escolha do canto. Para clarificar esta preferência dever-se-ia repetir os ensaios, contudo tal não foi possível devido à falta de exemplares.

Analisando a ação do OE *E. globulus* a 2,5% sobre *D. marginatus* e *R. sanguineus*, verificámos que diferentemente com o ocorrido com *H. marginatum*, os exemplares de *D. marginatus* e *R. sanguineus* aproximaram-se com menor frequência às membranas de refeição, pelo que dificultou a interpretação. E, de uma forma geral, estiveram maioritariamente do lado do controlo negativo. Paralelamente, o número médio de ixodídeos a uma distância menor que 0,5 cm, foi 1 para o controlo negativo e 0 para o OE, o que pode ter ocorrido por acaso ou por algum grau de repelência do OE *E. globulus* a 2,5% sobre *D. marginatus* e *R. sanguineus*.

Em relação ao ensaio com o OE de *E. globulus* a 5% em 8 *H. marginatum* e 7 *R. sanguineus*, verificou-se que, ainda que poucas vezes, os ixodídeos movimentarem-se em direção a ambos os papéis de filtro e desviaram-se deste ou alteraram a sua direção para o lado oposto. Esta resposta direcionada poderá ter sido devido ao papel de filtro ser uma superfície diferente ou o controlo negativo não estar a exercer a sua função de forma devida. Por isso, realizámos o ensaio nº6, como discutido mais à frente.

Analisando o Gráfico 6, verifica-se que *H. marginatum* e *R. sanguineus* encontraram-se sobretudo a uma distância maior que 5 cm do lado do OE, isto por si só, pode não indicar que não estavam a ser afastados pelo OE de *E. globulus* (5%), já que, poderiam ter escolhido o canto do lado do OE ao acaso e/ou também, de algum modo, estarem a ser afastados. Parece ser mais significativo notar que a média de ixodídeos que se encontravam a menos de 0,5 cm do papel de filtro, foi superior do lado do controlo negativo e, pressupõem-se que existiu uma preferência, embora ligeira, de aproximarem-se do isco do lado do controlo

negativo. Porém, por terem atravessado ambos os papéis de filtro, contata-se que não existiu uma ação repelente eficaz.

Possivelmente, com um maior número de ensaios alcançar-se-ia um resultado mais conclusivo, inclusive seria útil testar diluições menores, já que, Kulma (et al. 2017) utilizaram o OE de *E. globulus* a 10% nos seus bioensaios e conseguiram repelir 39,2% das fêmeas *I. ricinus*. Do mesmo modo, Arafa et al. (2020) testaram o OE de *E. globulus* (99% de pureza) a 10% em larvas *R. annulatus* e obtiveram 62,5% de repelência. E Madreseh-Ghahfarokhi et al. (2019) testaram o OE de *E. globulus* a 100%, obtendo uma atividade repelente significativa de cerca de 76% em *Rhipicephalus bursa*, pelo que consideram que o pior desempenho da ação repelente se deve às diferenças de resistência entre as espécies de ixodídeos.

5.3. Ensaios com o OE de *T. vulgaris* diluído a 2,5% e 5%

Em relação ao ensaio com o OE de *T. vulgaris* a 2,5% em 16 *H. marginatum*, destaca-se que, embora tenha ocorrido aproximação a ambas as membranas de refeição, corroborou-se que existiu maior frequência de aproximação ao controlo negativo, o que pode estar relacionado com a evasiva ao OE. Considerando que, os exemplares de *H. marginatum* se encontraram maioritariamente no lado do controlo negativo, poderá ter sido devido ao acaso ou do afastamento ao OE. Contudo, como se pode verificar pelo Gráfico 4, a média de ixodídeos à distância menor que 0,5 cm ao limite exterior do papel embebido no OE, foi de 1 ixodídeo a menos; e concomitantemente, foi registado o atravessamento pelo mesmo. Logo, o OE de *T. vulgaris* a 2,5% não foi, de modo total, capaz de repelir a aproximação de *H. marginatum*. Todavia, Štefanidesová et al. (2017) em ensaios laboratoriais, atingiram 68,2% de repelência com o OE de *T. vulgaris* a 3%, em adultos *D. reticulatus*.

Em relação ao ensaio com o OE de *T. vulgaris* a 5% sobre 11 *H. marginatum* e 1 *D. marginatus* foi verificado que, ainda que poucas vezes, tal como no ensaio com o OE de *E. globulus* a 5%, alguns ixodídeos movimentaram-se em direção aos anéis de ambos os papéis de filtro e desviaram-se. Todavia, foi observado que os *H. marginatum* e *D. marginatus* tiveram maior preferência na interação com o pelo e no atravessamento do papel de filtro do controlo negativo. Esta preferência poderá estar relacionada com uma possível atividade repelente do OE ou ser atribuída ao acaso. Outro aspeto a mencionar, foi o ocorrido ao minuto 43, quando um ixodídeo estava em cima da membrana de refeição e demonstrou várias tentativas em atravessar o papel de filtro contendo o OE. Podemos assim, deduzir que existiu algum impedimento, dificuldade e/ou incitamento a afastar-se após a aproximação à área tratada com o OE, tal como sucede com um composto repelente (Bowman 2014).

Os resultados apresentados no Gráfico 7 demonstram que, a média de *H. marginatum* e *D. marginatus* que se encontravam a uma distância entre 2,5 cm a 5 cm e a uma distância superior a 5 cm, foi superior no lado do controlo negativo. E no total, os *H. marginatum* e *D.*

marginatus encontraram-se maioritariamente no controlo negativo, o que pode estar relacionado com o afastamento ao OE, já que os *H. marginatum* e *D. marginatus* não tiveram tanta tendência em se agrupar nos cantos, ou ter sido atribuído ao acaso. No entanto, a média de *H. marginatum* e *D. marginatus* a uma distância inferior a 0,5 cm, em ambos os lados, foi 0. Logo, deveriam ser repetidos mais ensaios a fim de obter uma amostra maior, pois temos que ter em consideração que, a contagem de ixodídeos não foi ininterrupta ao longo do tempo.

Comparando os ensaios com o OE de *T. vulgaris* a 2,5% e 5% pelos Gráficos 4 e 7, respetivamente, vemos que em ambos os ensaios, os ixodídeos demonstraram ter preferência em estar maioritariamente a mais de 5 cm e no lado do controlo negativo. Possivelmente, poderá ser um indício de algum grau de repelência do OE de *T. vulgaris*. Uma vez que, nos ensaios de campo de Soutar et al. (2019) com o OE de *T. vulgaris* a 5%, alcançaram 70,4% de taxa de queda, valor próximo e ligeiramente superior ao atingido com o DEET a 20%, em que a taxa de queda foi de 64,7%. Por sua vez, Goode et al. (2018), utilizaram 10 ninfas *I. ricinus* para cada um dos 12 OE testados e verificaram que o OE de *T. vulgaris* a 5%, foi um dos OE que atingiu maior repelência. O DEET, o OE de *T. vulgaris* (5%) e o OE de *Curcuma longa* (5%), foram as únicas substâncias que continuaram a impedir que os ixodídeos atingissem a ponta do papel de filtro; Goode et al. (2018) verificaram que o OE de *C. longa* foi o tratamento com melhor desempenho e com uma concentração mínima eficaz de 2,5%.

