

EN

In vitro efficacy of eugenol against larvae of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) from three provinces of Argentina

ES

Eficacia *in vitro* del eugenol contra larvas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) de tres provincias de Argentina

Martin Rafael Daniele^{1,2}; Martin Miguel Dade^{1,2}; Jenny Jovana Chaparro-Gutiérrez³; Dora Romero Salas⁴; Roger Iván Rodríguez-Vivas^{5*}

¹Universidad Nacional de Río Negro, Sede Alto Valle y Valle Medio, Escuela de Veterinaria y Producción Agroindustrial, Choele Choel, Río Negro, Argentina. CP. 836328.

²Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales Facultad de Ciencias de la Salud, Cañuelas, Buenos Aires, Argentina. CP.1814.

³Universidad de Antioquia, UdeA, Grupo de Investigación CIBAV, Facultad de Ciencias Agrarias, Medellín, Carrera 75 No 65-87 Bloque 47-223, Colombia, Colombia. C.P. 05003448.

⁴Universidad Veracruzana. Circunvalación s/n Esq. Yáñez, Col. Unidad Veracruzana, Veracruz, Ver., México. CP. 91710.

⁵FMVZ- Universidad Autónoma de Yucatán, Departamento de Salud Animal y Medicina Preventiva, km 15.5. carretera Mérida-Xmatkuil. Mérida, Yucatán, México. C.P. 97315

Abstract

*Corresponding author:

rvivas@correo.uady.mx

ORCID: 0000-0002-3340-8059

Received: October 3, 2024

Accepted: January 14, 2025

The control of *Rhipicephalus sanguineus* is vital to prevent discomfort in domestic dogs as well as to reduce the risk of transmission of several zoonotic pathogens. Increased resistance and inefficiency of the most extended synthetic acaricides demonstrate the need to study into novel, effective and environmentally safe treatment options for brown dog tick control. This study aims to evaluate the acaricide activity of eugenol *in vitro* on *R. sanguineus* sensu stricto obtained in Argentina. Nine *R. sanguineus* s.s. populations from three provinces (San Luis, Buenos Aires, and Río Negro) were evaluated. The larval packet test was used to assess the toxicological response of *R. sanguineus* s.s. to eugenol. Dose-response mortality regressions, lethal concentrations at 50% (LC50), and slope were calculated by probit analysis. The concentrations that killed 50% of the tick populations studied were those with concentrations between 3.20 and 7.71 mg·mL⁻¹. In conclusion, eugenol has good acaricidal activity against the larvae of *R. sanguineus* s.s., and substantial inter-population variation in response to eugenol was found in the nine tick populations studied.

Keywords: Acaricidal activity, tick control, parasiticides, ectoparasite treatment.

Resumen

El control de *Rhipicephalus sanguineus* es vital para prevenir malestar en los perros domésticos, así como para reducir el riesgo de transmisión de varios patógenos zoonóticos. El aumento de la resistencia y la ineficiencia de los acaricidas sintéticos más extendidos demuestran la necesidad de estudiar opciones de tratamiento que sean novedosos, efectivos y ambientalmente seguros para el control de la garrapata marrón del perro. Este estudio tiene como objetivo evaluar la actividad acaricida *in vitro* del eugenol sobre *R. sanguineus* sensu stricto de Argentina. Se evaluaron nueve pobla-

ciones de *R. sanguineus* s.s. de tres provincias (San Luis, Buenos Aires y Río Negro). Se utilizó la prueba de paquete de larvas para evaluar la respuesta toxicológica de *R. sanguineus* s.s. al eugenol. Las regresiones de mortalidad dosis-respuesta, las concentraciones letales al 50 % (CL50) y la pendiente, se calcularon mediante análisis probit. Las concentraciones que mataron al 50 % de las poblaciones de garrapatas estudiadas fueron de 3.20 a 7.71 mg·mL⁻¹. En conclusión, el eugenol tiene una buena actividad acaricida contra las larvas de *R. sanguineus* s.s., encontrándose una variación sustancial entre poblaciones en respuesta al eugenol en las nueve poblaciones de garrapatas estudiadas.

Palabras clave: Actividad acaricida, control de garrapatas, parasiticidas, tratamiento de ectoparásitos.

Introduction

Rhipicephalus sanguineus parasites preferentially domestic dogs and has a cosmopolitan character, as it is globally distributed. *R. sanguineus* infests a wide range host such as wild carnivores, birds, livestock, and humans (Nava et al., 2018; Hosseini-Chegeni, 2019). Dogs are the main host of *R. sanguineus* and this tick species has high relevance in veterinary and public health due to its role as a vector of several zoonotic pathogens such as *Mycoplasma haemocanis*, *Coxiella burnetii*, *Leishmania chagasi*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Rickettsia* spp. (Oskam et al., 2017; Ipek et al., 2018; Ortega-Morales et al., 2019).

