

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO
E PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE COM AÇÃO SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus

Larissa Bezerra dos Santos

CAMPO GRANDE, MS
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO
E PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE COM AÇÃO SOBRE *Rhicephalus (Boophilus)*
microplus

PROSPECTING OF BIOACTIVE COMPOUNDS NATIVE PLANTS OF THE CERRADO
AND PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE WITH ACTION IN *Rhicephalus (Boophilus)*
microplus

Larissa bezerra dos Santos

**Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges
Co – Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2013

LARISSA BEZERRA DOS SANTOS

**“PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS NATIVAS
DO CERRADO E PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE COM AÇÃO
SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”**

**“PROSPECTING OF BIOACTIVE COMPOUNDS NATIVE PLANTS OF THE CERRADO
AND PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE WITH ACTION IN
Rhipicephalus (Boophilus) microplus”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestra.

Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 27/02/2013


Dr. Fernando de Almeida Borges
Orientador


Dr. Renato Andreotti e Silva


Dr. Paulo Henrique Duarte Cançado

Dedicatória

A Deus, por fortalecer a minha fé a cada obstáculo.

Dedico.

Agradecimentos

Meu especial agradecimento ao Dr. Fernando de Almeida Borges, pela orientação na execução deste trabalho, confiança, paciência, incentivo, pelo apoio e pelos ensinamentos recebidos, minha sincera gratidão.

Ao Dr. Carlos Alexandre Carollo, pela co-orientação e participação no constante aprendizado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, muito obrigada pelo apoio e amizade. Dyego Borges, pela paciência em me ajudar a elucidar os mais diversos entraves deste trabalho, Juliana Sandrini e Bárbara Papassoni, pela boa vontade, cooperativismo, participação efetiva durante todo este estudo, sem vocês nada disso seria possível, Tamires Lima, Jéssica Teles, Rafael Heckler, Mateus Vieira, pela ajuda na manutenção do isolado de carrapato, pelo apoio, palavras de força, pela companhia durante o almoço, pelas contagens de larvas rsrs. Aos colegas de curso, Neylisa Lázaro, pela amizade, força e alegria contagiante, Antonio Souza Filho, pela ajuda sempre afoita que pedi, pela companhia nos almoços de quarta-feira, Amanda Carvalho e Flávia Bacha, pela diversão das minhas manhãs cheias de artigos para ler, pelo cafezinho, papo descontraído e almoços no shopping rsrs e ao Nilton Gabriel Paiva, pela amizade e apoio.

Ao técnico Antônio Ramiro, pela contribuição não só neste trabalho, mas também por ser meu fornecedor de Avon preferido.

Ao técnico Carlos de La Fuente, com sua experiência sempre ajudava com uma boa observação.

Ao Edson dos Santos, à Jeana Escher e Laís Carrato pela ajuda na elaboração dos extratos e constante colaboração deste trabalho.

Aos meus amigos por estarem sempre na torcida, presentes mesmo que por uma mensagem no celular, no facebook, um e-mail... Franciely Varoni, Paula Ibrahim, Andreyra Nogueira, Jaqueline Oshiro, Juliana Saraiva, Luciene Ortiz, Lígia Silvestre, Letícia Araújo, Leandro Motta, Luis Claudio Reis, Leonardo Bastos e Hosilene Lubacheski.

Aos meus cunhados, Ana Carla de Lima, pela amizade, pelo amor que me dedica, pelo cineminha de vez em quando, Alaiza Corrêa de Lima, pela generosidade, amizade e carinho, Ao casal Geisse Carlos de Lima e Cristielly Farias, pela amizade, força e pela máquina de macarrão que deram ao meu marido e, que faz o maior sucesso com o LadPar, à minha sogra, que me ama como filha e torce sempre pelo meu sucesso.

Aos meus pais, Maria Neide Jesus Bezerra e Fernandes Rodrigues dos Santos, pela dedicação, carinho, amor na minha educação, me ensinaram a ter disciplina e sempre dar o melhor de mim. Meus Irmãos Kamila e Fernando, pela torcida sempre.

À minha tia Ana, que sempre foi minha amiga, minha mãe e minha irmã. Nunca vou poder agradecer tudo que já fez por mim.

Ao José Carlos de Lima “*in memorian*”, pelo carinho, torcida, pelo exemplo de ética e força.

Ao meu amado esposo, Alexandre Corrêa, por seu amor e apoio incondicional, por abrir os meus olhos quando é necessário, por ser meu esteio, meu amigo, meu irmão, meu companheiro durante quase quinze anos e, principalmente nesta fase turbulenta da elaboração desta dissertação. A você, todo meu amor.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram, contribuíram ou torceram por este trabalho, meu muito obrigada. É um ciclo que se fecha. A todos vocês dedico esta conquista.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

Resumo

SANTOS, L. B. Prospecção de compostos bioativos de plantas nativas do Cerrado e Pantanal Sul-mato-grossense com ação sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ano. 2012. Dissertação (Mestrado)/ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

A aplicação de acaricidas químicos de forma indiscriminada e inadequada resultou na instalação da resistência nas populações de carrapatos do rebanho bovino brasileiro. As pesquisas no âmbito da fitoterapia vêm buscando a possibilidade de descoberta de um novo produto para o controle do parasitismo. Esse tipo de estudo é de fundamental importância na legitimação de extratos vegetais. Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade acaricida *in vitro* de extratos de plantas com potencial medicinal do Cerrado e Pantanal Sul-mato-grossense. Os testes *in vitro* permitem uma avaliação preliminar sobre as atividades farmacológicas de extratos vegetais. Neste estudo foram 24 plantas analisadas no teste de imersão larval e cinco plantas no teste de imersão de adultos. Destas 24 plantas, 18 apresentam atividade acaricida sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus Boophilus microplus* com eficácia superior a 95% na concentração de 40%. O extrato bruto hidroalcoólico da *Tabebuia serratifolia* se sobressaiu aos demais extratos, *Sesbania virgata*, *Centratherum punctatum*, *Lantana canescens*, *Melanthera latifolia*, *Aeschynomene denticulata*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Crotalaria micans*, *Senna obtusifolia*, *Angelonia hirta*, *Diodia kuntzei*, *Sebastiania hispida*, *Croton glandulosus*, *Richardia grandiflora*, *Aspilia latissima*, *Hippocratea volubilis*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata*, *Zanthoxylum rigidum*, *Hyptis mutabilis*, *Ocotea diospyrifolia* e *Tabebuia rósea* e, por isso esta espécie foi a mais manipulada neste estudo. Foram testados em fêmeas (teste de imersão de adultos) de *R. (B). microplus*, cinco extratos e a fração hexânica da *T. serratifolia* realizados em duplicata. A *T. serratifolia* obteve 96% de eficácia com o extrato bruto e 82% com a fração hexânica em relação ao controle negativo.

Palavras-chave: acaricida; cromatografia; fitoterapia; *Rhipicephalus Boophilus microplus*

Abstract

SANTOS, L. B. Prospecting of bioactive compounds native plants of the Cerrado and Pantanal Sul-mato-grossense with action in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2012. year. Dissertação (Mestrado)/ - College of Veterinary Medicine and Animal Science , Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

The applications of chemical acaricide in a promiscuous and incorrect way result in the resistance of the tick population on the Brazilian cattle. The researches range of phytotherapy, are looking for a possibility to discover a new product to control the parasitism. This kind of study is extremely necessary in legitimizing plant extracts. Thus the aim of this study was to rate the in vitro acaricidal activity of plant extracts with medicinal potencial of the Cerrado of Pantanal sul-mato-grossense. In vitro tests allow of the pharmacological activities of plant extracts. In this study we analyzed twenty-four plants in the larval immersion test and five plants submitted to the immersion adult test. Of these twenty-four plants, eighteen plants showed acaricidal activity on non-parasitic stage of *Rhipicephalus Boophilus microplus* with efficiency superior than 95% at a concentration of 40%. The crude extract of *Tabebuia serratifolia* got better results then the others, *Sesbania virgata*, *Centratherum punctatum*, *Lantana canescens*, *Melanthera latifolia*, *Aeschynomene denticulata*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Crotalaria micans*, *Senna obtusifolia*, *Angelonia hirta*, *Diodia kuntzei*, *Sebastiania hispida*, *Croton glandulosus*, *Richardia grandiflora*, *Aspilia latíssima*, *Hippocratea volubilis*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata*, *Zanthoxylum rigidum*, *Hyptis mutabilis*, *Ocotea diospyrifolia*, *Tabebuia aurea* and *T. rósea* and, because of that was the most manipulated in this study. Were tested in female ticks (Adult immersion test) of *R. (B.) microplus*, five extracts and extract of fraction hexancia *T. serratifolia* performed in duplicate. The *T. serratifolia* got 96% of efficiency with the crude extract and 82% with hexane fraction compared with the negative control.

Keywords: acaricide; chromatography; phytotherapy; *Rhipicephalus Boophilus microplus*

SUMÁRIO

1.0.INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Histórico, posição taxonômica, hospedeiros e distribuição biogeográfica de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	10
1.2. Características biológicas, influência da temperatura e da umidade relativa na fase de vida livre de <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	11
1.3. Importância médico-veterinária e econômica do <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	12
1.4. Situação da resistência a carrapaticidas no Brasil.....	13
1.5. Outras formas de control.....	15
1.6. Fitoterapia.....	18
2.0. Objetivos.....	26
2.1. Objetivos específicos.....	26
REFERÊNCIAS.....	26
APÊNDICES.....	39
Capítulo I - ARTIGO I- Prospecção de compostos bioativos de 21 plantas nativas do Pantanal Sul-mato-grossense com ação sobre <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	41
Capítulo II - ARTIGO II- Determinação da ação acaricida de frações polares e apolares de extratos hidroalcoólicos de plantas do Pantanal Sul-matogrossense.....	70
Capítulo III - ARTIGO III- Ação <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia</i> spp. Nativas do Cerrado Sul-mato- grossense contra <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico, posição taxonômica, hospedeiros e distribuição biogeográfica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato bovino, pertencente à família Ixodidae, em 1821 foi reconhecido como *Ixodes annulatus*. O gênero *Boophilus* foi considerado sinônimo do gênero *Margaropus* em 1879 e, em 1891, Curtice propôs o nome *Boophilus* para a espécie *Ixodes annulatus*, que passou a ser denominada *Boophilus annulatus*. Posteriormente outras espécies foram sendo inseridas como *B. decoloratus* (Koch, 1844), *B. microplus* (Canestrini, 1887), *B. kohlsi* (Hoogstraal & Kaiser, 1960) e *B. geigy* (Aeschlimann & Morel, 1965). Em 1911, Aragão relatou a existência de seis gêneros dentre as espécies de ixodídeos brasileiros: *Argas*, *Ornithodoros*, *Rhipicephalus*, *Margaropus*, *Haemaphysalis* e *Amblyomma*. Originário da Ásia, o *R. (B.) microplus*, foi introduzido nos países tropicais e subtropicais por meio de importação de gado. A partir de 1936, o gênero *Boophilus* foi incluso dentre os gêneros de ixodídeos brasileiros, enfatizando o desafio em erradicar, controlar espécies não autóctones (Aragão, 1936).

Em 2001, após análise filogenética o gênero *Boophilus spp.* passou a ser considerado subgênero do gênero *Rhipicephalus* (Koch, 1844), o carrapato bovino passou a ser designado como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrel et al., 2001).

Atualmente a distribuição geográfica do *R. (B.) microplus* abrange a região pantropical, África, América Latina e Austrália (Estrada- Peña, 2006). Adaptado ao clima tropical e subtropical encontra no Brasil características necessárias para seu desenvolvimento praticamente durante todo o ano, com distribuição por quase todo o país e média de quatro gerações anuais (Pereira et al., 2008).

O *Rhipicephalus (B.) microplus* pode parasitar várias espécies animais, inclusive animais selvagens (Jongejan & Uilenber, 2004). No Brasil, em áreas e épocas em que há alta infestação tanto nas pastagens como nos bovinos e há coabitação de outras espécies domésticas e selvagens, essa infestação pode atingir outras espécies, ocasionalmente podem-se encontrar como hospedeiros ovelha, cavalo, cão, cabra, homem (Gonzales et al., 1974), veado pantaneiro (*Blastoceurus dichotomus*), onça pintada (*Panthera onca*) (Gloria et al., 1993) e veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) (Cançado et al., 2009).

Levando em consideração que a temperatura e a umidade estão intimamente ligadas com a variação populacional de carrapatos. É possível por meio de projeção, prever uma adaptação climática do centro da Argentina pelo *R. (B.) microplus* entre o

ano de 2025 e 2050, o que mudaria a distribuição atual deste parasito (Estrada-Peã et al., 2005).

1.2. Características biológicas, influência da temperatura e da umidade relativa na fase de vida livre de *R. (B.) microplus*

Para o combate ao carrapato bovino há a necessidade de informações relacionadas ao conhecimento da sua biologia bem como sua ecologia e epidemiologia, que compreendem os fatores mais importantes no desenvolvimento de métodos de controle (Seixas et al., 2010). O *R. (B.) microplus* é um ectoparasita monoxeno, com ciclo biológico dividido em fase parasitária e fase de vida livre. A fase parasitária ocorre sobre o hospedeiro e a fase de vida livre tem início quando a fêmea adulta ingurgitada cai ao solo (Silva, 1973; Gonzales et al., 1974). Ao soltar-se do hospedeiro, geralmente logo pela manhã, procura refúgio para postura em locais assombreados (Hitchcok, 1955b; Furlong, 2005). A fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* pode sobreviver e ovipor em ampla variação de umidade relativa do ar (URA) e temperatura, variando assim o tempo de sobrevivência e de oviposição (Hitchcok, 1955b).