Para alcançar um resultado elucidativo seria necessário realizar um maior número de ensaios. Igualmente, seria útil verificar a repelência com concentrações maiores, como, por exemplo, a 10% e na formulação de microcápsulas, pois, com base na revisão de Benelli e Pavela (2018), a aplicação de OE em concentrações superiores a 10%, geralmente atinge 100% de repelência em carraças. E o trabalho de Chung et al. (2013) demonstrou que o OE de *T. vulgaris* em microcápsulas manifestou uma elevada e eficaz atividade repelente, superior a 90%, nas larvas de *P. interpunctella*.

5.4. Controlo negativo e controlo positivo

Neste ensaio foi possível observar que *D. marginatus* e *H. marginatum* atravessaram ambos os papéis de filtro e, inclusive, um ixodídeo repousou, durante alguns minutos, em cima do papel de filtro contendo o óleo de coco. Do mesmo modo, *D. marginatus* e *H. marginatum* estiveram maioritariamente no lado do óleo de coco. Além disso, é de referir que no ensaio nº3 com o OE de *T. vulgaris* a 2,5%, um exemplar de *H. marginatum* ficou imobilizado a uma distância de 0,5 cm do papel de filtro do controlo negativo, durante cerca de 61 minutos. Estas observações, podem indicar que o óleo de coco inodoro não interfere na aproximação dos ixodídeos nem apresenta um efeito acaricida sobre estes. Contudo nalguns ensaios observou-se o afastamento ao controlo negativo, dado o mencionado acima, ainda poderemos especular se poderá existir algum fator atrativo ou se estarem do lado do

óleo de coco é atribuída ao acaso. Para tal, mais ensaios deveriam ser realizados com o óleo de coco, a fim de aumentar o tamanho da amostra e possibilitar um cálculo estatístico inferencial.

Teria sido desejável realizar um ensaio com uma substância repelente conhecida para o controlo positivo, contudo, tal não foi exequível tendo em conta a falta de ixodídeos no tempo determinado para a realização dos ensaios. Como, por exemplo, os autores Goode et al. (2018) utilizaram DEET a 20% e o PMD a 5%.

5.5. Considerações do estudo piloto

De um modo geral, neste estudo, procurámos recriar o ambiente propício para que os ixodídeos procurassem a fonte de alimento e manifestassem o seu comportamento de parasitismo, embora as condições laboratoriais não permitam replicar uma representação do que seria esperado na natureza. Para tal, colocou-se à disposição alguns estímulos específicos necessários, como os estímulos olfativos (pelo do coelho-bravo, a respiração humana e o sangue aquecido). Porém, por questões de falta de meios materiais, faltou recriar os estímulos mecânicos e os estímulos químicos de contacto (Romano et al. 2018) também necessários para a ligação.

Em relação à dieta utilizada no sistema de refeição, utilizámos sangue de coelho-bravo com heparina, o que é coerente com a maioria dos estudos que utiliza sangue com anticoagulantes e só alguns estudos utilizam dietas artificiais (Romano et al. 2018).

Outra particularidade que se teve em consideração foi que, o 1º ensaio teve a duração de 19 horas e como o objetivo primordial é avaliar a ação repelente dos OE, ajustou-se para uma duração de 3 horas. Isto porque a atividade repelente significa que a carraça irá distanciar-se do OE, executando movimentos direcionados para longe deste (Dethier et al. 1960), havendo impedimento ou dificuldade de aproximação à zona que tem o OE, ou incitamento ao afastamento após a sua aproximação (Bowman 2014). Embora, fosse menos provável que os ixodídeos tivessem tempo suficiente para iniciar a refeição na membrana, esse não foi o critério primordial utilizado para a avaliação da repelência. Adicionalmente, é de relembrar, que o OE tem um tempo de atuação limitado devido a ser volátil (Chattopadhyay et al. 2015) e, portanto, não seria adequado ter um tempo de duração prolongado pois afetaria os resultados.

Apesar de que, eventualmente seja necessária a experimentação em coelhos, o método *in vitro* apresenta grandes vantagens para testar as substâncias e complementar uma situação *in vivo* (Kröber et al. 2013). Com este protótipo de ensaio poder-se-á evitar o uso de hospedeiros vivos, evitando assim a experimentação em coelhos para estudar as substâncias repelentes e, de modo ideal, poder-se-ia produzir membranas com a incorporação de sensores e de um sistema de controlo baseado em microprocessadores e microcontroladores

(Romano et al. 2018). Por exemplo, dispositivos avançados e automatizados nas configurações de fornecimento do sangue, no controlo da temperatura e que permitissem ter a sensibilidade de contabilizar as passagens e as possíveis fixações (Romano et al. 2018). Possibilitar-se-ia assim, uma testagem automatizada (reduzindo a mão-de-obra e erros associados) e uma condição experimental padronizada e contínua no tempo (Romano et al. 2018).

De maneira geral, constatou-se que *H. marginatum* foram os ixodídeos que expressam maior atividade de locomoção e, por serem os mais ativos, demonstraram pouca tendência a repousarem e a agruparem-se. Este dinamismo evidenciado permitiu obter mais oportunidades de observação da sua interação e o fato de estarem, praticamente, em constante movimento permitiu estimar com maior clareza a sua propensão.

Os ixodídeos contabilizados como imobilizados poderiam corresponder a exemplares, que embora tenham sido escolhidos como aptos, devido ao incidente ocorrido terem ficado inválidos, ou a ixodídeos mais sensíveis à temperatura (pelo fato de terem estado no frio). Neste último caso, talvez seja necessário fazer uma transição para um ambiente aquecido ou aumentar a intensidade dos estímulos, visto que pode ter sido insuficiente para os ativar.

Embora não tenha sido um dos objetivos deste estudo piloto, destaca-se que possa ter ocorrido alguma atividade acaricida dos OE de *E. globulus* e *T. vulgaris*, a 2,5% e 5%, e que seja uma das possíveis causas da morte de um macho *D. marginatus* no ensaio nº2, duas ninfas *R. sanguineus* no ensaio nº2, uma fêmea *H. marginatum* no ensaio nº3, uma ninfa *R. sanguineus* no ensaio nº4 e um macho *H. marginatum* no ensaio nº5. Considerando que, Tabaria et al. (2017) demonstraram que o carvacrol e o timol, presentes no OE de *T. vulgaris* têm efeito acaricida nas larvas de *I. ricinus* e realçam que estes monoterpénóides são promissores para fórmulas acaricidas no controlo de *I. ricinus*. Igualmente, o eucaliptol, composto predominante no OE de *E. globulus*, possui atividade acaricida (Barton 2000; Batish et al. 2008; Madreseh-Ghahfarokhi et al. 2019). Verifica-se também, a necessidade de conseguir quantificar melhor a ação dos OE nos ixodídeos, por exemplo, interpretar o que é prioritário, entender a relevância de um ixodídeo se fixar à membrana de refeição ou o registo dos primeiros minutos de locomoção, visto que quanto maior o período de observação, provavelmente será necessário uma maior concentração (Benelli and Pavela, 2018) ou uma formulação aperfeiçoada para atingir valores de repelência apropriados, pois os OE são voláteis e possuem um tempo de atuação muito limitado (Štefanidesová et al. 2017).