The use of synthetic acaricides continues to be the most common control strategy against *R. sanguineus*. The intensive use of synthetic acaricides exerts a strong selective pressure generating resistant tick populations to some active components such as permethrin, amitraz, fipronil, and ivermectin (Miller et al., 2001; Eiden et al., 2005; de Oliveira Filho et al., 2017; Rodríguez-Vivas et al., 2017a, b; Daniele et al., 2021).

Plant-derived products (containing botanical extracts, fractions, or isolated compounds) with acaricide activity are a strategy with huge potential to tick control (Stafford et al., 2017; Adenubi et al., 2018).

Eugenol is a phenolic compound found in essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*), clove pepper (*Pimenta dioica*), betel pepper (*Piper betel*), basil (*Ocimum basilicum*), cinnamon (*Cinnamomum verum*), Bayrum tree (*Pimenta racemosa*), nutmeg (*Myristica fragrans*), and other plants (Raja et al., 2015). Several studies have demonstrated the wide spectrum acaricidal activity of eugenol (Monteiro et al., 2012; Valente et al., 2017; Chen et al., 2019; Coelho et al., 2020). This study aims to evaluate under controlled *in vitro* conditions the acaricide activity of eugenol on *R. sanguineus* s.s. from three Argentinean regions.

Introducción

Los parásitos *Rhipicephalus sanguineus* con preferencia en perros domésticos, poseen un carácter cosmopolita, ya que se distribuyen por todo el mundo. *R. sanguineus* infesta a una amplia gama de hospedadores, como por ejemplo carnívoros salvajes, aves, ganado y seres humanos (Nava et al., 2018; Hosseini-Chegeni, 2019). Los perros son el hospedador principal, y esta especie de garrapata tiene una gran relevancia en la salud veterinaria y pública debido a su papel como vector de varios patógenos zoonóticos, tales como: *Mycoplasma haemocanis*, *Coxiella burnetii*, *Leishmania chagasi*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia* spp. (Oskam et al., 2017; Ipek et al., 2018; Ortega-Morales et al., 2019).

El uso de acaricidas sintéticos sigue siendo la estrategia de control más común contra *R. sanguineus*. El uso intensivo de estos acaricidas ejerce una fuerte presión selectiva, que genera poblaciones de garrapatas resistentes a algunos componentes activos como permetrina, amitraz, fipronil e ivermectina (Miller et al., 2001; Eiden et al., 2015; de Oliveira Filho et al., 2017; Rodríguez-Vivas et al., 2017a, b; 2017b; Daniele et al., 2021).

Los productos de origen vegetal (que contienen extractos botánicos, fracciones o compuestos aislados) con actividad acaricida, representan una estrategia con enorme potencial para el control de garrapatas (Stafford et al., 2017; Adenubi et al., 2018).

El eugenol es un compuesto fenólico presente en los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*), pimienta de clavo (*Pimenta dioica*), pimienta de betel (*Piper betel*), albahaca (*Ocimum basilicum*), canela (*Cinnamomum verum*), malagueta (*Pimenta racemosa*), nuez moscada (*Myristica fragrans*) y otras plantas (Raja et al., 2015). Diversos estudios han demostrado la actividad acaricida de amplio espectro del eugenol (Monteiro et al., 2012; Valente et al., 2017; Chen et al.,



Figure 1. Map of Argentina (Buenos Aires Province, San Luis Province, Río Negro Province) showing study sites where ticks were collected.

Figura 1. Mapa de Argentina (Provincia de Buenos Aires, Provincia de San Luis, Provincia de Río Negro) que muestra los sitios de estudio donde se recolectaron las garrapatas.

Materials and Methods

Study site

Ticks were collected from three provinces of Argentina (Buenos Aires, Río Negro and San Luis). The *in vitro* study was carried out at the Laboratory for Veterinary Parasitology, at National University of Río Negro (Choel Choel, Río Negro, Argentina).

In each province three sites (rural areas, veterinary hospitals and veterinary clinics) were studied (Figure 1). The minimum distance between sites was 50 km.

Ticks

Nine engorged female *R. sanguineus* populations were collected from infested dogs in the three provinces of Argentina between January and April, 2023. All engorged females were removed from dogs using fine-point forceps as close to the dog's skin as possible to collect intact mouthparts and prevent any mechanical injury to the reproductive system of the female tick and avoid any interference with egg laying as described by Gammon and Salam (2002) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology guidelines (Marchiondo et al., 2013).