A duração dos períodos pré-postura, postura e de incubação dos ovos são influenciados pela temperatura (Oliveira, 1974). Os ovos necessitam de temperatura e URA ideais. A larva é a fase mais sensível à exposição em baixas temperaturas, e dependentes da URA (Hitchcok, 1955b). Tanto no inverno como no verão, a temperatura é inversamente proporcional ao período pré-postura (Pereira et al., 2008). Na entrada da primavera, quando as fêmeas adultas são expostas ao microclima diferente a partir de setembro, demonstram diminuição no período pré-postura de forma gradual até a chegada do verão (Souza et al., 1988).

No primeiro dia após o início da postura a fêmea pode ovipor até 1.160 ovos a $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com uma média de 657,80 ovos diários (Glória et al., 1993) e podendo durar entre 17 e 90 dias (Gonzales, 1995). Em média, a quantidade de descendentes que uma fêmea de *R. (B.) microplus* pode produzir, é de 3.000 larvas (Balashov, 1972; Oliver, 1989).

O período de incubação dos ovos é influenciado pela temperatura e URA. Temperatura acima de 30°C constante eleva a mortalidade de fêmeas, ovos e larvas no ambiente, do mesmo modo que temperaturas menores que 15°C constantes. A URA interfere na duração das fases de desenvolvimento do carrapato e pode resultar em

morte das fêmeas e inviabilidade dos ovos quando abaixo de 80% constante (Pereira et al., 2008)

As larvas sofrem influência da temperatura para alcançar a extremidade da gramínea, subindo em horários de temperatura branda e formando grupamentos maiores de larvas no inverno do que no verão. (Furlong et al., 2002). Na região de cerrado no Centro-Oeste brasileiro, a URA é muito baixa entre junho e setembro, o que afeta consideravelmente o desenvolvimento da espécie (Furlong, 2005). Schenk et al. (1983), avaliaram os períodos de pré- postura (dias entre o desprendimento da fêmea do hospedeiro e o primeiro dia da postura), pré-eclosão (período entre o primeiro dia da postura e o da emergência da primeira larva) e longevidade larval (duração da vida das larvas) experimentalmente, durante o inverno seco e verão chuvoso de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. No período seco o índice pluviométrico foi de 91,2mm e temperatura média de 21,1° C, o período de pré-postura durou em média 8,6 dias, período de pré-eclosão de 52,3 dias e 56,3 dias de longevidade larval. Durante o verão, o período pré-postura foi de 6,1 dias, pré-eclosão 36,7 dias e a longevidade larval 42,4 dias, com índice pluviométrico de 215,8 mm e temperatura média de 24,4° C.

Ao atingirem o hospedeiro adequado, as larvas conseguem fixar-se em locais como região perineal, perianal, úbere, tábua do pescoço e face interna de coxas, iniciando a fase parasitária, alimentando- se e realizando as mudas (Lahille, 1905). A fase parasitária dura cerca de 20 (+/-1) dias pós infestação (Silva, 1973; Gonzales et al., 1974). A cada sete dias ocorre uma muda, de larva para ninfa, e de ninfa para adulto macho ou fêmea. A fêmea após a fertilização realiza o repasto sanguíneo até seu total ingurgitamento (Oliver, 1974). Em poucas horas a fêmea se distende ao máximo (Lahille, 1905). O macho pode copular com mais de uma fêmea, pois permanece no hospedeiro por mais tempo, até 43 dias pós infestação (Hitchcock, 1955a)

1.3. Importância médico-veterinária e econômica do *Rhipicephalus (B.) microplus*

Dentre todos os parasitas que acometem bovinos no país, *R.(B.) microplus* é o que mais causa prejuízo econômico (Grisi et al., 2002). Alguns fatores são limitantes à pecuária bovina, por meio da espoliação sanguínea pode haver transmissão de patógenos (Furlong, 2005), anemia, diminuição na resposta imune, supressão do apetite, diminuição no ganho de peso (Jonsson, 2006), danos ao couro que além de gerar depreciação, pode propiciar a fácil deposição de larvas causadoras de míases (Furlong,

2005). Isso ocorre principalmente em raças europeias de corte e leite (Gomes, 2000). O prejuízo inerente ao carrapato bovino é estimado em dois bilhões de dólares por ano. Com cerca de 80% do rebanho bovino brasileiro acometido pelo *R. (B.) microplus*, os gastos com o controle são cada vez maiores (Grisi et al., 2002).

O complexo definido como tristeza parasitária bovina, compreendido pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, juntamente com a rickettsia *Anaplasma marginale*, tem como vetor o *R. (B.) microplus*. A fêmea transmite *B. bovis* e *B. bigemina* aos ovos, os animais são infectados por larvas (*B. bovis*), ninfas e adultos (*B. bigemina*) (Pereira, 1937); quanto à rickettsia *A. marginale* a transmissão no carrapato ocorre de forma transestadial. O macho é uma peça importante na transmissão da anaplasmosose aos animais (Connel & Hall, 1972; Kessler, 2001), levando em conta o fato de permanecerem por mais tempo no hospedeiro, com a possibilidade de trocar de hospedeiro durante a vida (Hitchcock, 1955a).

O Brasil possui vários pontos favoráveis para a proliferação do carrapato bovino. Além do clima, o tamanho e os cruzamentos do rebanho brasileiro são fatores preponderantes (Grisi et al., 2002). As condições climáticas do estado de Mato Grosso do Sul bem como de todo o Centro-Oeste, com duas fases bem definidas, favorecem elevada população desta espécie de carrapato, o que aumenta de modo considerável os custos com mão-de-obra, aquisição de produtos eficazes e instalações no seu controle (Gomes, 2000).

1.4. Situação da resistência a carrapaticidas no Brasil

O método de controle atualmente utilizado contra o carrapato bovino é realizado pelo uso de produtos químicos acaricidas. Na maioria das vezes em que o controle com uso exclusivo de produtos químicos é preconizado, não se dá devida importância à epidemiologia deste parasito, estratégia de uso, ou ainda orientação de um médico veterinário. É um hábito comum dos produtores realizarem trocas periódicas dos produtos acaricidas utilizados na propriedade, relatando ineficácia do produto anteriormente utilizado, entretanto a utilização deste produto nem sempre realizada de forma adequada (Furlong et al., 2007).

Os primeiros produtos utilizados como carrapaticidas eram solubilizados em óleo mineral e muitos animais sofreram intoxicação e vieram a óbito. Em 1896, passou-se a utilizar o arsênio solubilizado em água como carrapaticida (Furlong, 2005). Os arseniacais foram utilizados por aproximadamente 40 anos, geralmente em banhos de

imersão com intervalos de 14 dias, em períodos de seis a doze meses (Wharton & Rouston, 1970). No Brasil, relatos de resistência aos arseniacais surgiram em 1948 (Nolan et al., 1977).

O Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), considerado o primeiro pesticida moderno, foi lançado em 1946 e em 1955 já havia relato de resistência (Wharton & Rouston, 1970). Então surgiram novos compostos, os clorados, os carbamatos e os organofosforados, com os primeiros relatos de resistência em 1980, quando os piretróides passaram a ser utilizados. Porém em 1980 surgiram os primeiros relatos de resistência aos piretróides no Brasil (Nolan et al., 1977).

As lactonas macrocíclicas, endectocidas derivados do fungo *Streptomyces avermitiles*, surgiram nos anos 80 e, 20 anos mais tarde o primeiro relato de resistência a ivermectina e moxidectina foi relatado no Rio Grande do Sul, Brasil, por Martins & Furlong, e em 2010 a resistência a ivermectina foi relatada no estado de São Paulo (Klafke et al., 2010).

O fipronil tem ação no sistema nervoso de carrapatos, semelhante as avermectinas e o fluazuron, é um inibidor de crescimento capaz de interferir na produção de quitina, diferente dos demais acaricidas. Ambos ainda não possuem relatos de resistência no Brasil (Andreotti, 2010), enquanto que no Uruguai foram testadas 27 populações de carrapatos por meio do teste de imersão larval (TIL), e seis destas populações foram resistentes ao fipronil (Castro-Janer et al., 2011).

Rocha et al (2006) entrevistaram 25 produtores de leite da cooperativa do município de Passos, Minas Gerais e observaram que apenas 24% seguem a concentração recomendada pelo fabricante e 80% dos produtores ainda utilizam a bomba costal ao aplicar o acaricida nos animais, e muitas vezes, a utilização deste equipamento resulta em má aplicação do produto nos animais, tornando-se inviável quando o rebanho é muito grande. As trocas de produtos químicos são realizadas sem qualquer critério técnico e sem considerar as bases farmacológicas. A má diluição do acaricida, quantidade e aplicação de calda por animal inadequada ou insuficiente, instalações irregulares; tudo isso caracteriza falha no manejo empregado, fator preponderante que pode estar resultando no surgimento da resistência na população de carrapatos (Furlong & Martins, 2000).

Por causa dos relatos atuais de resistência a carrapaticidas, Gomes et al. (2011) avaliaram em Mato Grosso do Sul, a suscetibilidade do *R. microplus* por meio do teste de imersão de adultos a 12 produtos acaricidas comerciais, dentre os quais, apenas duas

associações apresentaram eficácia média superior a 95%. A resistência ficou caracterizada como um problema evidente com carência de recomendações técnicas que possam ser utilizadas no controle da infestação por carrapatos.

A utilização sistemática de acaricidas químicos além de selecionar parasitas resistentes contribui para o aparecimento de resíduos no leite, na carne e no meio ambiente. As restrições quanto ao uso desse tipo de produto tem urgência de tecnologias alternativas que sejam viáveis, técnica e economicamente, envolvendo tanto a saúde animal como a saúde pública (Bianchin et al., 2008).

1.5. Outras formas de controle

Em consequência da resistência aos acaricidas químicos no rebanho bovino brasileiro, cada vez mais surgem estudos com intuito de viabilizar um novo produto para o controle do parasitismo, na tentativa de prolongar a vida útil e ou reduzir o uso de carrapaticidas que ainda possuam alguma eficácia. Nessa busca pelo controle do carrapato bovino estão pesquisas que envolvem controle biológico com fungos e bactérias, controle imunológico com o desenvolvimento de vacinas por meio de biologia molecular, e controle por meio de compostos naturais com atividade acaricida (Vaz Jr. et al., 2012).

A vacina, método de controle imunológico, pode mimetizar a resistência adquirida ou produzir uma resposta imunitária induzida. Utilizando-se um antígeno da glândula salivar do *R. (B.) microplus*, conhecida pelo hospedeiro, pode-se mimetizar a resistência adquirida, diferentemente no caso da utilização de uma glicoproteína associada à microvilosidades da membrana epitelial do intestino desta espécie de carrapatos, denominada de antígeno oculto, pode-se produzir uma resposta imunitária induzida (Petter & Brossard, 1998).

O primeiro antígeno utilizado em uma formulação vacinal foi uma glicoproteína de membrana do intestino do *R. (B.) microplus*, a Bm86 expressa na levedura *Pichia pastoris*, originando a primeira vacina anti-carrapato, TickGuard ®. As pesquisas iniciaram em 1981, a vacina foi registrada e somente em 1994 passou a ser comercializada; TickGuard ® na Austrália e Gavac ® em Cuba (Willadsen et al., 1995).

Algumas enzimas do *R. (B.) microplus* são envolvidas no processo de degradação de vitelina e que podem ser utilizadas como antígenos na produção de vacinas. São elas: VTDC (vitellin de grading Cysteine-endopeptidase), BYC (*Boophilus* Yolk pró-catepsin) e THAP (Tick heme Binding Aspartic Proteinase), em larvas a

enzima é a RmLCE (*R. microplus* larvae Cysteine-endopeptidase). Enquanto a glicoproteína Bm86 ocasiona danos ao trato digestivo do carrapato, quando se utiliza a BYC isso não ocorre, no entanto a eclosão de larvas é afetada. São possíveis candidatas a uma vacina melhorada, multigênica com ação eficaz contra *R. (B.) microplus* (Willadsen, 2004).

O controle imunológico requer o conhecimento de receptores celulares específicos do carrapato. Da aplicação da vacina até o intestino do carrapato, o antígeno pode sofrer modificações durante o processo digestivo (Kocan, 1995). A respeito disso o Brasil tem evoluído no âmbito da pesquisa dos aspectos biológicos do *R. (B.) microplus* por meio da identificação de proteínas e expressão de genes, uma necessidade quando se fala na utilização do controle biológico e imunológico (Vaz Jr. et al., 2012).

Quando lançada no Brasil a Bm86 sofreu alguns problemas devido à baixa eficácia atingida na imunização de bovinos (Willadsen, 2004). A Bm86 não ocasiona a queda das fêmeas de forma significativa, somente apresenta diferença no peso da massa de ovos e ingurgitamento (Kumar et al., 2012). A busca por antígenos vacinais que sejam eficazes no controle de carrapatos e até mesmo de outros parasitos é um desafio. Há um grande caminho a ser percorrido até que esse tipo de método possa ser empregado em larga escala entre raças, condições de produção e diversas localidades (Willadsen, 2004). Desde o lançamento da TickGuard® não foi desenvolvida ainda uma segunda geração capaz de produzir imunização eficaz (Guerreiro et al., 2012).

A vacina sintética SBm7462 possui três epítopos derivados da proteína Bm86 conservados em populações Sul-americanas de *R. (B.) microplus*. Essa informação é de extrema importância para uma imunização eficiente em diferentes populações de carrapatos da mesma espécie, pois a respostas imunológica de cada população poderá ser diferente (Peconik et al., 2008).

Outra enzima com potencial vacinal é a VTDCE, uma enzima muito importante para o *R. (B.) microplus* por abranger intimamente a embriogênese. Em experimento com bovinos a VTDCE foi capaz de desenvolver nos animais uma memória imunológica. Houve redução no peso das teleóginas e no peso dos ovos. Este tipo de trabalho experimental é oneroso, há uma variação individual entre hospedeiros e falta de significância estatística (Oldiges et al., 2012). Após a passagem dos anticorpos do hospedeiro pelo intestino do carrapato, poucos anticorpos serão viáveis, isso confere uma eficácia deficiente à vacina (Willadsen, 2004). Presume-se que a VTDCE tenha ação antimicrobiana e enzimática, ou seja, age na defesa do organismo do *R. (B.)*

microplus e no processo nutricional do embrião. Informações estas que são válidas na construção de uma vacina (Oldiges et al., 2012).