Outro aspeto que poderíamos avaliar, na possibilidade de realizar mais ensaios, seria verificar se a mistura dos OE terá uma ação sinérgica. Como, por exemplo, nos bioensaios de Arafa et al. (2020) testaram, em larvas *R. annulatus*, a combinação do OE de *E. globulus* com cristais de timol (99% pureza), o maior componente do OE de *T. vulgaris*, na concentração de 5% e 10% e alcançaram 100% de repelência.

Por outro lado, concorda-se com Benelli e Pavela (2018) que realçam a importância de um trabalho interdisciplinar entre agrónomos, agricultores de PAM, investigadores em química de produtos naturais e entomologistas ou parasitologistas, conseguindo com esse intercâmbio, melhorar os procedimentos que asseguram uma normalização química aceitável e a estabilidade dos OE utilizados, de modo a obter repelentes eficazes contra as carraças.

Por último, tendo em conta o tamanho reduzido da amostra e o facto de não ter sido possível realizar o tratamento dos dados por estatística inferencial, a comparação dos resultados alcançados foi dificultada e não garantiu tirar conclusões assertivas da repelência dos OE *E. globulus* (2,5% e 5%) e *T. vulgaris* (2,5% e 5%) em *H. marginatum*, *D. marginatus* e *R. sanguineus*.

6. Limitações do estudo

Conforme referido acima, o conjunto de dados obtido é consideravelmente pequeno, o que impossibilitou o uso de técnicas estatísticas convenientes para testar a hipótese de repelência dos OE em cada diluição. De modo incluso, a necessidade de um grande número de ixodídeos viáveis para os ensaios não foi colmatada devido à dificuldade em induzir as ovoposturas das fêmeas *D. marginatus* e a eclosão das larvas e ao insucesso de várias capturas realizadas, bem como devido ao período de restrição de acesso ao campo e interrupção dos ensaios decorrente do confinamento obrigatório e das medidas de restrição de circulação tomadas pelo governo português pela pandemia COVID-19.

Adicionalmente, assim como vários autores que utilizaram métodos diferentes para testar a atividade repelente dos OE (Benelli and Pavela, 2018), tornou-se difícil comparar os resultados. Para uma avaliação válida da eficácia de diferentes compostos e de suas formulações na repelência de carraças, é essencial um método padronizado (Kröber et al. 2013). Por isso, embora, possam ter sido observadas algumas tendências gerais a partir dos resultados, no presente estudo não foi possível seguir um modelo padrão com procedimentos metódicos e uniformes, com parâmetros facilmente estimáveis. Também, não existiu a oportunidade de realizar um ensaio com um controlo positivo para obter um termo de comparação, pelo que a repetição de mais ensaios é desejável num futuro próximo.

Desta forma, o presente estudo possui um carácter observacional, pelo que está inerente a subjetividade e a experiência do executante. Sendo um estudo piloto, há também a necessidade de alguns ajustes e modificações para futuros ensaios.

III. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste estudo, através da consulta bibliográfica, conclui-se sobre a importância e eficácia dos OE no controlo de ixodídeos, os quais devem ser impulsionados como uma alternativa a outros tratamentos.

Diversos fatores, anteriormente referidos, dificultaram a obtenção de um número suficiente de ixodídeos viáveis para os bioensaios planeados.

Os resultados obtidos sugerem que as fêmeas *D. marginatus* em criação, necessitam de um maior cuidado com a manipulação dos frascos e controlo de temperatura e humidade relativa adequados. Além disso, parecem demonstrar que, para além de possíveis causas fisiológicas, a indução forçada da ovopostura é influenciada pela altura do ano, visto que estas têm uma sincronização muito competente do ciclo de vida com a estação do ano favorável.

De modo satisfatório, as ecdises de ninfa para adulto, utilizando *H. marginatum* recolhidos no campo, foi alcançada na sua quase totalidade, o que é um resultado interessante que requer alguma perícia para ser alcançado, pois estas não estão adaptadas a este modo de criação.

O OE de *E. globulus* a 2,5% sobre as ninfas e adultos *H. marginatum*, não foi totalmente eficaz na sua repelência, pois foi observado o atravessamento pelo papel de filtro que o continha. Do mesmo modo, a uma distância maior que 5 cm, *H. marginatum* encontraram-se maioritariamente no lado do OE, embora muitas vezes agrupados nos cantos da caixa. Porém, a facilidade ou preferência em movimentarem-se para a membrana de refeição do controlo negativo e o fato de que, a média de *H. marginatum* que se encontravam a uma distância menor que 0,5 cm ter tido um valor superior no controlo negativo em relação ao lado do OE, poderá estar relacionada com algum grau de repelência. Semelhante fato ocorreu no ensaio com os adultos *D. marginatus* e ninfas e adultos *R. sanguineus*, onde este revelou também que não foi completamente eficaz na repelência, porque foi observado o seu atravessamento. Porém, pode ter existido algum grau de repelência pelo fato de que *D. marginatus* e *R. sanguineus* estiveram maioritariamente no lado do controlo negativo e o número médio de ixodídeos a uma distância menor que 0,5 cm foi de 0 para o OE.

O OE de *E. globulus* a 5% induziu ligeiramente uma maior aproximação ao isco do controlo negativo, em ninfas e adultos *H. marginatum* e *R. sanguineus*. Ainda assim, o facto de terem atravessado o papel de filtro em que estava embebido revelou que não produziu, de modo absoluto, o efeito repelente.

O OE de *T. vulgaris* a 2,5% pareceu demonstrar alguma repelência em adultos *H. marginatum*, porque, embora tenha existido aproximação à membrana de refeição do OE, foi mais frequente à membrana do controlo negativo e *H. marginatum* encontraram-se sobretudo nesse mesmo lado. Contudo, a repelência não foi total pois foi registado o atravessamento pelo papel de filtro impregnado com o OE e obteve-se uma média de 1 ixodídeo a 0,5 cm ao

limite exterior deste. Identicamente, na concentração de 5% pareceu demonstrar ação repelente em adultos *H. marginatum* e *D. marginatus* porque foi observada maior frequência na interação com o pelo, no atravessamento e na permanência no lado do controlo negativo e observou-se ainda, um ixodídeo “cercado” em cima da membrana do OE. Todavia, não foi absoluta, porque foi observado o atravessamento no papel de filtro embebido no OE

Os resultados parecem sugerir que nenhum dos OE, nas concentrações aplicadas, repeliu totalmente, pois em todos os ensaios foi observada a passagem pelo papel de filtro contendo o OE e não se evitaram todas as aproximações. Apenas algumas tendências gerais foram observadas e parecem indicar que possa existir alguma atividade acaricida e a possibilidade de algum nível de repelência para os OE estudados, sendo ligeiramente mais notório para o OE de *T. vulgaris*.

Reforça-se que este trabalho necessita de ser continuado e seria benéfico serem estudadas outras diluições, inclusive com outros OE, até encontrar a concentração mínima eficaz.

Procura-se também, alertar para a importância de um planeamento de ensaios, pois requer um número considerável de ixodídeos e poderá ser útil determinar o tempo necessário entre a captura dos ixodídeos até à produção de larvas, assim como, verificar se podem ser mantidos num estádio dormente por algum tempo e serem reativados quando necessário.