2019; Coelho et al., 2020). Este estudio tiene como objetivo evaluar, en condiciones controladas *in vitro*, la actividad acaricida del eugenol frente a *R. sanguineus* s.s. de tres regiones de Argentina.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Las garrapatas se recolectaron en tres provincias de Argentina (Buenos Aires, Río Negro y San Luis). El estudio *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Negro (Choel Choel, Río Negro, Argentina).

En cada provincia se estudiaron tres sitios (zonas rurales, hospitales y clínicas veterinarias) (Figura 1). La distancia mínima entre los sitios fue de 50 km.

Garrapatas

Entre enero y abril de 2023, se recolectaron nueve poblaciones de garrapatas hembra repletas de *R. sanguineus* de perros infestados en las tres provincias de Argentina. Todas las garrapatas hembra repletas se extrajeron de los perros con pinzas de punta fina lo más cerca posible de la piel del perro para recoger

Table 1. Provinces, sites, number of dogs and number of ticks *R. sanguineus* s.s. studied in Argentina.
Cuadro 1. Provincias, localidades, número de perros y número de garrapatas *R. sanguineus* s.s. estudiadas en Argentina.

Province / Provincia	Site / Localidad	No. of sampled dogs / Número de perros muestreados	No. of collected engorged females / Número de garrapatas hembra repletas colectadas
Buenos Aires	Rural area / Zona rural	4	30
	Veterinary hospital / Hospital veterinario	4	35
	Veterinary clinic / Clínica veterinaria	6	40
Río Negro	Rural area / Zona rural	4	31
	Veterinary hospital / Hospital veterinario	6	31
	Veterinary clinic / Clínica veterinaria	5	35
San Luis	Rural area / Zona rural	4	37
	Veterinary hospital / Hospital veterinario	6	34
	Veterinary clinic / Clínica veterinaria	5	35

Specimens were collected for taxonomic classification according to Walker et al. (2000) and morphological comparison with images taken from previous studies. The engorged female ticks were classified as *R. sanguineus* s.s. as previously identified in the region by Daniele et al. (2021). The collected engorged females were transported to the laboratory.

In the laboratory, the engorged females collected from dogs at each site were transferred to plastic Petri dishes with holes for the passage of air and incubated at 27–28 °C, 70–80% relative humidity, and photoperiod (LD 12: 12 h) to allow for egg laying. After 20 days the eggs were mixed and transferred to glass jars with cotton lids and incubated under the same conditions to allow the larvae to hatch. Live larvae of 14–21 days of age were used for bioassays (Rodríguez-Vivas et al., 2017a).

The studied provinces were Buenos Aires, Río Negro and San Luis. In each province, 15–20 dogs were inspected, and 4–6 (26.6–30%) were infested with *R. sanguineus* engorged females. In each province three sites were studied and one tick population from infested dogs were collected for convenience (a total of nine collection sites) (Table 1).

Eugenol

Eugenol was purchased from Sigma-Aldrich, with a certificate of ≥99% purity (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA E51791). The compound was diluted in 70% ethanol (ethanol+distilled water v/v) because this solvent is not toxic to larvae of *R. sanguineus* (Calmon, 2013).

piezas bucales intactas y evitar cualquier lesión mecánica en el sistema reproductivo de la garrapata, así como cualquier interferencia con la puesta de huevos, tal como describe Gammon & Salam (2002) y en las normas de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (Marchiondo et al., 2013).

Los ejemplares se recolectaron para su clasificación taxonómica de acuerdo con Walker et al. (2000) así como comparación morfológica con imágenes de estudios previos. Las garrapatas hembra se llevaron al laboratorio y se clasificaron como *R. sanguineus* s.s., tal como se identificaron previamente en la región por Daniele et al. (2021).

En el laboratorio, las garrapatas hembra recolectadas y procedentes de perros en cada sitio, se colocaron en placas Petri con orificios para el paso de aire y se incubaron a 27–28 °C, 70–80 % de humedad relativa y fotoperiodo (LD 12: 12 h) para permitir la puesta de huevos. A los 20 días se mezclaron los huevos y se colocaron en frascos de vidrio con tapas de algodón y se incubaron en las mismas condiciones para permitir la eclosión de larvas. Para los bioensayos se utilizaron larvas vivas de 14–21 días de edad (Rodríguez-Vivas et al., 2017a).

Las provincias que se estudiaron fueron Buenos Aires, Río Negro y San Luis. En cada provincia se inspeccionaron entre 15 y 20 perros, 4 y 6 de ellos (26.6–30 %) estaban infestados con garrapatas hembra repletas de *R. sanguineus*. En cada provincia se estudiaron tres localidades, y se recolectó una población de garrapatas de los perros infestados por conveniencia (un total de nueve sitios de recolección) (Cuadro 1).