Hoje o custo por dose da vacina é considerado alto. A tecnologia necessita de simplificação e para isto esquemas de purificação tanto para rBm86 e rBm95 em *Pichia pastoris* podem ser modificados e assim diminuir o valor de produção atual (Canales et al., 2010).

Outro método de controle é a utilização de fungos entomopatogênicos como acaricidas biológicos. Estes fungos ocorrem naturalmente no ambiente e são sensíveis quanto a coeficientes climáticos (Bahense et al., 2007). De acordo com Kaaya & Hassan (2000) os fungos podem ser utilizados por meio de pulverização na vegetação, garantindo que os animais tenham uma menor infestação na geração seguinte e reduzindo a prática com químicos carrapaticidas. Provavelmente os fungos não obteriam o mesmo sucesso quando o alvo fosse carrapatos adultos.

Utilizando uma suspensão de conídios de *Beauveria bassiana* em trinta isolados de *R. (B.) microplus* na fase larval, Barci et al. (2009) obtiveram em sete isolados eficácia entre 90 e 99%. *Metarhizium anisopliae* testado em diferentes fazes parasitárias de *R. (B.) microplus*, até o décimo sétimo dia pós-infestação ninfas e adultos foram susceptíveis na mesma proporção, enquanto larvas foram bem mais sensíveis (Bahense et al., 2007). Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são bastante estudados no controle de carrapatos. Possuem capacidade de reduzir os níveis populacionais das proles seguintes. Muito embora ainda necessite de estudos na segurança clínica em sua aplicação (Fernandes-Salas et al., 2012). Com a utilização de uma suspensão de conídios em óleo mineral do fungo *Lecanicillium lecanii* houve uma diminuição no período de postura de forma significativa. Com exceção de uma fêmea, todas as outras vieram a óbito antes de da oviposição (Angelo et al., 2010). O composto actinobacterial marinho (2S, 5R, 6R)-2-hidroxi-3,5,6-trimethyloctan-4-ona extraído e isolado a partir de *Streptomyces sp.* VITDDK3 foi testado contra larvas de *R. (B.) microplus*, *Anopheles subpictus* e *Culex quinquefasciatus*, esse novo composto demonstrou atividade acaricida e larvicida promissora (Deepika et al., 2012).

Muitas dúvidas ainda pairam sob a utilização de fungos entomopatogênicos como acaricida no controle biológico de carrapato bovino. O emprego destes fungos *in vivo*, necessita ainda de pesquisas quanto ao veículo a ser utilizado como adjuvante (Polar et al., 2005), pois estes fungos sofreriam com o estresse ambiental e a incidência direta de raios solares (Rangel et al., 2004). Além disso, ainda existem muitas suspeitas

a serem esclarecidas sobre a patogenicidade dos fungos (Polar et al., 2005), seriam patogênicos se extrapolados ao meio ambiente, ou isso só ocorre *in vitro*? De acordo com Angelo et al. (2010), mesmo *in vitro* é necessário uma grande concentração de conídios para atingir as fêmeas ingurgitadas. A utilização de fungos em condições de laboratório difere completamente do seu emprego nas condições encontradas no campo. Essa já é uma questão comprovada para o fungo *M. anisopliae*. Quando utilizado em suspensão de conídios, obteve sucesso nas condições de laboratório, enquanto que a campo isso não se repetiu (Ojeda-Chi et al., 2010).

1.6. Fitoterapia

1.6.1. Histórico da Fitoterapia

A utilização terapêutica de plantas existe desde a antiguidade, Hipócrates utilizava plantas ao tratar seus pacientes e sua obra, Corpus Hippocraticum, no que se refere ao uso de drogas de origem vegetal (Almassy Júnior et al. 2005).

A fitoterapia é uma linha de pesquisa que utiliza ferramentas analíticas na caracterização do material de estudo, as plantas. Os fitoterápicos são medicamentos derivados exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais (RDC nº14, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os fitoterápicos são preparados com substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total.

Índia, China e Coréia estimularam a interação universidade-indústria na área de desenvolvimento de medicamentos (Calixto, 2003). No Brasil foi criado no ano de 2006 o Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico, com o intuito de garantir à população, o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (Brasil, 2006).

Simões & Schenkel (2002) consideram o uso de fitoterápicos promissor, mas há a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre a diversidade de plantas em todos os aspectos.

1.6.2. Importância

Em busca de novas abordagens para o controle de carrapatos por causa da instalação da característica da resistência aos produtos utilizados atualmente, bem como reduzir os prejuízos diretos e indiretos causados por sua infestação, as pesquisas com recursos naturais como extratos de plantas tornam-se uma importante ferramenta como

alternativa a pecuária bovina. Por meio de metodologias adequadas aliadas ao uso de fitoterápicos, novas formulações farmacêuticas poderão ser promovidas (Marinho et al., 2007).

A comprovação científica do uso de fitoterápicos é extremamente relevante e necessária mediante a diversidade de plantas que possuem os biomas brasileiros. São poucos os estudos conduzidos no estado de Mato Grosso do Sul, especialmente na região do pantanal, referente à catalogação e caracterização de espécies com potencial interesse farmacêutico (Neto & Moraes, 2003).

Este tipo de pesquisas com produtos naturais fazem parte de uma área em crescimento constante e de extrema relevância e vêm buscando cada vez mais a possibilidade de uma formulação que possa vir a ser distribuída comercialmente de forma segura e eficiente (Chagas et al., 2011; Chagas et al., 2012)

Assim, uma formulação comercial baseada em agentes naturais deve ser desenvolvida em conjunto por químicos, farmacêuticos e veterinários e antes de constituir uma formulação comercial, os extratos naturais bem como seus compostos ativos isolados, necessitam de verificação quanto à segurança clínica (Xie et al., 2012).

1.6.3. Metodologia de extração

Os fitoterápicos podem ser preparados a partir de extratos brutos de plantas, que compreendem os metabólitos secundários das plantas (Klein et al., 2009), ou seja, compostos orgânicos com funções ecológicas nas plantas como proteção e atrativos para polinizadores, os metabólitos secundários podem ser divididos em terpenos, compostos fenólicos e os alcalóides, componentes contendo nitrogênio (Croteau et al., 2000; Shahidi & Naczki, 2003). Os fitoterápicos podem ser produzidos também por frações isoladas obtidas por meio destes extratos brutos (Klein et al., 2009) e por meio de processos fitoquímicos é possível identificar estas substâncias bioativas dos extratos naturais, até mesmo isolar cada constituinte. Esses processos químicos garantem eficiência de forma segura (Han et al., 2007), são testes de triagem, qualitativos ou semiquantitativos, que utilizam reagentes de detecção específicos para evidenciar a presença de grupos funcionais característicos na matéria - prima vegetal e que auxiliam na identificação da espécie vegetal e a diferenciação de outras espécies (RDC nº14, 2010).

Basicamente a extração de compostos bioativos de plantas segue um mesmo padrão: coleta de matéria-prima, identificação botânica, secagem, congelamento,

liofilização, processo de extração, análise cromatográfica, isolamentos de compostos ativos, purificação, fracionamento, e avaliação da toxicidade (Sahoo et al., 2010).

Para obtenção do extrato hidro alcoólico podem ser utilizadas várias metodologias, mas a mais comumente utilizada para a análise químico-farmacológica é realizada com 50% de água e 50% de etanol (Cechinel Filho, 1998). O etanol a 70 % é muito utilizado em percolações, é o um solvente utilizado na extração de uma ampla variedade de compostos (Quan & Turner, 2009). Com este extrato bruto são realizados testes biológicos e caso haja atividade positiva, o solvente a ser utilizado é o metanol, pois este permite a extração de mais compostos. Posteriormente é realizada uma partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes com a finalidade de uma semi-purificação das substâncias por meio das polaridades dos solventes utilizados. As frações obtidas nesta semi-purificação devem ser utilizados em testes biológicos e caso haja atividade positiva deverá passar por procedimentos cromatográficos com o intuito de isolar e purificar os compostos (Cechinel Filho, 1998).

1.6.4. Plantas

Uma planta pode apresentar mais de um composto bioativo. Esses compostos podem ter atividade separada ou em associação (Ribeiro et al., 2011). De uma mesma planta, os compostos extraídos e a sua ação podem variar conforme disponibilidade nas diferentes partes dessa planta (Pivoto et al., 2010), como em caules e folhas (Ribeiro et al., 2011), sementes (Giglioti et al, 2011), metabólitos secundários extraídos das plantas (D'Alessandro, 2008; Ribeiro et al., 2011). Alguns compostos em pequenas proporções podem impedir a atividade de outros compostos bioativos, apresentar sinergismo com substâncias que sozinhas não produziram atividade, ou até mesmo ser a fração mais eficaz (Pontes et al., 2007).

As características químicas destes constituintes variam entre diferentes espécies. Os mesmos extratos de plantas podem variar dependendo da colheita, da origem vegetal, do processo de secagem e de outros fatores como partes da planta a serem utilizadas. Por meio de técnicas utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) pode-se analisar o perfil de extratos de plantas, identificar e avaliar a composição química das mesmas (Alves, 2005).

De acordo com Han et al. (2007) os processos fitoquímicos tais como extração, fracionamento químico, separação, isolamento, elucidação estrutural de produtos naturais, valendo-se de técnicas cromatográficas, forneceriam uma direção aos estudos

com extratos vegetais. Esses processos poderiam direcionar o estudo com extrato hidroalcoólico de *Cassia alata* (Fedegoso gigante), planta pertencente à família Fabaceae, que foi capaz de causar mortalidade em carrapatos da espécie *Rhipicephalus anulatus* em teste de imersão de adulto, entretanto ainda não possui ativos acaricidas identificados (Ravindran et al., 2012). Assim como o óleo essencial de *Drimys brasiliensis* conhecido popularmente no Mato Grosso do Sul como casca d'anta, possui ação acaricida mesmo nas doses mais baixas e ainda necessita de estudos com os compostos isolados (Ribeiro et al., 2008b).

Dentre as famílias de plantas já estudadas quanto atividade acaricida sobre *R. microplus* estão: Annonaceae (Broglio-Micheletti et al., 2009), Asteraceae (Ribeiro et al., 2008a), Acanthaceae (Kamaraj et al., 2010), Amaranthaceae e Euphorbiaceae (Zahir et al., 2009), Anacardiaceae (Srivastava et al., 2008), Clusiaceae (Ribeiro et al., 2007), Caesalpiniaceae e Combretaceae (Kamaraj et al., 2010), Lamiaceae (Facey et al., 2005; Zahir et al., 2009), Lauraceae (Álvarez et al., 2008), Leguminosae (Pereira; Famadas, 2004; Magadum et al., 2009), Liliaceae (Magadum et al., 2009; Zahir et al., 2009), Meliaceae (Chagas et al., 2002; Magadum et al., 2009), Moraceae (Williams, 1993), Piperaceae (Silva et al., 2009; Ferraz et al., 2010; Álvarez et al., 2008), Phytolaccaceae (Rosado-Aguilar et al., 2010), Poaceae (Hernández et al., 1989; Martins, 2006), Rosaceae (Srivastava et al., 2008), Rutaceae (Chungsamarnyart; Jansawan, 1996), Solanaceae (Zahir et al., 2009; Olivo et al., 2008), Verbenaceae (Kamaraj et al., 2010), Winteraceae (Ribeiro et al., 2008b).

As duas espécies mais estudadas *Melia azedarach* (Cinamomo) (Borges et al., 1994, 2003; Vivan, 2005; Sousa et al., 2008) e *Azadirachta indica* (neem) (Williams, 1993; Valente et al., 2007; Srivastava et al., 2008; Costa et al., 2008; Magadum et al., 2009; Broglio-Micheletti et al., 2009, 2010) pertencem à ordem Salpindales, família Meliaceae que por sua vez possui cinco gêneros e é possível que outras espécies desta família sigam o mesmo perfil químico (Cronquist, 1988).

A utilização de fitoterápicos no controle de carrapatos é um grande desafio, no entanto com a diversidade de plantas existentes no país, implica ser uma alternativa possível.

O Pantanal Sul-mato-grossense está localizado na bacia do Rio Paraguai que também engloba o estado de Mato Grosso, a Bolívia e o Paraguai. Constitui um bioma rico e diversificado, com espécies de plantas comuns para todos os limites e espécies que se restringem a determinadas áreas. No Pantanal pode-se encontrar de área de

pântano, floresta semi-decídua, cerrado, chaco e savana (Prance & Schaller, 1982). Estudos relacionados ao conhecimento de plantas medicinais e sua utilização, bem como um levantamento destas plantas, tem sido empregado pela comunidade científica em locais como Pantanal Sul-mato-grossense (Prance & Schaller, 1982), Mato Grosso (Neto & Moraes, 2003), Paraíba (Marinho et al., 2007), dentre muitos outros. Com um bioma vegetal tão diversificado, a associação entre recursos naturais e planos de controle sanitário, torna-se uma alternativa ao uso de produtos químicos (Neto & Moraes, 2003).

1.6.5. Métodos de identificação de compostos presentes nas plantas

Geralmente o extrato bruto ou o óleo essencial é mais ativo do que o composto isolado a partir destes. Um exemplo disso é o óleo essencial de *Calea serrata*, que é mais ativo em comparação ao composto isolado Prococeno II da mesma planta (Ribeiro et al., 2011). Assim como o extrato bruto pode ser mais ativo do que o composto isolado, também podem existir diferentes níveis de atividade entre as diferentes partes da planta, ter ou não o composto ativo, como no caso da *Simarouba versicolor* com substância acaricida ativa na raiz da planta enquanto nas flores e folhas essa substância é inexistente (Catto et al., 2009).