É indispensável desenhar bem o estudo e que este complemente o método *in vivo* no seu exponencial e, paralelamente que seja abrangente. Isto é, apesar de se evitar a experimentação em coelhos-bravos, a fim de priorizar o método *in vitro*, possivelmente será necessário que a última não se baseie apenas em ensaios *in vitro*; mas que consista também num método em campo mais extenso e detalhado com o propósito de obter uma padronização e compreensão do modo de ação no sentido de encontrar uma formulação e estratégia de aplicação deste produto fitoterápico.

Para finalizar, apesar de não se ter chegado a uma resposta consistente sobre a repelência investigada e não se ter obtido os resultados com o efeito pretendido, tal como, argumentado pela editora Emma Granqvist de ciências vegetais da Elsevier, “uma experiência não deveria ter que mostrar resultados positivos para estar publicada na literatura” e “será mais competente e não tendencioso se todos os resultados fossem disponibilizados à comunidade científica”. Já os editores, Dr. Thomas W. Okita (*Washington State University*) e o Dr. José A. Olivares (*Los Alamos National Laboratory*), destacam que poderá “ajudar a evitar a repetição das mesmas experimentações, bem como a encorajar a criar novas hipóteses”.

Espera-se sensibilizar a continuação, amplificação e aperfeiçoamento deste estudo para obter um repelente à base de OE com um valor considerável de repelência e passível de ser usado no coelho-bravo e, assim, contribuir para o necessário controlo de vetores e das doenças transmitidas por estes nesta espécie chave.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Arafa WM, Aboelhadid SM, Moawad A, Shokeir KM, Ahmed O. 2020. Toxicity, repellency and anti-cholinesterase activities of thymol-eucalyptus combinations against phenotypically resistant *Rhipicephalus annulatus* ticks. *Exp Appl Acarol* [Internet]. [accessed 2021 Mar 9]; 81(2020):265-277. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00506-1>.
- Barton A. 2000. The oil mallee project. *J Ind Ecol Sci* [Internet]. [accessed 2020 Feb 2]; 3(2-3): 161-176. Doi: <https://doi.org/10.1162/108819899569467>.
- Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *For Ecol Management J* [Internet]. [updated 2008 Sep 24; accessed 2021 Jan 29]; 256(12): 2166-2174. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>.
- Batish DR, Singh HP, Setia N, Kaur S, Kohli RK. 2006. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Z Naturforsch C J Biosci* [Internet]. [accessed 2021 Feb 2]; 61c(7-8): 465-471. Doi: <https://doi.org/10.1515/znc-2006-7-801>.
- Benelli G, Pavela R. 2018. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—a systematic review. *Acta Trop*. 179(December 2017):47–54. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.025>.
- Bissinger BW, Roe RM. 2010. Tick repellents: past, present, and future. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. [accessed 2021 Feb 15]; 96(2):63-79. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.09.010>.
- Bowman DD. 2014. *Georgis' parasitology for veterinarians* [Internet]. 10 th ed. Ithaca (NY): Elsevier; [accessed 2020 May 8]. <https://www.elsevier.com/books/georgis-parasitology-for-veterinarians/bowman/978-1-4557-4006-2>.
- Casas A, Valiente-Banuet A, Viveros JL, Caballero J, Cortés L, Dávila P, Lira R, Rodríguez I. 2001. Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Econ Bot* [Internet]. [updated 2001 Jan; accessed 2021 Jan 3]; 55(1):129–166. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02864551>.
- Chattopadhyay P, Dhiman S, Borah S, Rabha B, Chaurasia AK, Veer V. 2015. Essential oil based polymeric patch development and evaluating its repellent activity against mosquitoes. *Acta Tropica* [Internet]. [accessed 2021 Apr 13]; 147(2015): 45-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.027>.
- Chung SK, Seo JY, Lim JH, Park HH, Yea MJ, Park HJ. 2013. Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system. *J Food Sci* [Internet]. [accessed 2021 Apr 12]; 78(5): 709-714. Doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12111>.
- Curtis CF, editor. 2018. *Appropriate Technology in Vector Control* [Internet]. CRC Press; [updated 2018 Jan 10; accessed 2020 Jan 5]. https://books.google.pt/books?id=XJxGDwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Dethier VG, Browne BL, Smith CN. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J Econ Entomology* [Internet]. [accessed 2020 Feb 21]; 53(1): 134–136. Doi: <https://doi.org/10.1093/jee/53.1.134>.

- Darvishi MM, Youssefi MR, Changizi E, Shayan P, Lima RR, Rahimi MT. Biology of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Asian Pac J Trop Dis* [Internet]. [accessed 2022 Mar 20]; 4(Suppl 1): S284-S289. Doi: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60457-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60457-6).
- Ditzen M, Pellegrino M, Vosshall LB. 2008. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Sci* [Internet]. [accessed 2020 Dec 20]; 319(5871): 1838-1842. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1153121>.
- Elhachimi L, Valcárcel F, Olmeda AS, Elasatey S, Khattat SE, Daminet S, Sahibi H, Duchateau L. Rearing of *Hyalomma marginatum* (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions in Morocco. *Exp Appl Acarol* [Internet]. [accessed 2022 Mar 25]; 84(2021): 785–794. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00641-3>.
- Ellse L, Wall R. 2014. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Med Vet Entomol* [Internet]. [accessed 2020 Apr 27]; 28 (3):233-243. Doi: <https://doi.org/10.1111/mve.12033>.
- [EMA] European Medicines Agency 2021. Guideline for the testing and evaluation of the efficacy of antiparasitic substances for the treatment and prevention of tick and flea infestation in dogs and cats. Amsterdam: EMA
- Estrada-Peña A. 2000. Ixodoidea (Acarina) en la península ibérica: reconvención y claves de Agustín Estrada-Peña. 1th ed. Montmeló-Barcelona (ES): Edigraf.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J.-L, Walker AR. 2004. Ticks of domestic animals in the mediterranean region a guide to identification of species. Zaragoza (ES): University of Zaragoza.
- EPAM [Internet]. 2014. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal; [updated 2014 Dec; accessed 2021 Oct 24]. <https://epam.pt/guia/guia-extractos-pam/>.
- Farooq M, Xue R, Peper ST, Whitney A, Qualls WA. 2022. Chapter 4 - Evaluating techniques and efficacy of arthropod repellents against ticks. In: *Advances in arthropod repellents* [Internet]. 1th ed. St. Augustine (FL): Academic Press; [accessed 2022 May 24] <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85411-5.00003-0>
- [FDA] U.S. Food & Drug Administration 2022. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Silver Spring (MD): FDA.
- Ferreira M, Moore S. 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar J* [Internet]. [accessed 2019 Dec 6]; 10(S11): 1-15. Doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S11>.
- Figueiredo AC. 2017a. Biological properties of essential oils and volatiles: Sources of variability. *Nat Volatiles Essent Oils* [Internet]. [accessed 2020 May 16]; 4(4):1–13. <http://nveo.org/wp-content/uploads/2019/03/NVEO-2017-Volume-4-Issue-4-Pages-28-48.pdf>.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2007. Plantas aromáticas e medicinais: Factores que afectam a produção: potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais curso teórico-prático [Internet]. 3th ed. Lisboa (PT): Centro de Biotecnologia Vegetal; [accessed 2020 May 13]. <http://cbv.fc.ul.pt/>.

- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour Fragr* [Internet]. [updated 2008 May 16; accessed 2020 May 22]; 23(4):213–226. Doi: 10.1002/ffj.1875.
- Figueiredo AC, Barroso JG. 2015. *Medicinal and Aromatic Plants of the World* [Internet]. [Dordrecht (NL)]: Springer; [accessed 2020 May 19]. Doi: 10.1007/978-94-017-9810-5_5.
- Figueiredo ACDS, Pedro LMG, Barroso JMG. 2014. Plantas aromáticas e medicinais – óleos essenciais e voláteis. *APH*. 114(124):29-33.
- Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso JG. 2017b. Voláteis e óleos essenciais: parte I. *Agrotec*. 24 (3):14-17.
- Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso JG. 2017c. Voláteis e óleos essenciais: parte II. *Agrotec*. 25 (3):14-17.
- Foil LD, Coleman P, Eisler M, Fragoso-Sanchez H, Garcia-Vazquez Z, Guerrero FD, Jonsson NN, Langstaff IG, Li AY, Machila N, et al. 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet Parasitol* [Internet]. [accessed 2020 June 6]; 125(1–2):163-181. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.012>.
- Gall-Reculé GL, Lavazza A, Marchandeu S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin J-L, Lemaitre E, Decors A, Boucher S, Normand BL, Capucci L. 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res* [Internet]. [accessed 2021 Jun 7]; 44(81): 1-13. Doi: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>.
- Gershenzon J, Dudareva N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* [Internet]. [updated 2007 July; accessed 2020 Dec 29]; 3(7): 408-414. Doi: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>.
- Gleeson M, Petritz OA. 2020. Emerging infectious diseases of rabbits. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* [Internet]. [accessed 2021 Apr 30]; 23(2020): 249–261. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2020.01.008>.
- Goode P, Ellse L, Wall R. 2018. Preventing tick attachment to dogs using essential oils. *Ticks Tick Borne Dis* [Internet]. [accessed 2019 Oct 17]; 9(4):921-926. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.029>.
- Grandjean P. 2016. Paracelsus revisited: the dose concept in a complex world. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [Internet]. [accessed 2021 Dec 4]; 119(2): 126-132. Doi: <https://doi.org/10.1111/bcpt.12622>.
- Hallem EA, Dahanukar A, Carlson JR. 2006. Insect odor and taste receptors. *Annu Rev Entomol* [Internet]. [updated 2006 Jan 7; accessed 2020 Dec 18]; 51: 113-135. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.051705.113646>.
- Hall RN, Peacock DE, Kovaliski J, Mahar JE, Mourant R, Piper M, Strive T. 2017. Detection of RHDV2 in european brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. *Vet Rec* [Internet]. [accessed 2021 May 13]; 180(5): 121-122. Doi: <https://doi.org/10.1136/vr.104034>.
- ICNF [Internet]. 2017 May 1. [accessed 2021 July 19]. <http://areasprotegidas.icnf.pt/lince/index.php/lince-iberico/69ehavi-bravo>.

- Kovaliski J. 1998. Monitoring the spread of rabbit hemorrhagic disease virus as a new biological agent for control of wild european rabbits in Australia. *J Wildl Dis* [Internet]. [accessed 2021 May 23]; 34(3): 421–428. Doi: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.3.421>.
- Kröber T, Bourquin M, Guerin PM. 2013. A standardised *in vivo* and *in vitro* test method for evaluating tick repellents. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. [accessed 2022 Feb 13]; 107(2): 160-168. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.008>.
- Lee MY. 2018. Essential oils as repellents against arthropods. *Biomed Res Int* [Internet]. [accessed 2021 Jan 26]; 2018 (6860271): 1-9. Doi: <https://doi.org/10.1155/2018/6860271>.
- Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandean S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin J-L, Lemaitre E, Decors A, Boucher S, Le Normand B, Capucci L. 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res* [Internet]. [accessed 2021 May 19]; 44(81): 1-13. Doi: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>.
- Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guérin J-L, Marchandean S. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec* [Internet]. [accessed 2021 May 10]; 168(5): 137-138. Doi: [10.1136/vr.d697](https://doi.org/10.1136/vr.d697).
- Madreseh-Ghahfarokhi S, Dehghani-Samani A, Pirali Y, Dehghani-Samani A. 2019. *Zingiber officinalis* and *Eucalyptus globulus*, potent lethal/repellent agents against *Rhipicephalus bursa*, probable carrier for zoonosis. *J Arthropod Borne Dis* [Internet]. [updated 2019 June 24; accessed 2021 Jan 28]; 13(2): 214-223. Doi: <https://doi.org/10.18502/jad.v13i2.1248>.
- Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Salda LD, Sarli G, Lucidi P. 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the european brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* [Internet]. [accessed 2021 Jun 20]; 10(2): 371-392. Doi: [10.20506/rst.10.2.560](https://doi.org/10.20506/rst.10.2.560).
- Moore SJ, Darling ST, Sihuincha M, Padilla N, Devine GJ. 2007. A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru. *Malar J* [Internet]. [updated 2007 Aug 1; accessed 2021 Jan 24]; 6(101): 1-6. Doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-101>.
- Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. 2017. Ticks of the Southern Cone of America: diagnosis, distribution and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance [Internet]. 1th ed. [place unknown]: Academic Press; [accessed 2021 Oct 3]. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811075-1.00001-7>.
- Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel H-J. 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virology* [Internet]. [accessed 2021 May 14]; 64(7): 3331-3336. Doi: [10.1128/JVI.64.7.3331-3336.1990](https://doi.org/10.1128/JVI.64.7.3331-3336.1990).
- [OIE] The World Organisation for Animal Health. 2018. OIE terrestrial manual: rabbit haemorrhagic disease. [place unknown]:OIE.
- [OIE] The World Organisation for Animal Health. 2019. OIE technical disease cards. [place unknown]:OIE.