Larval packet test

To test the susceptibility of the nine tick populations the larval packet test was used. From an approximately 100 larvae of *R. sanguineus* s.s. were placed on Whatman paper envelopes using a brush no. 4 in 6 x 6 cm, closed using clips and 90 µ of the solution to be challenged was added to both surfaces, then taken to the incubator at 27 °C temperature and 80% relative humidity for 24 hours. After this time the packages were opened, and the mortality rates were obtained using the following formula.

$$\frac{\text{total number of dead larvae}}{\text{total number of dead larvae}} \times 100$$

The working dilutions used to determine the lethal concentration 50 (LC50) were: 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, and 30 mg·mL⁻¹ of eugenol in distilled water. Each working dilution was challenged in triplicate and as a negative control 70% ethanol

Data analysis

The mortality records of each bioassay were analyzed by Probit analysis using Polo Plus programme (LeOra software, Inc., Berkeley, CA, U.S.A.). This analysis provided estimations of 50% lethal concentration values and associated 95% confidence intervals. Lethal concentrations to kill 50% (LC50) of tick populations and their respective 95% confidence intervals (CI95) were calculated for each tick population.

Results and Discussion

The results of probit analysis to estimate the LC50 of eugenol in each tick population, are presented in Table 2. The concentration that killed 50% of the tick populations studied were from 3.20 to 7.71 mg/mL. The lowest LC50 was 2.10 mg·mL⁻¹ (1.6-2.7 CI95) in *R. sanguineus* s.s. larvae from a veterinary clinic of Buenos Aires and the highest LC50 was 7.71 mg·mL⁻¹ (6.2-9.6) in the population collected from the rural zone of Río Negro. All tick population in the Río Negro provinces had the highest LC50.

In recent years, knowledge and interest in the field of herbal medicine, phytotherapy and plant-based products have increased (Adenubi et al., 2018; Mendel, et al., 2019). Among the isolated compounds that showed acaricide properties in different species is eugenol (Brown et al., 1998). In *in vitro* studies, eugenol disrupted the oviposition (Brown et al., 1998), showed larvicidal and acaricidal activity (Monteiro et al., 2012; Valente et al., 2014) and exhibited repellent properties against *R. microplus* (Zeringota et al., 2013). A previous

Eugenol

El eugenol se adquirió en Sigma-Aldrich, con un certificado de pureza ≥ 99 % (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU. E51791). El compuesto se diluyó en etanol al 70 % (etanol + agua destilada v/v) porque este disolvente no es tóxico para las larvas *R. sanguineus* (Calmon, 2013).

Prueba de paquetes de larvas

Para comprobar la susceptibilidad de las nueve poblaciones de garrapatas, se utilizó la prueba de paquete de larvas. Se colocaron aproximadamente 100 larvas *R. sanguineus* s.s. en sobres de papel Whatman con ayuda de un pincel nº 4 de 6 x 6 cm, los sobres se cerraron con broches y se añadieron 90 µ de la solución a evaluar en ambas superficies, después se llevaron a la incubadora a 27 °C de temperatura y 80 % de humedad relativa durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo se abrieron los sobres y se obtuvieron las tasas de mortalidad mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{total larvas muertas}}{\text{total larvas vivas}} \times 100$$

Las diluciones de trabajo utilizadas para determinar la concentración letal 50 (CL50) fueron: 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 30 mg·mL⁻¹ de eugenol en agua destilada. Cada dilución de trabajo se evaluó por triplicado y como control negativo se utilizó etanol al 70 %.

Análisis de datos

Los registros de mortalidad de cada bioensayo se analizaron mediante un análisis probit utilizando el programa Polo Plus (LeOra Software, Inc., Berkeley, CA, EE. UU.). Este análisis proporcionó estimaciones de los valores de concentración letal del 50 % e intervalos de confianza asociados del 95 %. Se calcularon las concentraciones letales para matar al 50 % (CL50) de las poblaciones de garrapatas y sus respectivos intervalos de confianza al 95 % (IC95) para cada población de garrapatas.

Resultados y Discusión

En el Cuadro 2 se muestran los resultados del análisis probit para estimar la CL50 de eugenol en cada población de garrapatas. La concentración que mató al 50 % de las poblaciones de garrapatas estudiadas fue de 3.20 a 7.71 mg·mL⁻¹. La CL50 más baja fue de 2.10 mg·mL⁻¹ (1.6-2.7 IC95) en larvas *R. sanguineus* s.s. provenientes de una clínica veterinaria de Buenos Aires, y la CL50

Table 2. Lethal concentration 50% (mg·mL⁻¹), slope, and 95% confidence interval of eugenol in *R. sanguineus* s.s. larvae from three different provinces of Argentina.