Quando o extrato bruto é semi-purificado utilizando solventes de polaridade crescentes como hexano, diclorometano, metanol, acetona, acetato de etila e butanol, os respectivos extratos obtidos possuem possíveis constituintes de acordo com a polaridade do solvente (Cechinel Filho, 1998). No extrato hexano podem ser encontradas substâncias como esteroides terpenos e acetofenonas, substâncias altamente lipofílicas. No extrato de diclorometano podem ser encontradas substâncias como ligninas, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos, cumarinas e alcalóides na forma livre, substâncias lipofílicas. Nos extratos metanol e acetona ocorre extração de agliconas, ceras, saponinas, iridóides e sesquiterpenos, substâncias miscíveis com água. No extrato acetato de etila podem ser encontradas substâncias como taninos, xantonas, ácidos triterpenos, iridóides, saponinas e compostos fenólicos em geral. No extrato de butanol podem ser encontradas substâncias como flavonoides glicolisados, taninos, saponinas e carboidratos (Cechinel Filho, 1998; Sonaglio et al., 2010).

A oscilação de composição, disponibilidade e localização das substâncias químicas das plantas, relatada por Pivoto et al. (2010) com relação às partes das plantas utilizadas por ele, bem como a época de colheita e estágio de desenvolvimento, as

espécies de um mesmo gênero também podem apresentar composição química diferente, como o gênero *Tabebuia*, pertencente à família Bignonaceae e compreende várias espécies de *Tabebuia* (Soares et al., 2006). A *Tabebuia caraiba* é uma espécie arbórea conhecida como ipê e possui dentre seus compostos químicos os triterpenos e os iridóides. Investigando quimicamente a casca do caule, folhas e cerne da *T. aurea*, outra espécie do gênero *Tabebuia*, foram isoladas além das substâncias triterpenos e iridoides, também substâncias esteroides e flavonoides (Guerbas Neto, 2003).

Após a realização de testes biológicos o extrato selecionado é submetido à técnica de cromatografia em coluna aberta com sílica gel, novamente as frações são avaliadas por meio de cromatografia de camada delgada. O Isolamento dos compostos bioativos acontece após esta fase, quando as frações são analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação e quantificação desses compostos ocorrem com a utilização da cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa e a identificação da estrutura molecular das substâncias naturais ocorre por meio do uso da ressonância magnética (Cechinel Filho, 1998).

O timol, um monoterpeno presente em diversas plantas, é outra substância ativa. Dissolvido em etanol e água possui atividade acaricida contra *R. sanguineus* e *Dermacentor nitens* (Daemon et al., 2012). Sua utilização em testes *in vivo* depende de diluentes que possam manter o composto estável fazendo com que haja menos volatilização da substância ativa (Oliveira et al., 2010). Os taninos são compostos abundantes nas plantas *Acacia pennatula*, *Piscidia piscipula*, *Leucaena leucocephala* e *Lysiloma latisiliquum*. Fernández-Salas et al. (2011), acreditam que essa substância seja o principal motivo do efeito acaricida que essas plantas apresentam.

Outras substâncias ativas são os ginsenosídeos, que fazem parte de uma classe de terpenos saponinas encontradas em plantas do gênero *Panax*. A raiz das plantas desse gênero é a parte mais utilizada por conter saponinas. A partir do extrato de *Panax ginseng*, *P. quinquefolium* e *P. notoginseng*, novos compostos ativos foram descobertos recentemente, e futuramente estudos fitoquímicos destes compostos ginsenosídeos deverão ser realizados (Yang et al., 2012).

1.6.6. Testes acaricidas

Os testes *in vitro* permitem uma avaliação preliminar sobre as atividades acaricidas de extratos vegetais, constituindo-se no primeiro passo para a caracterização de compostos ativos presentes nas plantas (Costa et al., 2002).

O teste de imersão larval é um teste *in vitro* utilizado na detecção de resistência a acaricidas químicos e que também pode ser empregado no teste de eficácia de fitoterápicos. Fiori et al. (2011), avaliaram a ação da planta *Tagetes minuta* a partir do teste *in vitro* de imersão larval. Com o intuito de avaliar qual fração da *T. minuta* seria mais eficaz, quatro frações foram utilizadas no teste, óleo essencial, infusão aquosa, tintura simples e tintura concentrada. O óleo essencial de *T. minuta* foi superior a todas as diferentes frações avaliadas, seguida pela tintura concentrada.

Outro teste *in vitro* utilizado na avaliação de fitoterápicos é o teste de imersão de adultos (Drummond et al., 1973). Este teste engloba a detecção de resistência acaricida e tem sido amplamente empregado nos últimos anos em teste de eficácia com fitoterápicos.

1.6.7. Avanços na utilização de fitoterápicos

As pesquisas com produtos naturais fazem parte de uma área em crescimento constante e de extrema relevância e vem garantindo um avanço significativo na descoberta de novos ativos (Newman & Cragg, 2012). Um levantamento dos registros da Agência de Proteção Ambiental entre 1997-2010 apontam os compostos naturais como fonte de produtos químicos utilizados atualmente, por meio de alguma ligação com um produto natural específico ou ainda um subproduto isolado. Por isso os compostos naturais são de fundamental importância na legitimação de pesticidas, fungicidas e parasiticidas (Cantrell et al., 2012).

Dentre as plantas já estudadas e que obtiveram sucesso sobre *R. (B.) microplus* destacam-se *Calea serrata*, foi tóxica para larvas nas concentrações de 50 mg / mL, 25 mg / mL, 12,5 mg / mL, e 6,25 mg / mL (Ribeiro et al. 2008^a), com eficácia superior a 95%, utilizando o Preconeno II isolado do óleo essencial da planta, na concentração de 2,5 mg / mL (Ribeiro et al 2011), *Piper aduncum*, na concentração 0,1 mg / mL⁻¹ apresentou 100% de mortalidade de larvas (Silva et al. 2009), *Drimys brasiliensis* tóxico para larvas em todas as concentrações analisadas 25, 12,5 e 6,25 microl / mL (Ribeiro et al. 2008^b), São muitos os estudos que demonstram a eficácia de extratos vegetais em isolados resistentes a organofosforados, amidinas e piretroides. Rosado-Aguilar et al. (2010) por meio de extrato bruto geraram partições a fim de avaliar o perfil metabólico de extratos. A fração hexânica obteve maior eficácia contra larvas de *R. (B.) microplus*, com esse resultado e levando em consideração a utilização de

solventes de polaridade crescente na coluna cromatográfica, foi possível identificar que a ação carrapaticida está presente entre os compostos apolares da planta.

Algumas substâncias são insolúveis em água. O emprego de solventes ou até mesmo surfactantes faz parte da busca por novas substâncias ativas. O uso de diluentes é ajustado à polaridade de determinada planta, ou da parte da planta a ser utilizada; o diluente não deve interferir na eficácia dos compostos e deve contribuir para que o extrato expresse a real ação acaricida (Resende et al., 2012). O adjuvante deve ser adequado às substâncias bioativas, com o intuito de produzir uma fórmula estável (Chagas et al., 2012).

O diluente utilizado na solubilização do extrato tem importância significativa. Em se tratando de óleo essencial, a utilização de um solvente aumenta sua superfície de ação quando convertido em concentrado emulsionável (Chagas et al., 2002; Silva et al., 2008). Uma vez que pode potencializar a eficácia do extrato ou não (Pivoto et al., 2010). Os solventes de baixo peso molecular e com pouca viscosidade são preferíveis para os testes de imersão. Em concentração abaixo de 76% álcool metílico, etílico, acetona, Dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila, xilol com pesos moleculares de 32,04 até 106,16 e triton na concentração máxima de 0,05% podem ser utilizados (Chagas et al., 2012).

Castro et al. (2010), avaliaram a eficácia de extratos hidro alcoólicos de espécies de plantas medicinais utilizadas por produtores familiares no controle de parasitos. Sete espécies foram avaliadas quanto à eficácia no controle do carrapato-do-boi utilizando a técnica *in vitro* de imersão de adultos. Das sete plantas testadas quatro apresentaram substâncias com atividade parcial no controle do *R. (B.) microplus*, *Enterolobium contortisiliquum* (Orelha-de-macaco), *Senna rugosa* (Boi gordo), *Calotropis procera* (Flor-de-seda) e *Araucaria angustifolia* (Pinheiro-do-Paraná), necessitando ainda, assim como no trabalho de Tavares et al. (2010), avaliando a eficácia carrapaticida da *Melia azedarach* em *R. (B.) microplus* e *Anocentor nitens*; necessidade da continuidade na avaliação destas espécies vegetais, com fracionamento, caracterização do perfil fitoquímico e isolamento de substâncias, visando obter melhores resultados de eficácia.

Alguns trabalhos como o de Broglio-Micheletti et al. (2010) obtiveram resultado significativo pesquisando a ação do extrato da semente de neem (*A. indica*) (extrato hexano) e óleo emulsionável de neem em fêmeas ingurgitadas utilizando o teste de imersão. Houve interferência na reprodução das fêmeas caracterizando eficácia no controle de *R. (B.) microplus* e uma alternativa aos produtos químicos normalmente

utilizados. Bisen et al. (2011) analisaram a eficácia de óleo e extrato metanólico de neem (*Azadirachta indica*) e óleo e extrato metanólico de karanj (*Pongamia glabra*), uma mistura de óleo de neem e óleo de karanj e uma mix de extrato metanólico de neem e karanj. O resultado destas experiências foi de grande eficácia para o óleo e extrato metanólico de folhas de karanj quando utilizado sozinho, bem como para a associação de neem e karanj em comparação ao óleo ou extrato de neem utilizados em separado, supostamente um mecanismo sinérgico poderá estar envolvido.

2.0.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade acaricida *in vitro* e caracterizar quimicamente extratos de plantas com potencial medicinal do Cerrado e Pantanal Sul-mato-grossense.

2.2. Objetivos específicos

Capítulo I - Avaliar atividade acaricida *in vitro*, de 21 espécies do Banco de extratos de espécies vegetais da UFMS oriundas do Pantanal Sul-mato-grossense, sobre larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Capítulo II - Determinar a ação acaricida de frações polares e apolares de plantas do Pantanal Sul-mato-grossense.

Capítulo III - Avaliar a atividade acaricida *in vitro* de *Tabebuia aurea*, *T. serratifolia* e *T. rosea* pertencentes ao Cerrado Sul- mato-grossense, contra larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, além do fracionamento e caracterização química da fração ativa.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ. V., LOAIZA. J., BONILLA. R., BARRIOS. M. Control in vitro de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Revista de Biología Tropical, v. 56, n. 1, p. 291-302, 2008.

ALVES. F. N. R. Desafio para inovação de fitomedicamentos no contexto da indústria farmacêutica nacional. Revista Fito, 1: 18-29, 2005.

ALMASSY JÚNIOR. A., LOPES. R. C., ARMOND. C., SILVA. F., CASALI. V. W. D. Folhas de Chá – plantas medicinais na Terapêutica Humana. UFV: Viçosa, 2005.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36 p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, 180). Disponível em: < <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC180.pdf> >. Acesso em: 12 maio 2012.

ANGELO. I. C. Fernandes. E. K. K. Bahiense. T. C. Perinotto. W. M. S. Moraes. A. P. R. Terra A. L. M. Bittencourt. E. B. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology 172, 317–322, 2010.

ARAGÃO H. Notas sobre ixódidas brasileiros. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 3: 145-195. 1911.

ARAGÃO H. Ixodidas Brasileiros e de alguns países limitrophes. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 31 : 759-843. 1936.

BACIENSE. T. C. FERNANDES. E. K. K. ANGELO. I. C. PERINOTTO. W. M. BITTENCOURT. V. R. E. P. Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 16, 4, 243-245, 2007.

BALASHOV. Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea). Vectors of diseases of man and animals. Entomological Society da América, v. 8, p. 160-376, 1972.

BARCI. L. A. G. ALMEIDA. J. E. M. NOGUEIRA. A. H. C. ZAPPELINI. L. O. PRADO. A. P. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 7-13, dez. 2009.

BIANCHIN. I, CATTO, J. B. Epidemiology and alternatives for control of helminths in beef cattle in the central region of Brazil. XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Embrapa Gado de Corte, Caixa Postal 154, Campo Grande, MS, 79002-970, Brasil.

BISEN, S. MANDAL, S.C. SANYAL, P.K. PAL, S. GHOSH. R. C. AND SINGH, M. Effect of some phytotherapeutic agents on egg production of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Indian journal of animal research. 45 (4) : 289 - 294, 2011.

BORGES, L. M. F.; SILVA, A. C.; NEVES, B. P. Teste “*in vitro*” de eficácia do cinamomo (*Melia azedarach*, L) sobre fêmeas ingurgitadas do *Boophilus microplus*, Can. (Acari: Ixodidae). Revista de Patologia Tropical, v. 23, n. 2, p. 175-179, 1994.

BORGES, L. M. F. FERRI, P. H. SILVA, W. J. SILVA, J. G. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. Medical and Veterinary Entomology, v. 17, n. 2, p. 228-231, 2003.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. VALENTE, E. C. N. SOUZA, L. A. DIAS, N. S. ARAÚJO, A. M. N. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 18, n. 4, p. 44-48, 2009.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F., ET AL. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 46-50, jan.-mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2006.

CANALES, M. MORENO-CIDA, J. A. ALMAZÁN, C. VILLAR, M. DE LA FUENTE, J. Bioprocess design and economics of recombinant BM86/BM95 antigen production for anti-tick vaccines. Biochemical Engineering Journal 52, 79–90. 2010.

CALIXTO, J. B., Biodiversidade como fonte de medicamento. Ciência e Cultura. v. 55 n.3. São Paulo. 2003

CANÇADO, P. ZUCCO, C. A. PIRANDA, E. M. FACCINI, J. L. H. MOURÃO, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) and cattle in Brazil's Central Pantanal. Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria, v. 18, n. 1, p. 42-46, JAN 2009.