- Pereira A, Parreira R, Cotão AJ, Nunes M, Vieira ML, Azevedo F, Campino L, Maia C. 2018. Tick-borne bacteria and protozoa detected in ticks collected from domestic animals and wildlife in central and southern Portugal. *Ticks Tick Borne Dis* [Internet]. [accessed 2022 Mar 30]; 9(2018): 225–234. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.008>.
- Pichersky E, Gershenzon J. 2002. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol.* 5(3):237–243. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00251-0).
- Pirali-Kheirabadi K, Razzaghi-Abyaneh M, Halajian A. 2009. Acaricidal effect of *Pelargonium roseum* and *Eucalyptus globulus* essential oils against adult stage of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in vitro. *Vet Parasitol* [Internet]. [updated 2009 June 10; accessed 2020 Mar 1]; 162(3-4): 346-349. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.015>.
- Regnault-Roger C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integr Pest Management Rev* [Internet]. [accessed 2021 Feb 2]; 2(1997): 25-34. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1018472227889>.
- Romano D, Stefanini C, Canale A, PII GB. 2018. Artificial blood feeders for mosquito and ticks – where from, where to? *Acta Tropica* [Internet]. [13 Feb 2022]; 183(2018): 43-56. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.009>.
- Ruppert-Aulabaugh L. 2014. Essential oils for aromatherapy: How the essential oil industry can better serve the aromatherapy market. *Perfumer Flavorist* [Internet]. [updated 2014 Aug 21; accessed 2020 Jun 26]; 39 (2014): 36-38. URL: <https://www.perfumerflavorist.com/fragrance/trends/Essential-Oils-for-Aromatherapy-267950311.html?fbclid=IwAR2eK4fIloqaidFbVY5X4qTtn2mn42oRF9NcKTcZfS0Y0qLZJUBYI3pY0v78>.
- Sakulkua U, Nuchuchuaa O, Uawongyartb N, Puttipipatkachornc S, Soottitantawatd A, Ruktanonchai U. 2008. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *Int J Pharm* [Internet]. [updated 2008 Dec 31; accessed 2021 Jan 20]; 372(1-2): 105-111. Doi: [10.1016/j.ijpharm.2008.12.029](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.029).
- Sonenshine DE, Roe RM, editors. 2014. *Biology of ticks*. 2th ed. New York (NY): Oxford University Press.
- Soutar O, Cohen F, Wall R. 2019. Essential oils as tick repellents on clothing. *Experimental and Applied Acarology*. *Exp Appl Acarol* [Internet]. [accessed 2021 Mar 9]; 79(2019): 209–219. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00422-z>.
- Spickler AR. 2020. Rabbit hemorrhagic disease and other lagoviruses [Internet]. [Ames (IA)]; [updated 2020 June]. https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabbit_hemorrhagic_disease.pdf.
- Štefanidesová K, Škultéty L, Sparagano OAE, Špitalská E. 2017. The repellent efficacy of eleven essential oils against adult *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks Tick-borne Dis* [Internet]. [accessed 2021 Mar 16]; 8(5): 708-786. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.06.003>.

- Tabaria MA, Youssef MR, Maggic F, Benellid G. 2017. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* [Internet]. [accessed 2021 Mar 8]; 245(2017): 86-91. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.012>.
- Tawatsin A, Wratten SD, Scott RD, Thavara U, Techadamrongsin Y. 2001. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *J Vector Ecol* [Internet]. [updated 2001 Jun; accessed 2021 Jan 11]; 26(1): 76-82. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11469188/>.
- Teixeira D, Carrilho M, Silva M, Nunes M, Vieira ML, Novo MT, Santos-Reis M, Rosalino LM. 2019. Mediterranean *Eucalyptus* plantations affect small mammal ectoparasites abundance but not individual body condition. *Ecol Res* [Internet]. [accessed 2021 Feb 5]; 34(3): 415-427. Doi: <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12003>.
- Trumble JT. 2002. Caveat emptor: safety considerations for natural products used in arthropod control. *Am Entomologist* [Internet]. [updated 2002 Jan 1; accessed 2021 Jan 15]; 48(1): 7-13. Doi: <https://doi.org/10.1093/ae/48.1.7>.
- Turlings TCJ, Tumlinson JH, Lewis WJ. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Sci* [Internet]. [updated 1990 Nov 30; accessed 2021 Jan 1]; 250(4985): 1251–1253. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.250.4985.1251>.
- Vaz Y, Duarte M, Cunha MV. 2018. Recuperação do coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) e da lebre (*Lepus granatensis*): manual de boas práticas sanitárias [Internet]. Grupo de Trabalho +Coelho. Lisboa: Fundo Florestal Permanente; [accessed 2021 Nov 15]. https://www.inia.pt/images/mais-coelho/manual_boas_praticas_coelho-bravo-lebre.pdf.
- Wilkinson PR. 1953. Observations on the sensory Physiology and Behaviour of larvae of the cattle tick, *Boophilus Microplus* (Can.) (Ixodidae). *Australian J Zoology* [Internet]. [accessed 2021 Nov 24]; 1(3): 345-356. Doi: <https://doi.org/10.1071/ZO9530345>
- Xu ZJ, Chen WX. 1989. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. *Vet Res Commun* [Internet]. [accessed 2021 Aug 4]; 13(1989): 205-212. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00142046>.
- Zygadlo JA, Grosso NR. 1995. Comparative study of the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina. *Flavour Fragr J* [Internet]. [accessed 2021 Feb 6]; 10(2): 113-118. Doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100210>.

V. ANEXOS

Anexo 1 – Extrações dos OE

Tabela 24. Extrações do OE, definidas internacionalmente, por destilação ou processo mecânico.

Definição da extração do OE
i. hidrodestilação ou destilação em água da espécie botânica ou das suas diferentes partes (fresca, seca, inteira, seccionada ou em pó) devidamente identificadas (Batish et al. 2008; Figueiredo et al. 2017b).
ii. destilação em água com arrastamento de vapor da espécie botânica ou das suas diferentes partes (fresca, seca, inteira, seccionada ou em pó) devidamente identificadas (EPAM 2014; Figueiredo et al. 2017b).
iii. destilação com arrastamento de vapor da espécie botânica ou das suas diferentes partes (fresca, seca, inteira, seccionada ou em pó) devidamente identificadas (Figueiredo et al. 2017b).
iv. destilação a seco, com base no Council of Europe (2010) citado por Figueiredo e Barroso (2015, p. 96), da espécie botânica ou das suas diferentes partes (fresca, seca, inteira, seccionada ou em pó) devidamente identificadas (Figueiredo et al. 2007).
v. expressão, processo mecânico de extração a frio, isto é, prensagem ou picotagem do epicarpo dos frutos frescos do género Citrus (Figueiredo et al. 2014). Após a extração do OE procede-se à separação da fase aquosa que preserva a sua composição, por decantação ou centrifugação, com base no Council of Europe (2010) citado por Figueiredo et al. (2017b, pp. 14-15).

Anexo 2 – Ficha técnica do OE de *E. globulus* Labill utilizado nos ensaios



Ficha Técnica Óleo Essencial *Eucalyptus globulus* L.

Identificação do Produtor / Identification of the Producer

Produtor / Producer	Blossom Essence, Lda
Responsável para contato / Name	Fausta Parracho
Endereço / Address	ParkUrbis - Parque de Ciência e Tecnologia, 6200-865 Covilhã
Telefone / Phone	934 476 787
Email	info@blossomessence.pt

Identificação da planta / Plant identification

Nome científico / Scientific name:	<i>Eucalyptus globulus</i> L.
Nome vulgar / Common name:	Eucalipto / Eucalyptus
Família / Family	Myrtaceae
Parte da planta / Plant part	Folha / Leaf

Identificação do local de cultura ou colheita / Identification of the place of cultivation or harvesting

Local, país / Place, country	Proença a Nova, Portugal
Cultivo, Espontânea / Cultivation, Wild harvest	Espontânea / Wild harvest
Modo de cultivo / Cultivation method	Agricultura Biológica / Organic Farming