Cuadro 2. Concentración letal 50% (mg·mL⁻¹), pendiente e intervalo de confianza al 95% de eugenol en larvas de *R. sanguineus* s.s. de diferentes tres provincias de Argentina.

Province/ Provincia	Site / Sitio	LC50 / CL50 mg·mL ⁻¹ *	CI95 mg·mL ⁻¹	Slope / Pendiente
San Luis	Veterinary hospital / Hospital veterinario	3.20a	2.38 – 4.7	1.57
	Veterinary Clinic/ Clínica veterinaria	2.94a	2.5 – 4.0	1.81
	Rural area / Zona rural	4.66b	3.6 – 6.2	1.91
Buenos Aires	Veterinary hospital / Hospital veterinario	3.91b	3.0 – 5.4	1.67
	Veterinary Clinic / Clínica veterinaria	2.10a	1.6 – 2.7	1.7
	Rural area / Zona rural	3.12a	2.4 – 4.1	1.71
Río Negro	Veterinary hospital / Hospital veterinario	5.52b	4.4 – 6.8	2.31
	Veterinary Clinic / Clínica veterinaria	5.50b	4.1 – 7.3	1.80
	Rural area / Zona rural	7.71b	6.2 – 9.6	2.1

* Different letters in the column show significant differences. LC = Lethal concentration, CI = confidence interval

* Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas. CL = Concentración letal, IC = Intervalo de confianza

study showed 100 % of mortality of *R. microplus* and *Dermacentor nitens* larvae using a dose of 5.0 µl·mL⁻¹ of eugenol (Monteiro et al., 2012). In Brazil, *R. sanguineus* s.l. larvicidal efficacy was reported between 64 and 95 % using doses of 5 and 10 mg·mL⁻¹ of eugenol (Coehlo et al., 2020). In the present study, eugenol concentration of 3.20-7.71 mg·mL⁻¹ killed 50% of all tick populations. This acaricidal activity is attributed to the neurotoxic effect that eugenol has when binding to the octopamine receptors in the tick cells (Enan, 2001).

In this study a substantial inter-population variation in the response of *R. sanguineus* s.s. to eugenol was found. The three tick populations of the province Río Negro needed significant higher concentration of eugenol to kill 50% of the populations. To date there is no report of resistance of *R. sanguineus* to eugenol and this variation in susceptibility to different populations of ticks might be due to the biological variation or cross resistance of tick populations. However, amitraz, a commercially acaricide, acts on the octopamine receptors that produces a hypersensitivity and death of ticks (Rodríguez-Vivas et al., 2014), which is similar to the mechanism so far identified of eugenol in arthropods. Amitraz is an acaricide used for the control of ticks and mites in dogs from Argentina (Daniele et al., 2021) and it might be selected individual resistance of *R. sanguineus* as it was found in Panama (Miller et al., 2001) and Mexico (Rodríguez-Vivas et al., 2017b). In future studies, it is necessary to know if there is resis-

más alta fue de 7.71 mg·mL⁻¹ (6.2-9.6 IC95) en la población recolectada de la zona rural de Río Negro. Todas las poblaciones de garrapatas en la provincia de Río Negro tuvieron la CL50 más alta.

La Figura 2 muestra la mortalidad, dependiendo de la dosis de eugenol para matar larvas de *R. sanguineus* s.s. de tres diferentes provincias de Argentina.

En los últimos años han aumentado los conocimientos y el interés en el campo de la fitoterapia y los productos a base de plantas (Adenubi et al., 2018; Mendel et al., 2019). Entre los compuestos aislados que han mostrado propiedades acaricidas en diferentes especies se encuentra el eugenol (Brown et al., 1998). En estudios *in vitro*, el eugenol interfirió en la oviposición (Brown et al., 1998), mostró actividad larvicida y acaricida (Monteiro et al., 2012; Valente et al., 2014) y presentó propiedades repelentes frente a *R. microplus* (Zeringota et al., 2013). Un estudio previo mostró una mortalidad del 100 % en larvas de *R. microplus* y *Dermacentor nitens* utilizando una dosis de 5.0 µl·mL⁻¹ de eugenol (Monteiro et al., 2012). En Brasil, se reportó una eficacia larvicida de *R. sanguineus* s.s. entre 64 y 95 % con dosis de 5 y 10 mg·mL⁻¹ de eugenol (Coehlo et al., 2020). En el presente estudio, una concentración de eugenol de 3.20-7.71 mg·mL⁻¹ mató al 50 % de todas las poblaciones de garrapatas. Esta actividad acaricida se atribuye al efecto neurotóxico que el eugenol ejerce al unirse a los receptores de octopamina en las células de la garrapata (Enan, 2001).