CANTRELL, C. L. DAYAN, F. E. & DUKE, S. O. Natural Products as Sources for New Pesticides. Journal of Natural Products. 2012, 75, 1231–1242

CASTRO, K. N. C. ISHIKAWA, M. M. CAMPOLIN, A. I. CATTO, J. B. PEREIRA, Z. V. CARDOSO, C. A. L. CASTRO, M. M. SILVA, V. C. Prospecção de plantas medicinais para controle do carrapato dos bovinos em Mato Grosso do Sul. VI Congresso nordestino de produção animal. Mossoró, RN, 2010.

CASTRO-JANER, E., RIFRANA, L., GONZÁLEZA, P., NIELL, C., PIAGGIOC, J., GILC, A., SCHUMAKER, T. T. S. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. Veterinary Parasitology 178, 148–155, 2011.

CATTO, J. B., BIANCHINI, I. SAITO, M. L. Efeito acaricida in vitro de extratos de plantas do Pantanal no carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Dados eletrônicos. Embrapa gado de corte. Campo Grande, MS, 2009.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, 21(1), 1998.

CHAGAS, A. C, M. PASSOS, W. M. PRATES, H. T. LEITE, R. C. FURLONG, J. F. FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp* em *Boophilus microplus*. Brazilian Journal of Veterinary Reserch of Animal Science. São Paulo. v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHAGAS, A. C. S. GEORGETTI, C.S. CARVALHO, C.O. OLIVEIRA, M.C.S. RODRIGUES, R. A. F. FOGLIO, M. A. MAGALHÃES, P.M. In vitro activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 20, p. 31-35, 2011.

CHAGAS. A. C. S. BARROS. L. D. COTINGUIBA.F. FURLAN. M. GIGLIOT. R. OLIVEIRA. M. C. S. BIZZO. H. R. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol Research 110:295–303. 2012.

CHUNGSAMARNYART, N.; JANSAWAN, W. Acaricidal activity of peel oil of *Citrus* spp. on *Boophilus microplus*. Kasetsart Journal (Natural Science), v. 30, p. 112-117, 1996.

CONNEL M. & HALL W.T.K. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. Australian Veterinary. 48:477. 1972.

COSTA, S. M. BEVILAQUA, C. M. L. SOUZA, M. M. C. LEITE, F. K. A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.11, n.2, p.57-60, 2002.

COSTA, F. B. VASCONCELOS, P. S. S. SILVA, A. M. M. BRANDÃO, V. M. SILVA, I. A. TEIXEIRA, W. C. GUERRA, R. M. N. S. SANTOS, A. C. G. Eficácia de fitoterápicos em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião oeste do Maranhão, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 17, supl. 1, p. 83-86, 2008.

CRONQUIST, A., 1988. The evolution and classification of flowering plants. Lawrence, Printed by Allen Press, Inc., 555p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

DAEMON, E. MATURANO, R. MONTEIRO, C. M. O. GOLDNER, M. S. MASSONI, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens*(Acari: Ixodidae) larvae. Veterinary Parasitology 186, 542– 545, 2012.

D’ALESSANDRO. W. B. Avaliação da atividade de acaricidas químicos sintéticos, extrato botânico sobre *Rhipicephalus sanguineus* e ação dos óleos essenciais sobre *Amblyomma cajennense*. Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical- Parasitologia-IPTSP/UFG/2008.

DEEPIKA, T. L. KANNABIRAN, K. KHANNA, V. G. RAJAKUMAR, G. JAYASEELAN, C. SANTHOSHKUMAR, T. & RAHUMAN, A. A. Isolation and characterisation of acaricidal and larvicidal novel compound (2S,5R,6R)-2-hydroxy-3,5,6-trimethyloctan-4-one from *Streptomyces* sp. against blood-sucking parasites. Parasitol Res 111:1151–1163. 2012.

DRUMMOND, R.O., ERNEST. S. E., TREVINO. J. L., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, v.66, n.1, p.130-133.

ESTRADA-PENÃ.A. & VENZAL. J.M. High-resolution predictive mapping for *Boophilus annulatus* and *B. microplus* (Acari: ixodidae) in Mexico and Southern Texas. *Veterinary Parasitology* 142, 350–358. 2006.

FACEY. P. C., PORTER. R. B. REESE. P. B., WILLIAMS. L. A. Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 53, n. 12, p. 4774-4777, 2005.

FERNÁNDEZ-SALAS. A. RODRÍGUEZ-VIVA. R. I. ALONSO-DÍAZ. M. A. BASURTO- Camberosa. H. Ivermectin resistance status and factors associated in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2011.

FERRAZ, A. B. F. BALBINO. J. M., ZINI. C. A., RIBEIRO. V. L., BORDIGNON. S. A., von POSER. G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. *Parasitology Research*, v. 107, n. 1, p. 243-248, 2010.

FIORI, G. P. GARCIA, K. B. GONÇALVES, V. M. SANTOS, T. R. B ação acaricida de extratos de tagetes minuta sobre larvas de *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. XX Congresso de iniciação científica. UFPEL. 2011.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite., 25 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular técnica, 59) 2000.

FURLONG, J.; CHAGAS, A.C.S.; NASCIMENTO, C.B. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo, v.39, n.4, p. 213-217, 2002.

FURLONG. J. Carrapato: Problemas e Soluções. Juiz de Fora. Embrapa Gado de Leite. 2005.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Veterinária*, v.27, n.159, p. 26-32, set./out. 2007.

GIGLIOTI. R. FORIM, M. R. OLIVEIRA, H. N. CHAGAS, A. C. FERREZINI, J. BRITO, L.G. FALCOSKI, T. O. ALBUQUERQUE, L. G. OLIVEIRA, M. C. *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* 181, 309– 315, 2011.

GLORIA. M. A. DAEMON. E. FACCINI. J. L. & GRISI. E. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (can.,

- 1887) (acarixodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2. 2. 85-91. 1993.
- GOMES. A. Carrapato-de-boi prejuízos e controle. Embrapa gado de corte divulga. N. 42. Campo Grande, MS, 2000.
- GOMES. A. KOLLER. W. W. BARROS. I. A. T. M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Ciência Rural, Santa Maria, v.41, n.8, p.1447-1452, 2011.
- GONZALES. J. C. SILVA. N. R. WAGNER. E. M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (Can. 1887) em bovinos estabulados. Arquivo Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. V. 2, p. 25-34, 1974.
- GUERBAS NETO, P. Estudo químico da casca, folhas e cerne de um espécime de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae) coletado no Pantanal. (2003). 120 f. (Mestrado), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- UFMS, Campo Grande- MS, 2003.
- GUERRERO. F. D. MILLER. R. J. PÉREZ DE LEÓN. A. A. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? International Journal for Parasitology 42, 421–427. 2012.
- GRISI, L. MASSARD, C. L. MOYA-BORJA, C. E. PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A Hora Veterinária, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- HAN, J. M. Y. MAN XU, J.S. BAORONG WANG, D. G. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 848 355–362. 2007.
- HERNÁNDEZ, L.; PARRA, D.; AHUMADA, A. Actividad repelente y acaricida del aceite y algunas fracciones cromatograficas del pasto *Melinis minutiflora* frente al *Boophilus microplus*. Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas, n. 17, p. 45-50, 1989.
- HITCHCOCK, L.F. Studies on the parasitic stages of the cattle tick *Boophilus microplus*. Australian Journal of Zoology. 3:295-311, 1955a.
- HITCHCOCK, L.F. Studies of the non-parasitic stages on the cattle tick, *Boophilus microplus* (canestrini) (acarina : ixodidae). Australian Journal of Zoology., v. 3, p. 295-311, 1955b.
- JONSSON. N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Veterinary Parasitology 137, 1–10. 2006.
- KAAYA. G. P. & HASSAN. S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Experimental and Applied Acarology 24: 913–926, 2000.

KAMARAJ. C., RAHUMAN. A. A., BAGAVAN. A., ELANGO. G. G., RAJAKUMAR. G., ZAHIR. A. A., MARIMUTHU. S., SANTHOSHKUMAR. T., JAYASEELANC. Evaluation of medicinal plant extracts against blood-sucking parasites. *Parasitology Research*, v. 106, n. 6, p. 1403-1412, 2010

KESSLER. R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(4):177-179, out./dez. 2001

KLEIN. T., LONGHINI. R., BRUSCHI. M. L., MELLO. J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(3): 241-248. 2009.

KLAFKE. G. M., ALBUQUERQUE. T. A., MILLER. R. J., SCHUMAKER. T. T. S. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 168, p. 97-104, 2010.

KOCAN, K. M. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology* 57, 121-151, 1995.

KUMAR. B. MURUGAN. K. RAY. D. D. & GHOSH. S. Efficacy of rBm86 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (IVRI-I line) and *Hyalomma anatolicum anatolicum* (IVRI-II line) infestations on bovine calves. *Parasitol Research* (2012) 111:629–635

LAHILLE. F. Contribution a l'étude des Ixodidés de la Republique Argentine. *Ministerio de Agricultura de la Nación*, v. 2, p. 1-166, 1905.

MAGADUM, S.; MONDAL, D. B.; GHOSH, S. Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. *Parasitology Research*, v. 105, n. 4, p. 1085-1091, 2009.

MARINHO, M.L.; ALVES, M.S.; RODRIGUES, M.L.C.; ROTONDANO, T.E.F.; VIDAL, I.F.; SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MARTINS, R. M. Estudio *in vitro* de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em la garrapata *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 2, p. 71-78, 2006.

MURREL. A, CAMPBELL. N. J. H, & BARKER. S. A Total-Evidence Phylogeny of Ticks Provides Insights into the Evolution of Life Cycles and Biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol 21, ed 2. 244–258. 2001.

NETO. G.G, & MORAIS. R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasilica*. 17(4): 561-584. 2003.

NEEWMAN, D. J. CRAGG, G. M. Produtos naturais como fontes de novas drogas ao longo dos 30 anos de 1981-2010. *Journal of Natural Products*. 2012 Mar 23; 75 (3):311-35, 2012.

NOLAN, J. ROUSLTON, W. J. WHARTON, R. H. Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT- resistant strain of *Boophilus microplus*. Pesticide Science. 1977; 8: 484- 486.

OJEDA-CHI, M. M. RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. GALINDO-VELASCO, E. LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology 170, 348–354, 2010.

OLDIGES, D. P. PARIZI, L.F. ZIMMER, K. R. LORENZINIA, D. M. SEIXAS, A. MASUDA, A. VAZ JR., I. S. TERMIGNONI, C. A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. International Journal for Parasitology 42 635–645.2012.

OLIVERA. J. R. J. H. Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. IV. Reproduction on ticks (Ixodoidea). J. Med. Ent., v. 11, p. 26-34, 1974.

OLIVEIRA, F. C. OLIVEIRA, P. A. PAPPEN, F.G. AGUIAR, C. L. G. FARIAS, N. A. R. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas utilizados em banheiros de imersão no sul do Rio Grande do Sul. XIX ENPOS. Mostra científica UFPel. 2010.

OLIVER Jr JH 1989. Biologia e sistemática de carrapatos (Acari: Ixodida). Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 20: 397-430.

OLIVO. C. G, Carvalho, N. M. Silva, J. H. S. Vogel, F. F. Massariol, P. Meinerz, G. Agnolin, C. Morel, A. F. Viau, L. V. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, p.406-410, 2008.

PECONICK, A. P. SOSSAI, S. GIRAO, F. A. RODRIGUES, M. Q. R. B. SOUZA E SILVA, C. H. GUZMAN, F. PATARROYO V, A. M. VARGAS, M. I. PATARROYO. J. H. Vacina sintética (SBm7462) contra carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : preservação dos determinantes imunogênicos em diferentes cepas da América do Sul. Exp. Parasitol., 119, pp 37-43. 2008.

PEREIRA, C. Dados ecológicos sobre ovos e ninfas hexápodos de *Boophilus microplus*. (Canestrini, 1888). Arq. Inst. Biol., v. 8, p. 135-144, 1937.

PEREIRA, J. R.; FAMADAS, K. M. Avaliação “*in vitro*” da eficiência do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (Leguminosae, Papilionoidae, Millettidae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, v. 71, n. 4, p. 443-450, 2004.

PEREIRA. M. C. LABRUNA. M. B. SZABÓ. M. P. J. KLAFKE. G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. São Paulo: MedVet, 2008.

PÉTER, O. & BROSSARD, M. Lutte contre les tiques. Maladies Médecine et Infectieuses. 28, No Spécial : 383-6, 1998.

PIVOTO, F. L. BUZATTI, A. KRAWCZAK, F. S. CAMILLO, G. SANGIONI, L. A. ZANETTI, G. D. MANFRON, M. P. VOGEL, F. S. F. Ação acaricida in vitro de *Tropaeolum majus* sob teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2141-2145, 2010.

POLAR, P. KAIRO, M. T. K. PETERKIN, D. MOORE, D. PEGRAM, R. & JOHN, S. A. Assessment of Fungal Isolates for Development of a Myco-Acaricide for Cattle Tick Control. *Vector-borne and zoonotic diseases*. V.5, N. 3, 2005.

PONTES, W. J. T. OLIVEIRA, J. C. S. CÂMARA, C. A. G. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 4, 838-841, 2007.

PRANCE, G. T. & SCHALLER, G. B. Preliminary study of some vegetation types of the pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Brittonia*, 34(2), pp. 228-251, 1982.

QUAN, C. & TURNER, C. Extraction of Astaxanthin from Shrimp Waste Using Pressurized Hot Ethanol. *Chromatographia*, 2009.

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 2010.

RANGEL, D. E. N. Braga, G. Flint, S. D. Anderson, A. J. Roberts, D. W. Variações na radiação UV-B tolerância e velocidade de germinação de *Metarhizium anisopliae* conídios produzidos em insetos e substratos artificiais. *Journal of Invertebrate Pathology*. Volume 87, Edições 2-3, outubro-novembro de 2004, páginas 77-83.

RAVINDRAN, R. JULIET, S. SUNIL, A. R. KUMAR, K. G. A. NAIR, S. N. KAMITHAMOL, K. K. BANDYOPADHYAY, A. RAWAT, A. K. S. GHOSH, S. Acaricidal activity of *Cassia alata* against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Experimental and Applied Acarology*, v. 56, n. 1, p. 69-74, 2012.