Identificação da (s) substância (s) / Substance identification

Amostra / Sample:	Óleo Essencial / Essential Oil <i>Eucalyptus globulus</i> (100 %)
Nome comercial / Commercial name	Óleo Essencial de Eucalipto BIO (100%)
Nº CAS	8000-48-4
Método de extração / Extraction procedure	Destilação por arrastamento de vapor / steam distillation
Estado físico / physical state:	Líquido
Qualidade / Quality	100 % Biológico 100 % puro : Isento de outro óleos essenciais 100 % integral : sem descoloração, sem detenção, sem retificação, etc. 100 % natural : não desnaturado, sem moléculas sintéticas
Cor / Color :	amarelo pálido
Odor / Odor:	Característico, fresco, canforado e cineólico
Ponto de fusão / Fusion point :	-14°C a -12°C
Intervalo de ebulição /Boiling range :	160°C a 200°C
Ponto de Inflação / Inflation Point :	44°C
Densidade relativa / Relative density (20°C):	0.905 a 0.921
Índice de refração / Refractive index (20°C):	1.460 – 1.477
Índice de rotação / Rotation inde (20°C):	0° ; -10°
Solubilidade em água /Solubility in water :	Insolúvel
Solubilidade em etanol / Solubility in etanol :	Muito Solúvel

Principais constituintes / Main constituents

1,8 - Cineol (Eucalyptol)	70.00 – 85.00 %
D-Limoneno	3.00 – 15.00 %
α-pineno	8.00 – 20.00 %
p-cimeno	4.00 – 7.00%

Os produtos de origem natural não fornecem composição idêntica para cada produção. Estes valores são indicativos e não excluem a possibilidade de ligeiras variações. Para composições mais detalhadas por favor solicite-as a quando da aquisição da matéria-prima identificando o lote.

Ficha Técnica Óleo Essencial Eucalyptus globulus L.

Informações regulamentares / Regulatory information

Directivas da EU 67/548/CEE

Xn: Nocivo

N: Perigo para o ambiente

R10: Inflamável

R43: Pode causar reacção de sensibilização para a pele.

R50/53: Muito tóxico para os organismos aquáticos, pode causar efeitos nefastos a longo prazo em ambiente aquático

R65: Nocivo: pode causar sensibilização pulmonar, se ingerido.

Regulamento CLP (CE) 1272/2008



Aviso: Atenção!

H226 Líquido e vapor inflamáveis.



Aviso: Perigo!

H304 Pode ser fatal, se engolido ou inspirado.



Aviso: Atenção!

H317 Pode provocar irritação cutânea.



Aviso: Atenção!

H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos a longo prazo.

Armazenamento e conservação / Storage and conservation

A conservação dos produtos é feita em frascos de vidro escuro, hermeticamente fechados, protegido do ar e luz, a uma temperatura moderada (máx. 15 ° C) e estável.

Para além dos 3 anos de validade, nas condições de conservação acima descritas, pode haver uma redução do teor de hidrocarbonetos aromáticos ou uma ligeira coloração do produto.

Informações adicionais / Additional Information

Os produtos de origem natural não fornecem composição idêntica para cada produção. Estes valores são indicativos e não excluem a possibilidade de ligeiras variações.

Biológico: Produtos agro-alimentares certificados por Ecocert PT-BIO-02

Matérias-primas biológicas certificadas

100% do total dos ingredientes são provenientes da agricultura biológica.



Anexo 3 - Ficha técnica do OE de *T. vulgaris* L. quimiotipo (CT) Timol utilizado nos ensaios



Ficha Técnica Óleo Essencial *Thymus Vulgaris* L. *ct* *Thymol*

Identificação do Produtor / Identification of the Producer

Produtor / Producer	Blossom Essence, Lda
Responsável para contato / Name	Fausta Parracho
Endereço / Address	ParkUrbis - Parque de Ciência e Tecnologia, 6200-865 Covilhã
Telefone / Phone	934 476 787
Email	info@blossomessence.pt

Identificação da planta / Plant identification

Nome científico / Scientific name:	<i>Thymus Vulgaris</i> L. <i>CT</i> <i>Thymol</i>
Nome vulgar / Common name:	Tomilho / Thyme
Família / Family	Lamiaceae
Parte da planta / Plant part	Partes aéreas floridas / Flowering aerial part

Identificação do local de cultura ou colheita / Identification of the place of cultivation or harvesting

Local, país / Place, country	Barrancos, Portugal
Cultivo, Espontânea / Cultivation, Wild harvest	Cultivo / Cultivation
Modo de cultivo / Cultivation method	Agricultura Biológica / Organic Farming

Identificação da (s) substância (s) / Substance identification

Amostra / Sample:	Óleo Essencial / Essential Oil <i>Thymus Vulgaris</i> <i>ct</i> <i>Thymol</i> (100 %)
Nome comercial / Commercial name	Óleo Essencial de Tomilho BIO (100%)
Nº CAS	84929-51-1
Método de extração / Extraction procedure	Destilação por arrastamento de vapor / steam distillation
Estado físico / physical state:	Líquido
Qualidade / Quality	100% Biológico 100 % puro : Isento de outro óleos essenciais 100 % integral : sem descoloração, sem detenção, sem retificação, etc. 100 % natural : não desnaturado, sem moléculas sintéticas
Cor / Color :	Incolor a amarelo
Odor / Odor:	forte, quente, característico
Ponto de fusão / Fusion point :	Não disponível
Intervalo de ebulição /Boiling range :	Não disponível
Ponto de Inflação / Inflation Point :	48°C
Densidade relativa / Relative density (20°C):	0.907 a 0.935
Índice de refração / Refractive index (20°C):	1.495 – 1.5050
Índice de rotação / Rotation inde (20°C):	Não disponível
Solubilidade em água /Solubility in water :	Insolúvel
Solubilidade em etanol / Solubility in etanol :	Muito Solúvel

Principais constituintes / Main constituents

thymol	43.00 – 49.00 %
carvacrol	3.00 – 5.00 %
linalol	3.00 – 5.00 %
p-cimeno	15.00 – 22.00 %
γ-terpineno	8.00 – 12.00 %
mirreno	1.00 – 3.00 %

Os produtos de origem natural não fornecem composição idêntica para cada produção. Estes valores são indicativos e não excluem a possibilidade de ligeiras variações. Para composições mais detalhadas por favor solicite-as a quando da aquisição da matéria-prima identificando o lote.

Ficha Técnica

Óleo Essencial *Thymus Vulgaris L. ct Thymol*

Informações regulamentares / Regulatory information

Directivas da EU 67/548/CEE

Xn: Nocivo
N: Perigo para o ambiente
R10: Inflamável
R43: Pode causar reacção de sensibilização para a pele.
R50/53: Muito tóxico para os organismos aquáticos, pode causar efeitos nefastos a longo prazo em ambiente aquático
R65: Nocivo: pode causar sensibilização pulmonar, se ingerido.

Regulamento CLP (CE) 1272/2008



Aviso: Atenção!
H226 Líquido e vapor inflamáveis.



Aviso: Perigo!
H304 Pode ser fatal, se engolido ou inspirado.



Aviso: Atenção!
H317 Pode provocar irritação cutânea.



Aviso: Atenção!
H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos a longo prazo.

Armazenamento e conservação / Storage and conservation

A conservação dos produtos é feita em frascos de vidro escuro, hermeticamente fechados, protegido do ar e luz, a uma temperatura moderada (máx. 15 ° C) e estável.
Para além dos 3 anos de validade, nas condições de conservação acima descritas, pode haver uma redução do teor de hidrocarbonetos aromáticos ou uma ligeira coloração do produto.