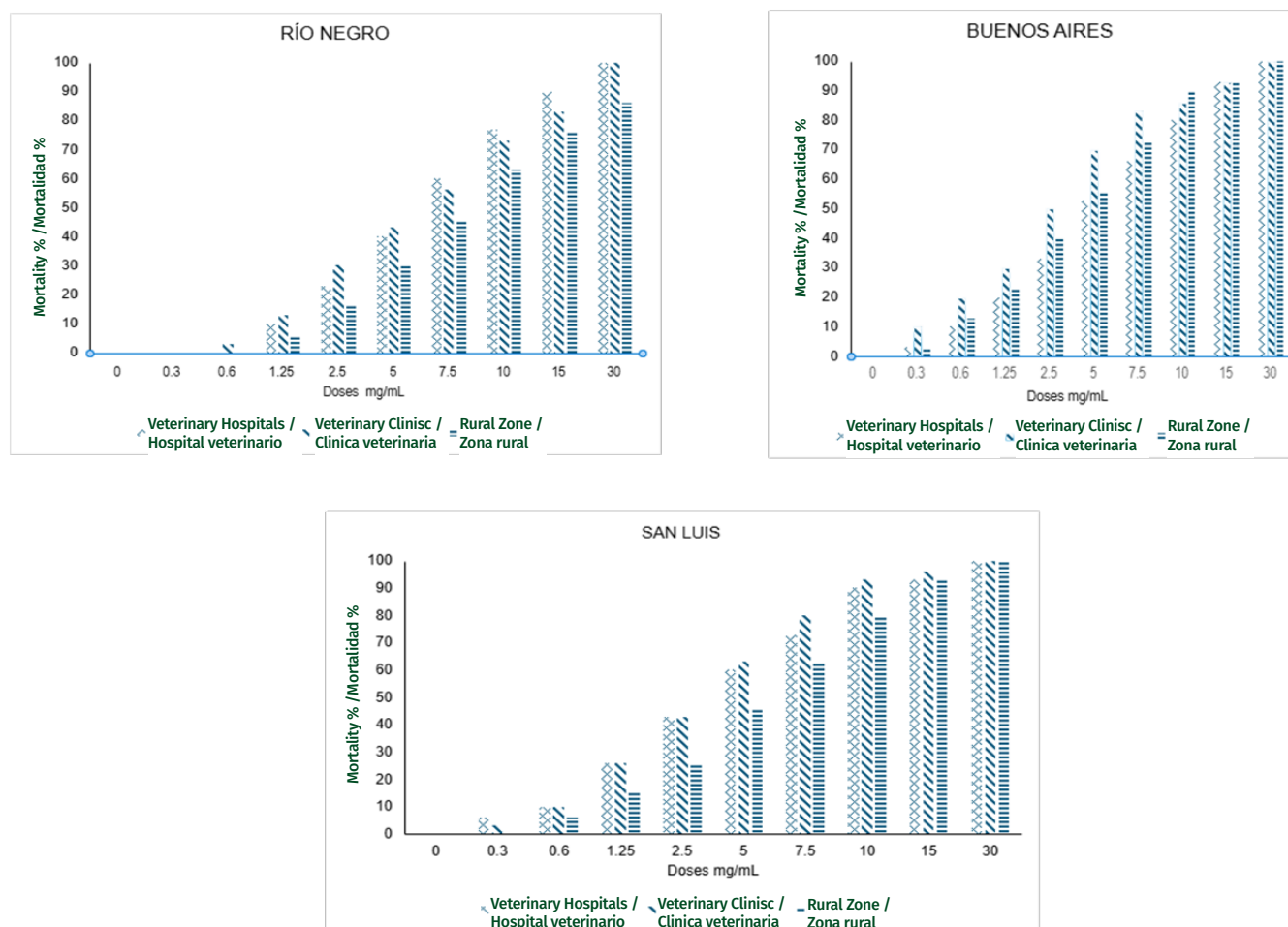


Figure 2. Mortality depending on the dose of eugenol to kill *R. sanguineus* s.s. larvae from three different provinces of Argentina.
Figura 2. Mortalidad dependiendo de la dosis de eugenol para matar larvas de *R. sanguineus* s.s. de tres diferentes provincias de Argentina.

tance of *R. sanguineus* to eugenol in some tick populations, as well as the existence of a cross reaction with another commercial acaricide such as amitraz.

Conclusions

Eugenol showed good acaricidal activity against larvae of *R. sanguineus* s.s. A substantial inter-population variation in the response of *R. sanguineus* to eugenol was found in the nine tick populations studied (LC50 from 2.1 to 7.7 mg·mL⁻¹).