RESENDE, J. D. S. A. DAEMON, E. MONTEIRO, C. M. O. MATURANO, R. PRATA, M. C. A. RODRIGUES, A. F. S. F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. *Experimental Parasitology* 131, 139-142, 2012.

RIBEIRO, V. L. S., RIBEIRO, V. L., TOIGO, E., BORDIGNON, S. A., GONÇALVES, K., von POSER, G. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 147, n. 1-2, p. 199-203, 2007.

RIBEIRO V, L. S. AVANCINI, C., GONÇALVES, K., TOIGO, E., von POSER, G. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v. 151, n. 2-4, p. 351-354, 2008a.

RIBEIRO. V. L. S. ROLIM. V., BORDIGNON. S., HENRIQUES. A. T., DORNELES. G. G., LIMBERGER. R. P. von poser. G. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. Parasitology Research 102:531–535.2008b.

RIBEIRO. V. L. S. DOS SANTOS. J. C., MARTINS. J. R., SCHRIPSEMA. J. , SIQUEIRA. I. R. , von POSER. G., APPEL. M. A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology 179 195–198.2011.

ROCHA. C. M. B. M. OLIVEIRA. P. R. LEITE. R. C. CARDOSO. D. L. CALIC. S. B. FURLONG. J. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. Ciência Rural, Santa Maria, v. 36. n. 4, p. 1235-1242, 2006.

ROSADO-AGUILAR, J. A. AGUILAR-CABALLERO, A. RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. BORGES-ARGAEZ, R. GARCIA-VAZQUEZ, Z. MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). Veterinary Parasitology 168, 299–303, 2010.

SAHOO, N. MANCHIKANTI, P. DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. Fitoterapia 81, 462–471, 2010.

SEIXAS, A. OLDIGES. D. P, VAZ JR. I. S & TERMIGNONI. C. Endocrinologia e controle da vitelogenese em carrapatos. Acta Scientiae Veterinariae. 38 (2): 95- 111, 2010.

SCHENK. M. A. M. GOMES. A. EVANS. D. BERNE. M. E. A. Epidemiologia do *Boophilus microplus* nas condições do cerrado. PA/23 - CNPGC - nov./83 p.5. 1983.

SILVA. N. R. O ciclo parasitário de *Boophilus microplus* em bovinos estabulados. Tese (Mestrado) – Faculdade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1973.

SILVA. I. G, SILVA, H. H. G. GUIMARÃES, V. P. LIMA, C. G. PEREIRA, A. L. RODRIGUES FILHO, E. ROCHA, C. Prospecção da Atividade Inseticida de Plantas do Cerrado, visando ao Combate do *Aedes aegypti*. Informe Epidemiológico do SUS 2001; 10(Supl. 1): 51-52. 2001.

SILVA. F. F., SOARES. M. C. S. C., ALVES. C. L. C., LIMA. M. M., SILVA. L. V. A., FAUSTINO. M. A. G., SILVA JÚNIOR. F. F. Avaliação comparativa da eficácia de fitoterápicos e produtos químicos carrapaticidas no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) por meio do biocarrapaticidograma. Medicina Veterinária, Recife, v.2, n.3, p.1-8, 2008.

SILVA. W. C. MARTINS, J. R. DE SOUZA, H. E. HEINZEN, H. CESIO, M. V. MATO, M. ALBRECHT, F. DE AZEVEDO, J. L BARROS, N. M. Toxicity of

Piper aduncum L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 164 267–274. 2009.

SHAHIDI, F. & NACZK, M. Phenolics in foods and nutraceuticals. Boca Raton: CRC Press, 576 p, 2003.

SOARES, A. O. TIEPPO, C. GARCEZ, W. S. GARCEZ, F. R. Iridóides e triterpenos das cascas do caule de *Tabebuia caraiba* bignoniaceae. 29 a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ – 19 a 22 de maio de 2006.

SONAGLIO. D., ORTEGA. G. G., PETROVICK. P. R., BASSANI. V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões.C. M. O.; Schenkel. E.P.; Gosmann. G.; Mello. J. C. P.; Mentz. L. A.; Petrovick. P. R. 2010. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. UFSC.

SOUSA, L. A. D., SOARES. S. F., PIRES JÚNIOR. H. B., FERRI. P. H., BORGES. L. M. F. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 36-40, 2008.

SOUZA, A. P., GONZALES, J. C., RAMOS, C. I., PALOSCHI, C. H. G., MORAES, A. N. Variação sazonal de *Boophilus microplus* no Plantalto Catarinense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 23, n. 6, p. 627-630, 1988.

SRIVASTAVA. R., GHOSH. S., MANDA.D. B., AZHAHIANAMBIP., SINGHAL. P. S., PANDEY. N .N., SWARUP. D. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, v. 104, n. 1, p. 149-153, 2008

TAVARES. J. P. C, et al. Avaliação “*in vitro*” da eficácia ectoparasiticida de extratos de *Melia azedarach* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Anocentor nitens*. X Jornada de ensino, pesquisa e extensão. Ufpe. Recife, 2010.

VAZ JUNIOR. I. S., SEIXAS. A. & MASUDA. A. Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato. INCT. Entomologia Molecular. <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arhrolivro-1/capitulo-19>. 2012.

VALENTE, M.; BARRANCO, A.; SELLAIVE-VILLAROEL, A. B. Eficácia do extrato aquoso de *Azadirachta indica* no controle de *Boophilus microplus* em bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 5, p. 1341-1343, 2007.

VIVAN, M. P. Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). 72 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WILLADSEN, P. BIRD, P. COBON, G. S. HUNGERFORD. J. Comercialização de uma vacina recombinante contra *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 110, p S43-S50. 1995.

WILLADSEN. P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129, S367–S387. 2004.

WILLIAMS, L. A. D. Adverse effects of extracts of *Artocarpus altilis* Park and *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus* (Canest.), *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 23, n. 2-3, p. 159-164, 1993.

YANG. W. YEA, M. QIAOA, X. LIUA, C. MIAOA, W. BOB, T. TAOA, H. GUOA, G. A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides. *Analytica Chimica Acta* 739, 56– 66. 2012.

XIE, W. ZHANG, X. WANG, T. HU, J. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Apocynum venetum* L. (Luobuma): A review. *Journal of Ethnopharmacology* 141, 1– 8. 2012.

ZAHIR, A. A., AA RAHUMAN, KAMARAJ C, BAGAVAN A, G ELANGO, SANGARAN A, KUMAR BS. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. *Parasitology Research*, v. 105, n. 2, p. 453-461, 2009.

ANPÊNDICES

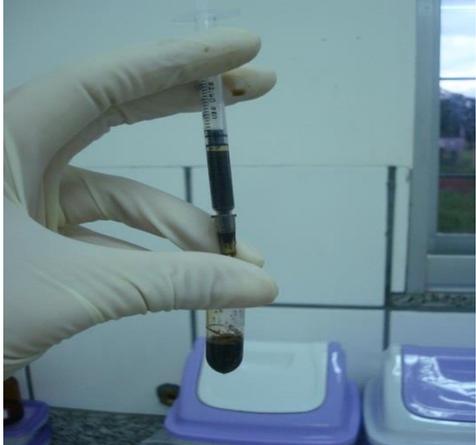
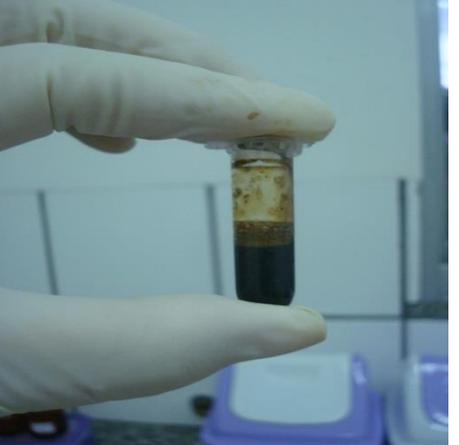
	
<p>Figura 1 Fêmeo ingurgitado para postura</p>	<p>Figura 2- Fêmeas em oviposição</p>
	
<p>Figura 3- Tubo Eppendorf e larvas pós-eclosão</p>	<p>Figura 4- Extrato vegetal diluído</p>
	
<p>Figura 5- Larvas em contato com extrato</p>	<p>Figura 6- Agitação vigorosa</p>
	
<p>Figura 7- Larvas e extrato em mesa agitadora</p>	<p>Figura 8- Larvas sendo depositada no envelope de papel filtro</p>



Figura 9- Pacotes com larvas e extrato



Figura 10- Pacote aberto após 24 hs

Capítulo I - Artigo I

A ser submetido na revista Veterinary Parasitology

Prospecção de compostos bioativos de 21 plantas nativas do Pantanal Sul-matogrossense com ação sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Santos, L. B.^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

* Autor correspondente

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Avenida Senador Filinto Müller 2443, Ipiranga, Caixa Postal 549

CEP: 79074-460 Campo Grande-MS

larissamedvet@hotmail.com

Abstract: The applications of chemical acaricide in a promiscuous and incorrect way result in the resistance of the tick population on the Brazilian cattle . The use of herbal medicine to control de ticks is a great challenge, however with the variety of plants widespread in the forest area of the country, becomes a possible alternative. This paper was to evaluated the in vitro acaricidal activity (larval immersion test) of twenty-one extracts of vegetal species found in Pantanal Sul – Mato – Grossense. The plants *Centratherum punctatum*, *Lantana canescens*, *Melanthera latifolia*, *Aeschynomene denticulata*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Crotalaria micans*, *Angelonia hirta*, *Diodia kuntzei*, *Sebastiania hispida*, *Richardia grandiflora*, *Aspilia latíssima*, *Hippocratea volubilis*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata*, *Zanthoxylum rigidum*, *Hyptis mutabilis*, *Ocotea diospyrifolia* and *Sesbania virgata* (fruit extracts), exhibit acaricidal activity on non-parasitic stage of *Rhipicephalus (Boophilus)*

27 *microplus*, and the species, *Croton glandulosus* and *Senna obtusifolia*, don't show
28 effects. The crude extracts of *M. latifolia*, *A. hirta*, *R. grandiflora* e *A. latissima*, were
29 tested in female ticks (Adult immersion test) and only *Angelonia hirta* show efficiency
30 proximity to 90%.

31 **Keywords:** wetland biome, ox tick, herbal medicine

32

33 **Resumo:** A aplicação de acaricidas químicos de forma indiscriminada e inadequada
34 resultou na instalação da resistência nas populações de carrapatos do rebanho bovino
35 brasileiro. A utilização de fitoterápicos no controle de carrapatos é um grande desafio,
36 no entanto com a diversidade de plantas existentes em toda área de mata do país,
37 implica ser uma alternativa possível. Neste trabalho foi avaliada a atividade acaricida *in*
38 *vitro* (Teste de imersão larval) de extratos de 21 espécies de vegetais encontradas no
39 Pantanal Sul- mato- gressesense. As plantas *Centratherum punctatum*, *Lantana*
40 *canescens*, *Melanthera latifolia*, *Aeschynomene denticulata*, *Echinodorus paniculatus*,
41 *Caperonia castaneifolia*, *Crotalaria micans*, *Angelonia hirta*, *Diodia kuntzei*,
42 *Sebastiania hispida*, *Richardia grandiflora*, *Aspilia latissima*, *Hippocratea volubilis*,
43 *Tocoyena formosa*, *Randia armata*, *Zanthoxylum rigidum*, *Hyptis mutabilis*, *Ocotea*
44 *diospyrifolia* e *Sesbania virgata* (extrato de frutos), apresentam atividade acaricida
45 sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e as espécies,
46 *Croton glandulosus* e *Senna obtusifolia*, não apresentam eficácia. Os extratos brutos *M.*
47 *latifolia*, *A. hirta*, *R. grandiflora* e *A. latissima*, foram testados em teleóginas (Teste de
48 imersão de adultos) e apenas *Angelonia hirta* apresentou eficácia próximo a 90%.

49 **Palavras-chave:** bioma pantaneiro, carrapato do boi, fitoterápico

50

51 **1.0. Introdução**

52 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) ectoparasito
53 hematófago de bovinos, possui ampla distribuição e sua infestação causa grande
54 prejuízo econômico à bovinocultura brasileira (Cordovés, 1997; Grisi et al. 2002).

55 A fixação e espoliação sanguínea realizada pelo *R. (B.) microplus* causam efeitos
56 deletérios no ganho de peso, na conversão alimentar e depreciação do couro. Pode
57 ocorrer transmissão de patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma*
58 *marginale*, complexo denominado tristeza parasitária bovina (Gomes, 2000). O prejuízo
59 inerente ao carrapato bovino é estimado em dois bilhões de dólares por ano no Brasil.
60 Com cerca de 80% do rebanho bovino brasileiro acometido pelo *R. (B.) microplus*, os
61 gastos com o manejo de controle são cada vez maiores (Grisi et al. 2002).

62 O controle terapêutico atualmente utilizado contra carrapato bovino é realizado
63 pelo uso de produtos químicos acaricidas (Furlong et al. 2007). A resistência do *R. (B.)*
64 *microplus* é comprovada em Mato Grosso do Sul a todos os grupos químicos e essa
65 situação é encontrada em outros estados brasileiros (Koller et al. 2009; Andreotti, 2010;
66 Gomes et al. 2011). Em consequência dessa resistência comprovadamente instalada no
67 rebanho bovino brasileiro e de todos os prejuízos que a infestação por ele acarreta na
68 cadeia produtiva bovina de carne, leite e couro é que pesquisas de novas abordagens e
69 estudos que viabilizem um novo produto para o controle do parasitismo merecem
70 atenção, na tentativa de prolongar a vida útil e ou reduzir o uso de carrapaticidas que
71 ainda possuam alguma eficácia. Dentre as abordagens possíveis destaca-se o uso de
72 extratos vegetais (Catto et al. 2009).