Informações adicionais / Additional Information

Os produtos de origem natural não fornecem composição idêntica para cada produção. Estes valores são indicativos e não excluem a possibilidade de ligeiras variações.

Biológico: Produtos agro-alimentares certificados por Ecocert PT-BIO-02

Matérias-primas biológicas certificadas

100% do total dos ingredientes são provenientes da agricultura biológica.



Anexo 4 – Material utilizado nos ensaios e respectivas especificações

Tabela 25. Lista de material utilizado e respectivas especificações.

Material	Especificação
Substância testada	100% OE de <i>E. globulus</i> diluído a 2,5% (ensaios nº 1 e nº 2) e diluído a 5% (ensaio nº 4) em óleo de coco inodoro
	100% OE de <i>T. vulgaris</i> diluído a 2,5% (ensaio nº 3) e diluído a 5% (ensaio nº 5) em óleo de coco inodoro
	100% Óleo vegetal de coco inodoro, não diluído (ensaio nº6)
Controlo negativo e diluente	100% Óleo vegetal de coco inodoro
Micropipeta Eppendorf Research100	Diluição dos OE
Micropipeta Transferpette® 1000	Diluição dos OE
Tubo de Eppendorf	Diluição dos OE
Folhas circulares de papel de filtro Whatman® com 7 cm de diâmetro	Recortada em anel (ensaios nº1, nº 2, nº 3, nº 4, nº 5, nº 6) e em anel dividida ao meio (ensaio nº 6)
Ixodídeos	14 <i>D. marginatus</i> , 12 <i>R. sanguineus</i> e 54 <i>H. marginatum</i>
Caixa de esferovite com gelo picado no interior	Transporte dos ixodídeos
Sangue venoso de coelho-bravo em tubo, de 1,3 ml, com EDTA	Recolhido, anteriormente, a cada ensaio
Sistema de Hemotek™ (5W1)	Método de alimentação por membrana
Caixa de acrílico	Contendo duas ligações para os dois sistemas de alimentação de Hemotek™
Pipeta de Pasteur	Transferência do sangue do tubo de EDTA para os recipientes de refeição do Hemotek™ e transferência da substância testada e do controlo negativo para o anel de papel de filtro
Película “Parafilm® “M” Laboratory Sealing (American National Can™)	Vedação dos recipientes de refeição
Pelo de coelho-bravo	Estímulo odorífero
Pinça	Manuseamento do anel de papel de filtro e do pelo
Pincel	Transferência dos ixodídeos para o interior da caixa
Rede mosquiteira	Cobertura das aberturas do tampo da caixa sobre cada recipiente de alimentação, para permitir o fluxo de ar e diminuir a concentração do odor (ensaios nº 2 e nº 3)

Rede de malha fina esticada num aro amovível	Cobertura das aberturas do tampo da caixa, para permitir o fluxo de ar, diminuir a concentração do odor e ter melhor visibilidade (ensaios nº 4, nº 5 e nº 6)
Fita-cola	Fixação da rede mosquiteira, (ensaios nº 2º e nº 3), fixação dos cabos elétricos do sistema de Hemotek™ e oclusão de possíveis frestas (ensaio nº 4)
Plasticina	Oclusão de possíveis frestas (ensaios nº 2, nº 3, nº 5 e nº 6)
Recipiente com água no seu interior	Medida de segurança (ensaios nº 2, nº 3, nº 4, nº 5 e nº 6)
Termómetro digital do Hemotek™	Medição da temperatura da placa de aquecimento
Placas de Petri de vidro e de plástico	Acondicionamento e transporte dos ixodídeos
Tesoura	Recorte do papel de filtro
Luvas de latex descartáveis	Equipamento de proteção individual
Bata de laboratório branca	Equipamento de proteção individual

Anexo 5 - Figuras originais dos ixodídeos utilizados nos ensaios obtidas através de um estereomicroscópio binocular



Figura 22. Morfologia externa de espécimes de *R. sanguineus*: ninfa em vista dorsal (a) e ventral (b), macho em vista dorsal (c) e ventral (d) e fêmea em vista ventral (e) e dorsal (f), com régua graduada em mm.

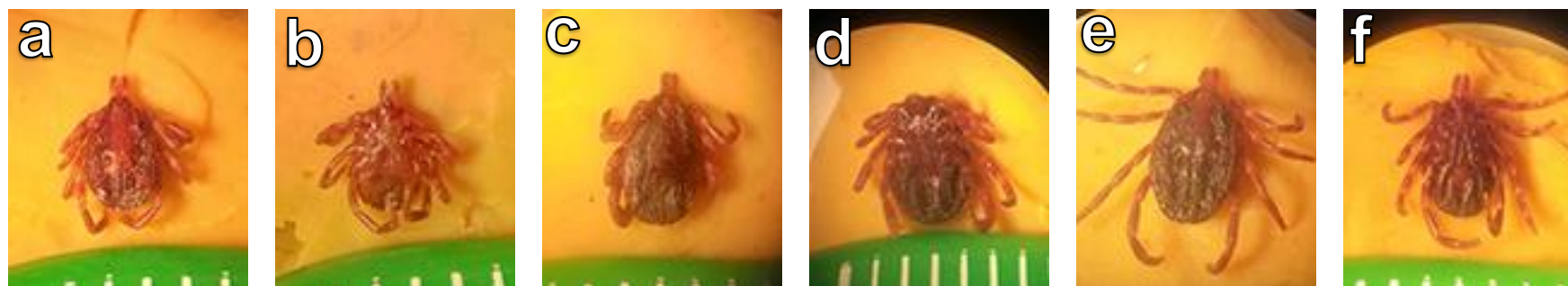


Figura 23. Morfologia externa de espécimes de *H. marginatum*: ninfa em vista dorsal (a) e ventral (b), macho em vista dorsal (c) e ventral (d) e fêmea em vista dorsal (e) e ventral (f), com régua graduada em mm.

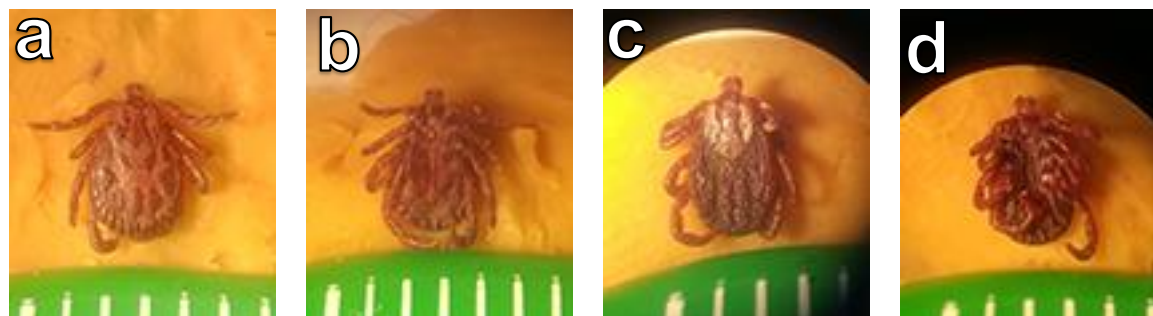


Figura 24. Morfologia externa de espécimes de *D. marginatus*: macho em vista dorsal (a) e ventral (b) e fêmea em vista dorsal (c) e ventral (d), com régua graduada em mm.