End of English version

References / Referencias

Adenubi, O.T., Ahmed, A.S., Fasina, F.O., McGaw, L.J., Eloff, J.N. & Naidoo, V. (2018). Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. *Industrial Crops and Products*, 123, 779-806. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.075>

En este estudio se encontró una variación inter-poblacional sustancial en la respuesta de *R. sanguineus* s.s. frente al eugenol. Las tres poblaciones de garrapatas de la provincia de Río Negro requirieron una concentración significativamente mayor de eugenol para matar al 50 % de la población. Hasta la fecha, no hay reportes de resistencia de *R. sanguineus* al eugenol, y esta variación en la susceptibilidad entre diferentes poblaciones de garrapatas podría deberse a la variabilidad biológica o a una posible resistencia cruzada. Sin embargo, el amitraz, un acaricida comercial, actúa sobre los receptores de octopamina, produciendo hipersensibilidad y muerte en las garrapatas (Rodríguez-Vivas et al., 2014), un mecanismo similar al identificado hasta ahora para el eugenol en artrópodos. En Argentina, el amitraz es un acaricida que se utiliza para el control de garrapatas y ácaros en perros (Daniele et al., 2021), y podría ser una resistencia individual seleccionada de *R. sanguineus*, como se encontró en Panamá (Miller et al., 2001) y México (Rodríguez-Vivas et al., 2017b). En estudios futuros, es necesario determinar si *R. sanguineus* presenta resistencia al eugenol

- Araújo, L.X., Novato, T.P.L., Zeringota, V., Maturano, R., Melo, D., Da Silva, B.C., Daemon, E., Carvalho, M.G. & Monteiro, C.M. (2016). Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 30(4), 377-382. <https://doi.org/10.1111/mve.12181>.
- Becker, S., Webster, A., Doyle, R.L., Martins, J.R., Reck, J. & Klafke, G.M. (2019). Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, Latreille (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(5), 1046-1050. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.015>
- Bendre, R.S., Rajput, J.D., Bagul, S.D., & Karandikar, P.S. (2016). Outlooks on medicinal properties of eugenol and its synthetic derivatives. *Natural Products Chemistry & Research*, 4(212), 2. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000212>
- Brown, H.A., Minott, D.A., Ingram, C.W., Williams, L.A.D. (1998). Biological activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Science and Its Application*, 18, 9-16. <https://doi.org/10.1017/S1742758400007402>
- Calmon, F. (2013). Avaliação da toxicidade de solventes e surfactante sobre os estágios imaturos de *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) e estudos preliminares sobre ectoparasitos de aves silvestres de fragmentos de Mata Atlântica na Zona da Mata de Minas Gerais. Master's Thesis. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Chen, Z., van Mol, W., Vanhecke, M., Duchateau, L., & Claerebout, E. (2019). Acaricidal activity of plant-derived essential oil components against *Psoroptes ovis* *in vitro* and *in vivo*. *Parasites & Vectors*, 12(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3654-x>.
- Coelho, L., de Paula, L.G.F., Alves, S.D.G.A., Sampaio, A.L.N., Bezerra, G. P., Vilela, F.M.P., da Silva Matos, R., Zeringôta, V., Borges, L.M.F. & Monteiro, C. (2020). Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. *Veterinary Parasitology*, 277, 108989. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108989>
- Daniele, M.R., Dade, M.M., Alvarez, J.D., Reynaldi, F.J., Errecalde, R.O., Rodríguez-Vivas, R.I. (2021). Current status of resistance to ivermectin in *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto infesting dogs in three provinces in Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 26, 100624. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100624>
- de Oliveira, Filho, J.G., Ferreira, L.L., Sarria, A.L.F., Pickett, J.A., Birkett, M.A., Mascarin, G.M., Pérez de León, A. & Borges, L. M. F. (2017). Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, infestation of susceptible dog hosts is reduced by slow release of semiochemicals from a less susceptible host. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(1), 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.10.010>
- Eiden, A.L., Kaufman, P.E., Oi, F.M., Allan, S.A. & Miller, R.J. (2015). Detection of permethrin resistance and fipronil tolerance en algunas poblaciones de garrapatas, así como evaluar la existencia de una reacción cruzada con otros acaricidas comerciales, como el amitraz.

Conclusiones

El eugenol mostró buena actividad acaricida frente a larvas de *R. sanguineus* s.s. Se encontró variación inter-poblacional sustancial en la respuesta de *R. sanguineus* al eugenol en las nueve poblaciones de garrapatas estudiadas (CL50 de 2.1 a 7.7 mg·mL⁻¹).