73 As pesquisas com produtos naturais fazem parte de uma área em crescimento
74 constante e de extrema relevância, com avanço significativo na descoberta de novos
75 ativos que venham promover uma formulação com base em tais produtos (Newman &
76 Cragg, 2012). Um levantamento dos registros da Agência de Proteção Ambiental entre

77 1997-2010 apontam os compostos naturais como fonte de produtos químicos utilizados
78 atualmente, por meio de alguma ligação com um produto natural específico ou ainda um
79 subproduto isolado. Por isso os compostos naturais são de fundamental importância na
80 legitimação de pesticidas, fungicidas e parasiticidas (Cantrell et al. 2012).

81 Poucos são os estudos direcionados à catalogação e caracterização de espécies
82 com potencial interesse farmacêutico no estado de Mato Grosso do Sul, especialmente
83 na região do Pantanal, com referência a catalogação, caracterização fitoquímica de
84 espécies com potencial interesse farmacêutico (Neto & Moraes, 2003; Soares, 2006).

85 O Pantanal Sul-mato-grossense localizado na bacia do Rio Paraguai também
86 engloba o estado de Mato Grosso, Bolívia e Paraguai. Bioma rico e diversificado, com
87 espécies de plantas comuns para todos os limites e espécies que se restringem a
88 determinada área. No Pantanal, pode-se encontrar de área de pântano, floresta estacional
89 semidecídua, cerrado, chaco e savana. (Prance & Schaller, 1982).

90 Dentre as famílias de plantas já estudadas globalmente quanto à atividade
91 acaricida sobre *R. (B.) microplus* estão: Annonaceae (Broglia-Micheletti et al. 2009),
92 Asteraceae (Ribeiro et al. 2008a), Acanthaceae (Kamaraj et al. 2010), Amaranthaceae e
93 Euphorbiaceae (Zahir et al. 2009), Anacardiaceae (Srivastava et al. 2008), Clusiaceae
94 (Ribeiro et al. 2007), Caesalpiniaceae e Combretaceae (Kamaraj et al. 2010), Lamiaceae
95 (Facey et al. 2005; Zahir et al. 2009), Lauraceae (Álvarez et al. 2008), Leguminosae
96 (Pereira; Famadas, 2004; Magadum et al., 2009), Liliaceae (Magadum et al. 2009; Zahir
97 et al., 2009), Meliaceae (Brown et al. 1998; Chagas et al. 2002; Magadum et al. 2009),
98 Moraceae (Williams, 1993), Piperaceae (Silva et al. 2009; Ferraz et al., 2010; Álvarez et
99 al. 2008), Phytolaccaceae (Rosado-Aguilar et al., 2010), Poaceae (Hernández et al.
100 1989; Prates et al. 1993; Martins, 2006), Rosaceae (Srivastava et al. 2008), Rutaceae

101 (Chungsamarnyart; Jansawan, 1996), Solanaceae (Zahir et al. 2009; Olivo et al. 2009),
102 Verbenaceae (Kamaraj et al. 2010), Winteraceae (Ribeiro et al. 2008b).

103 As duas espécies mais estudadas *Melia azedarach* (Borges et al. 1994, 2003;
104 Vivan, 2005; Sousa et al. 2008) e *Azadirachta indica* (Williams, 1993; Valente et al.
105 2007; Srivastava et al. 2008; Costa et al., 2008; Magadum et al. 2009; Broglio-
106 Micheletti et al. 2009, 2010) pertencem à ordem Salpindales, à família Meliaceae, que
107 possui cinco gêneros e é possível que outras espécies desta família sigam o mesmo
108 perfil químico (Cronquist, 1988).

109 Dentre as plantas já estudadas e que obtiveram sucesso sobre *R. (B.) microplus*
110 destacam-se *Calea serrata*, com eficácia superior a 95%, utilizando o Preconceno II
111 isolado do óleo essencial da planta, na concentração de 2,5 mg / mL (Ribeiro et al
112 2011), *Piper aduncum*, na concentração 0,1 mg / ml⁻¹ apresentou 100% de mortalidade
113 de larvas (Silva et al. 2009), *Drimys brasiliensis* tóxico para larvas em todas as
114 concentrações analisadas 25, 12,5 e 6,25 microl / ml (Ribeiro et al. 2008b).

115 A utilização de fitoterápicos no controle de carrapatos é um grande desafio, no
116 entanto com a diversidade de plantas existentes em toda área do país, implica ser uma
117 alternativa possível. Até o momento 106 diferentes espécies compreendidas em 46
118 famílias e 91 gêneros, foram coletadas e identificadas pelo Banco de extratos de
119 espécies vegetais encontradas no Pantanal- herbário CG-MS da UFMS, em sua maioria
120 espécies sem estudo quanto à caracterização química, classe de metabólitos já descritos
121 e atividades biológicas já realizadas.

122 Neste trabalho foram avaliadas e caracterizadas 21 espécies do Banco de
123 extratos de espécies vegetais da UFMS encontradas no Pantanal Sul-matogrossense, das
124 quais 13 espécies apresentam algum estudo relacionado ao seu perfil fitoquímico e oito
125 destas plantas permanecem inéditas mesmo neste critério.

126

127 **2.0. Materiais e métodos**

128 **2.1. Isolado de *R. (B.) microplus***

129 Foi utilizado um isolado de campo resistente a piretróide (deltametrina) e,
130 associação de organofosforado e piretróide (ethion e cipermetrina), sensível a amidina
131 (amitraz), associação de organofosforado e piretróide (clorpirifós e cipermetrina),
132 associação de organofosforado e organofosforado (diclorvós e clorpirifós), oriundo da
133 Universidade Federal de Uberlândia, cedida pela Embrapa Gado de Corte. Para sua
134 manutenção, foram inoculadas 5000 larvas de *R. (B.) microplus* semanalmente em um
135 bezerro, que foi previamente desparasitado (20 dias antes da primeira infestação) e
136 permaneceu durante todo o experimento no setor de isolamento animal da Faculdade de
137 Medicina Veterinária e Zootecnia.

138 As teleóginas foram coletas principalmente no início da manhã e final da tarde,
139 foram lavadas e colocadas com o dorso para baixo em placas de petri e levadas a uma
140 estufa B.O.D. por 18 dias em 27° C \pm 1 e UR (umidade relativa) de 80%. Após este
141 período (0,25 gramas de ovos) foram pesados e mantidos também em B.O.D. em
142 seringas adaptadas (com a ponta cortada), para inoculação semanal do isolado.

143 Todos os procedimentos cumpriram com os requisitos da biossegurança, ética e
144 bem-estar na pesquisa animal, preconizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da
145 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o processo nº 410/2012.

146

147 **2.2. Material vegetal**

148 As coletas das espécies vegetais pertencentes ao bioma pantaneiro foram
149 realizadas na região do Rio Miranda/Abobral, na Fazenda São Miguel (19°36'30"S;
150 57°2'8"O), Estrada Parque (19°37'5"S;57°2'4"O), Base de Estudos do Pantanal – UFMS

151 (19°34'36"S; 57°1'11"O) e Fazenda São Bento (19°34'7"S; 57°1'15"O), no período de
152 cheia, abril/2012, com autorização de acesso e de remessa de amostra de Componente
153 do Patrimônio Genético nº 010457/2010-0.

154 Foram coletadas 21 espécies vegetais (diferentes partes) (Quadro1) encontradas
155 na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul. O critério utilizado na coleta das plantas
156 era para que houvesse flores (o mais correto quando se busca uma exsicata é que a
157 planta esteja na fase de florescência, para ser identificada). Com uma destas 21 espécies,
158 a leguminosa *Sesbania virgata*, foram coletados os frutos separados (havia vagem em
159 abundância), nesse caso foi realizado um extrato de frutos e um extrato de ramos finos e
160 folhas, no total foram analisados neste trabalho 21 espécies e 22 extratos, sendo dois
161 extratos da mesma espécie.

162 As espécies coletadas foram identificadas pelo Herbário CG-MS/ UFMS, foram
163 catalogadas utilizando o código Banco de extratos de espécies vegetais encontradas no
164 Pantanal (Bepan) seguido de números e suas exsicatas estão depositadas no herbário
165 CG-MS da UFMS.

166 As diferentes partes vegetais coletadas foram secas e depois trituradas em um
167 moinho de facas (MARCONI®) com padronização do tamanho da partícula de 20
168 Mesh. Os extratos foram obtidos através de um extrator de solvente acelerado (ASE)
169 (DIONEX®) (ASE 150) utilizando nitrogênio como gás pressurizador em células de
170 cinco e 100 mL, dependendo da quantidade do material vegetal seco. O etanol foi o
171 solvente empregado nas extrações, solvente de grau analítico, ou seja, solvente puro. O
172 solvente foi filtrado em filtro Hexis (0,45 µm) e depois degaseificado em ultrassom. A
173 extração do material vegetal foi realizada em extrator de fluido pressurizado pelo
174 método bruto:

175 Solvente: etanol/água destilada (7:3), 100 °C, 1.600 psi, um ciclo, tempo estático 5
176 min, 60 % lavagem, 50 seg de purga.

177

178 **2.3. Teste de imersão larval (TIL) - Shaw (1996)**

179 No TIL, foram utilizados 22 extratos brutos hidro alcoólicos provenientes de 21
180 plantas do Pantanal Sul-mato-grossense (uma das espécies com dois extratos, um de
181 seus frutos e outro com ramos finos e folhas, conforme identificado o ítem 2.2) listados
182 no Quadro 1. Foram avaliadas três diferentes concentrações (40%, 20% e 5%) de cada
183 extrato vegetal, em triplicata, utilizando a técnica de Shaw (1996) com modificações.

184 O procedimento com as teleóginas ocorreram conforme indicado no ítem 2.1.
185 Após este período (0,025 grama de ovos) foram pesados e mantidos também em B.O.D.
186 em tubos tipo eppendorf, com capacidade de 2 ml. Este tubo foi adaptado com um furo
187 na tampa para que houvesse passagem de ar e injeção dos tratamentos.

188 Os diluentes empregados nas avaliações *in vitro* foram determinados pela
189 polaridade e solubilidade em água dos extratos brutos. Foram utilizados etanol a 20%,
190 Tween 80 a 5% e água destilada em todas as diluições dos 22 extratos.

191 Imediatamente após a adição de 1 ml de extrato diluído nos tubos tipo eppendorf
192 contendo cerca de 500 larvas (0,025 gramas de ovos), o tubo foi fechado e agitado
193 vigorosamente durante alguns segundos e depois a 200 rpm em mesa agitadora (Marca -
194 Q225M) durante 10 minutos. Após os 10 minutos de imersão, as larvas foram colocadas
195 em envelopes de papel filtro com o auxílio de um pincel, presas com prendedores de
196 papel e mantidas em 27° C ±1 e URA de 80%. Após 24 horas foram contadas as larvas
197 vivas e mortas. Para cada extrato, foi utilizado um controle positivo (cipermetrina,
198 diclorvós e citronelal na concentração recomendada pelo fabricante) e um controle
199 negativo (etanol a 20%, Tween 80 a 5% ou água destilada).

200

201 2.4. Teste de imersão de adulto (TIA) - (Drummond et al., 1973)

202 Foram utilizados no TIA (Drummond et al., 1973), os extratos brutos das plantas
203 *M. latifolia*, *A. hirta*, *R. grandiflora* e *A. latissim*. Outras espécies também apresentaram
204 eficácia elevada no TIL, mas somente estas quatro espécies encontravam-se em
205 quantidade suficiente de extrato para realização do TIA em relação aos demais extratos
206 eficazes no TIL.

207 As teleóginas foram distribuídas entre as repetições de forma homogênea (de
208 acordo com o peso). Os testes foram realizados em duplicata (10 fêmeas por grupo,
209 N=20/concentração) para o estudo do efeito de diferentes concentrações sobre a
210 mortalidade e os aspectos reprodutivos das fêmeas. Foi utilizado um grupo controle
211 positivo (cipermetrina, diclorvós e citronelal) e um negativo (água destilada, etanol 20%
212 e tween 80 5%).

213

214 2.5 Análise dos dados

215 Para o cálculo da eficácia sobre as larvas, utilizou-se:

216
$$E\% = \left[\frac{\text{Média de larvas mortas}}{\text{Média de larvas vivas} + \text{Média de larvas}} \right] \times 100$$

217 mortas)] x 100

218 A eficiência reprodutiva (ER) e o índice de eficácia (IE) do extrato vegetal em
219 fêmeas adultas ingurgitadas foram calculados segundo Drummond et al. (1973):

220
$$ER = \left(\frac{\text{Peso da massa de ovos}}{\text{Peso da massa de fêmeas}} \right) \times \% \text{ eclosão} \times 20.000$$

221
$$IE = \left[\frac{\text{ER do grupo controle} - \text{ER do grupo tratado}}{\text{ER do grupo controle}} \right] \times 100$$

222 O critério de avaliação dos extratos foi estabelecido, de acordo com as diretrizes da
223 Associação Mundial para o Avanço da Veterinária Parasitologia (WAAVP)

224 (HOLDSWORTH et al., 2006), para avaliar a eficácia de acaricidas, eficácia superior a
225 95%.

226

227 **3.0 Resultados**

228 O percentual de eficácia do TIL nas concentrações 40%, 20% e 5% encontram-
229 se na Tabela 1.

230 Doze extratos apresentaram 100% de eficácia na concentração de 40%, seis
231 extratos apresentaram eficácia igual ou superior a 95% na concentração de 20%, um
232 extrato apresentou eficácia superior a 95% na concentração de 5% e dois extratos,
233 *Senna obtusifolia* e *Croton glandulosus* não apresentaram eficácia contra *R. (B.)*
234 *microplus*.

235 O efeito dos extratos sobre fêmeas adultas de *R. (B.) microplus* estão
236 representados na Tabela 2. Nenhum dos extratos avaliados apresentou 100% de
237 letalidade contra teleóquina.