Fin de la versión en español

- in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *Journal of Medical Entomology*, 52(3), 429-436. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv005>
- Enan, E.E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.30, p.325-327. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00255-1)
- Gammon, M., & Salam, G. (2002), Tick removal. *Am. Fam. Physician* 66, 643-645.
- Hosseini-Chegeni, A., Nasrabadi, M., Sadat Hashemi-Aghdam, S., Oshaghi, M. A., Lotfi, A., Telmadarraiy, Z. & Sedaghat, M.M. (2019). Molecular identification of *Rhipicephalus* species (Acari: Ixodidae) parasitizing livestock from Iran. *Mitochondrial DNA Part A*, 30(3), 448-456. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1546298>
- Ipek, N.D.S., Özübek, S. & Aktas, M. (2018). Molecular evidence for transstadial transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. *Journal of Medical Entomology*, 55(2), 440-444. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx217>
- Marchiondo, A.A., Holdsworth, P.A., Green, P., Blagburn, B.L. & Jacobs, D.E. (2013). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats, *Veterinary Parasitology*, 194(1), 84-97. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.028>
- Mendel, M. (2019). Pharmacological and toxicological insights into veterinary phytotherapy. *Planta Medica*, v.85, n.18, KL-VET. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3399641>
- Miller, R.J., George, J.E., Guerrero, F., Carpenter, L. & Welch, J.B. (2001). Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal army veterinary quarantine center, Panama. *Journal of Medical Entomology*, 38(2), 298-302. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.298>
- Monteiro, C.M., Maturano, R., Daemon, E., Catunda-Junior, F.E.A., Calmon, F., Senra, T.S., Faza, A. & Carvalho, M.G. (2012). Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus*

- microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. *Parasitology Research*, 111, 1295–1300. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2964-0>
- Nava, S., Beati, L., Venzal, J.M., Labruna, M.B., Szabó, M.P., Petney, T., Saracho-Bottero M.N., Tarragona, E.L., Dantas-Torres, F., Silva, M.M.S., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A. & Estrada-Peña, A. (2018). *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(6), 1573-1585. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001>
- Ortega-Morales, A.I., Nava-Reyna, E., Ávila-Rodríguez, V., González-Álvarez, V.H., Castillo-Martínez, A., Siller-Rodríguez, Q.K., Cabezas-Cruz A, Dantas-Torres F. & Almazán, C. (2019). Detection of *Rickettsia* spp. in *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. *Parasites & Vectors*, 12(1), 1-7. [10.1186/s13071-019-3377-z](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3377-z)
- Oskam, C.L., Gofton, A.W., Greay, T.L., Yang, R., Doggett, S., Ryan, U.M. & Irwin, P.J. (2017). Molecular investigation into the presence of a *Coxiella* sp. in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Australia. *Veterinary Microbiology*, 201, 141-145. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.021>
- Raja, M.C., Srinivasan, V., Selvaraj, S. & Mahapatra, S.K. (2015). Versatile and synergistic potential of eugenol: a review. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 6(5), 367. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000367>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I. & De León, A.P. (2017b). First documentation of ivermectin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 233, 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.015>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I. & Bolio-González, M.E. (2017a). First report of amitraz and cypermethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infesting dogs in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(1), 72-77. <https://doi.org/10.1111/mve.12207>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Pérez-Cogollo, L.C., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I., Miller, R.J., Li, A.Y., Pérez de León, A.A., Guerrero, F.D. & Klafke, G.M. (2014). *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 23(2), 113-122. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014044>
- Stafford III, K.C., Williams, S.C. & Molaei, G. (2017). Integrated pest management in controlling ticks and tick-associated diseases. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1) 28. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx018>
- Valente P.P., Amorim, J.M., Castilho, R.O., Leite, R.C. & Ribeiro, M.F.B. (2014). *In vitro* acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 113, 417–423. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3670-2>
- Valente, P.P., Moreira, G.H.F.A., Serafini, M.F., Facury-Filho, E.J., Carvalho, A.Ú., Faraco, A.A.G., Castilho R.O. & Ribeiro, M.F. (2017). *In vivo* efficacy of a biotherapeutic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitology Research*, 116 (3), 929-938. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5366-x>
- Walker, J.B., Keirans, J.E. & Horak, I.G. (2000). Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world. Cambridge: Cambridge University Press.
- Zeringóta, V., Senra, T.O.S., Calmon, F., Maturano, R., Faza, A.P., Catunda-Junior, F.E.A., Monteiro, C.M., de Carvalho, M.G. & Daemon, E. (2013). Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 12(7), 2675-2679. [10.1007/s00436-013-3434-z](https://doi.org/10.1007/s00436-013-3434-z)