238 O efeito de *Angelonia hirta* na concentração de 40% foi de 5% de mortalidade,
239 no entanto, a média de eclodibilidade dos ovos foi de 19,3%, atingindo a média de
240 eficácia de 88%.

241 *Aspilia latissima* na concentração de 50% resultou na morte de 10% das
242 teleóginas, média de eclodibilidade dos ovos foi de 33,3% e aumentando conforme
243 diminuía a concentração do extrato nas demais diluições.

244 Na exposição de teleóginas à *Melanthera latifolia* na concentração de 40%, a
245 mortalidade foi de 35% das teleóginas e a média de eclodibilidade foi de 47,6%.

246 O efeito de *Richardia grandiflora* sobre teleóginas resultou na morte de 15% das
247 fêmeas expostas à concentração de 40% e a média de eclodibilidade foi de 45,3%.

248

249 4.0 Discussão

250 Esse é o primeiro trabalho de avaliação de atividade acaricida em *Aeschynomene*
251 *denticulata*, *Angelonia hirta*, *Aspilia latissima*, *Caperonia castaneifolia*, *Centratherum*
252 *punctatum*, *Crotalaria micans*, *Diodia kuntzei*, *Echinodorus paniculatus*, *Hippocratea*
253 *volubilis*, *Hyptis mutabilis*, *Lantana canescens*, *Melanthera latifolia*, *Ocotea*
254 *diospyrifolia*, *Randia armata*, *Richardia grandiflora*, *Sesbania virgata*, *Senna*
255 *obtusifolia*, *Tocoyena formosa* e *Zanthoxylum rigidum*, todas pertencentes ao Pantanal
256 Sul-mato-grossense.

257 A escolha das espécies analisadas neste trabalho foi realizada após busca na
258 literatura por famílias de plantas avaliadas quanto à atividade acaricida, no entanto
259 algumas exsicatas foram escolhidas por serem abundantes no Pantanal Sul-mato-
260 grossense e com classes de substâncias descritas em literatura, mas inéditas na
261 utilização como acaricida.

262 Duas plantas utilizadas neste estudo já haviam sido avaliadas quanto a atividade
263 acaricida por Catto et al. (2009), *Croton glandulosus* e *Sebastiania hispida*. No presente
264 estudo, o extrato de *C. glandulosus* foi obtido utilizando somente a parte aérea da planta
265 e foi avaliada sobre larvas de *R. (B.) microplus*, com eficácia de 9,23% na concentração
266 de 5%. Catto et al. (2009), utilizaram a planta inteira na obtenção do extrato de *C.*
267 *glandulosus*, avaliada em uma concentração de 2,5%, menor que a concentração
268 utilizada neste estudo, sobre adultos da mesma espécie de carrapato, observando-se
269 eclodibilidade de 89% e eficácia geral de 20,28%. Estes resultados demonstram que *C.*
270 *glandulosus* possui reduzida ação contra *R. (B.) microplus*, que ocorre principalmente
271 na redução da postura de ovos pelas fêmeas ingurgitadas e um possível
272 comprometimento da embriogênese.

273 *Sebastina hispida*, conhecida popularmente como Mercúrio, pertence à família
274 Euphorbiaceae (Honda et al, 1990). No presente estudo o extrato hidroalcoólico da parte
275 aérea de *S. hispida* obteve eficácia superior a 95% na concentração de 5% no TIL. Em
276 outro estudo, o extrato bruto a 2,5% da planta inteira foi avaliado no TIA, observando-
277 se eficácia geral de apenas 8,16% e redução de eclodibilidade dos ovos de 7% (Catto et
278 al. 2009). Esta diferença na ação acaricida de *S. hispida* pode ser justificada pela
279 interferência de fatores tais como local e época de coleta, parte da planta utilizada, bem
280 como a fase de vida do carrapato a que foi submetida. Catto et al. (2009) obtiveram a
281 exsicata em abril de 2008, ano em que a seca foi rigorosa e os índices de precipitação
282 foram baixos (Soares, 2009). A exsicata do presente estudo foi obtida durante o período
283 da cheia no Pantanal, durante o verão do ano de 2012 (dezembro a março). De acordo
284 com Gobbo-Neto et al. (2007), os compostos secundários das plantas podem sofrer
285 influência da sazonalidade, ritmo cicardiano e desenvolvimento, no caso da seca
286 prolongada, o estresse ao que a planta é submetida diminui a concentração de
287 metabólitos e , no verão estas substâncias podem acumular na planta ou em parte dela.
288 Além disso, os métodos de extração dos princípios ativos foram diferentes em ambos os
289 trabalhos. Catto et al. (2009) utilizaram a maceração como método de extração (obtendo
290 uma tintura), seguida de secagem (evaporação do solvente), sendo o sucesso deste
291 método dependente do líquido extrator, temperatura, agitação, pH e tempo de extração
292 (Falkenberg et al. 2010). No presente estudo, foi utilizada a extração em sistema
293 fechado em um extrator de fluido pressurizado. Método de extração considerado
294 altamente eficiente, que utiliza menor quantidade de solvente em comparação a outros
295 métodos de extração (Falkenberg et al. 2010).

296 As plantas *D. kuntzei*, *R. grandiflora*, e *T. formosa* avaliadas neste estudo,
297 pertencem à família Rubiaceae. As espécies desta família têm como metabólitos

298 secundários os iridoides, as lignanas, antraquinonas, flavonoides, derivados fenolicos,
299 triterpenos, diterpenos e cumarinas. Quando avaliadas na concentração de 40%, *D.*
300 *kuntzei*, e *R. grandiflora* apresentaram eficácia de 100%, enquanto *T. formosa*
301 apresentou eficácia de 95% sobre larvas de *R. (B.) microplus*.

302 *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) apresentou na concentração de 20%, média de
303 eficácia de 99%. A família Rutaceae é muito estudada quanto ao número significativo
304 de diferentes metabólitos secundários e atividades biológicas que possui (Lewis, 1983),
305 antibacteriana, fúngica (Nissanka et al. 2001), e acaricida (Gandhi & Rahuman, 2010), o
306 gênero *Zanthoxylum* possui espécies com atividade antifúngica e repelência contra
307 *Aedes aegypti* (Choochote et al. 2007).

308 Gandhi & Rahuman, (2010) avaliaram o extrato metanolico de *Aegle mameos*
309 (Rutaceae) sobre *R.(B.) microplus*, a eficácia foi de 100% no teste do pacote larval,
310 apresentando CL50 134,09 ppm.

311 O extrato de *A. hirta* a 40% apresentou média de eficácia de 100% e na
312 concentração de 20%, apresentou eficácia superior a 95% contra larvas. Esta espécie
313 ainda não possui caracterização química e, foi uma das espécies selecionadas neste
314 estudo por ser abundante em campo alagável no Pantanal Sul-mato-grossense.

315 *Echinodorus paniculatus* (Alismataceae) obteve 100% de eficácia nas
316 concentrações de 20% e 40%, também faz parte de uma família avaliada pela primeira
317 vez contra *R. (B.) microplus*. A família Alismataceae é rica em diterpenos do tipo
318 clerodano, labdano, alcaloides, diterpenoicos e flavonoides. A planta *E. grandiflorus*,
319 também é conhecida como chapéu de couro, assim como *E. paniculatus* (avaliada neste
320 estudo), na primavera possui um aumento na quantidade de flavonoides e
321 arilpropanoides, possui ação *in vitro* diurética, antiinflamatória e antihipertensiva (Paiva
322 et al. 2008).

323 *Melanthera latifolia*, *Aspilia latissima* e *Centratherum punctatum* apresentaram
324 eficácia acima de 95% na maior concentração (40%) no TIL, as três espécies pertencem
325 à família Asteraceae. As plantas pertencentes a essa família são ricas em taninos,
326 saponinas espumílicas, purinas, polissacarídeos, glicondios cardiotônicos, flavonoides,
327 esteroides, triterpenoides, derivados de cumarina, carotenoides e antraquinonas, e não
328 possuem iridoides (Cronquist, 1981; Ribeiro et al. 2008^a). Ribeiro et al. (2008a) também
329 alcançaram eficácia superior a 95% ao utilizarem a *Calea serrata* (Quebra-tudo), planta
330 que pertence à família Asteraceae, assim como *M. latifolia*, *A. latissima* e *C. punctatum*,
331 avaliadas no presente estudo. O extrato hexano da *C. serrata* (partes aéreas da planta),
332 rica em eupatoriochromene e precoceno II, apresentou efeito tóxico no TIL
333 (concentrações 3,12 e 6,25 mg / mL) contra *R. (B.) microplus*. Posteriormente, Ribeiro
334 et al. (2012) analisaram o mecanismo de ação do extrato hexano de *C. serrata*
335 (concentrações 1,5, 3 e 6 mg / mL) e, os resultados obtidos indicam a inibição da
336 acetilcolinesterase em larvas de *R. (B.) microplus* e em ratos Wistar em ambas as
337 concentrações.

338 As espécies *C. micans* e *A. denticulata* apresentaram eficácia de 100% na
339 concentração de 40%, ambas pertencem à família Leguminosae, são ricas em
340 flavonoides, isoflavonoides, conferitrina e esteroides (Martinez et al. 2009), no entanto,
341 apenas *A. denticulata* manteve a eficácia de 100% na concentração de 20%. Os
342 metabólitos secundários geralmente são comuns entre as plantas de uma mesma família,
343 a quantidade e interação entre os mesmos podem variar e, podem ser ativadas em algum
344 estágio particular do desenvolvimento da planta ou em determinado período (Mann,
345 1987). O extrato bruto de *Dahlstedtia pentaphylla*, que também pertence à família
346 Leguminosae, foi avaliado em bovinos, via pulverização nas diluições 1:10 e 1:20, e
347 apresentou eficácia de 68,11% e 66,07%, respectivamente, no dia sete pós-tratamento,

348 não diferindo entre si, mas diferindo de forma significativa do grupo controle (água e
349 álcool etílico 1:10) (Pererira & Famadas, 2004)

350 *Hyptis mutabilis* e *O. diospyrifolia* pertencem à família Laminaceae,
351 apresentaram eficácia média superior a 95% sobre larvas de *R. (B.) microplus* na
352 concentração de 40%. Em geral as plantas pertencentes à família Laminaceae possuem
353 triterpenoides, taninos, flavonoides e iridoides, este último presente na casca. Entre os
354 compostos metabólicos secundários de *H. mutabilis* estão o β - sitoesterol e
355 estigmasterol (extrato da folha) (Melo 2003).

356 *Hyptis verticillata* (Facey et al., 2005) é uma das espécies que já foram avaliadas
357 contra *R. (B.) microplus*. Foi isolado de *H. verticillata* um produto natural com
358 atividade acaricida, Cadina-4,10(15)-dien-3-one, que, assim como os demais compostos
359 fenólicos, podem afetar a função endócrina após reações oxidativas, e não mata o
360 carrapato adulto, mas diminui a postura e eclodibilidade de ovos (Porter et al., 1995).
361 Considerando que os metabólitos secundários estão dispostos entre famílias de plantas
362 ou restrita a elas, é possível que *H. mutabilis* partilhe da substância isolada Cadina-
363 4,10(15)-dien-3-one, ou ainda, que outras substâncias estejam envolvidas na atividade
364 acaricida exercida por ela, por isso, mais estudos ainda são necessários quanto à
365 elucidação estrutural de *H. mutabilis*.

366 Neste trabalho a *L. canescens* apresentou eficácia superior a 95% no TIL na
367 concentração de 40%. Pertencente à mesma família, *Vitex negundo* foi avaliada a partir
368 da concentração 3.000 ppm por Kamaraj et al. (2010), contra larvas de *R. (B.)*
369 *microplus*, evidenciando atividade acaricida moderada (morte de larvas em 24 horas), a
370 CL50 foi de 611,67 ppm.

371 Dois extratos de *Sesbania virgata* (Fabaceae) foram avaliados neste estudo, o
372 extrato do fruto, que obteve eficácia acima de 95% nas concentrações de 20 e 40%,

373 enquanto que o extrato das folhas e ramos finos da planta obteve esta mesma eficácia
374 somente na concentração de 40%. As sementes do fruto de *S. virgata*, apresentam como
375 composto majoritário bioflavonoide (+)-catequina, que possui efeito fitotóxico sobre
376 plantas e inibe o crescimento de bactérias como a *Pseudomonas fluorenses* (Simões et
377 al. 2008). Este composto pode ser responsável pela melhor eficácia do extrato do fruto
378 em relação ao extrato de folhas e ramos finos, assim como a ação antimicrobiana, como
379 também pode existir outra substância agindo em sinergismo.

380 No início deste estudo, o isolado de *R. (B.) microplus* foi submetido ao TIL para
381 avaliar o nível de resistência a três classes acaricidas, organofosforado, piretróide e
382 amidina. As larvas foram 100% susceptíveis, enquanto que as teleóginas apresentaram
383 resistência a piretróide (deltametrina), associação de organofosforado e piretróide
384 (ethion e cipermetrina), enquanto apresentaram sensibilidade a amidina (amitraz),
385 associação de organofosforado e piretróide (clorpirifós e cipermetrina) e associação
386 entre organofosforados (diclorvós e clorpirifós). Comparando os testes com
387 fitoterápicos aos testes de susceptibilidade aos acaricidas químicos comerciais, pode-se
388 afirmar de uma forma geral, que as larvas de *R. (B.) microplus* apresentaram-se mais
389 susceptíveis tanto aos acaricidas químicos quanto aos extratos vegetais. No entanto, ao
390 analisar a atividade das plantas, levando em consideração as concentrações utilizadas
391 nos testes de imersão larval e de adultos, este quadro não se repete para todas as
392 espécies avaliadas. Na concentração de 5%, o extrato bruto de *A. hirta* apresentou
393 eficácia no TIL de 9,93%, quando utilizado o mesmo extrato, na mesma concentração
394 no TIA, a eficácia foi de 57%. Neste caso a larva não foi mais sensível do que o adulto.

395 Quando comparada a atividade dos extratos de *A. hirta*, *M. latifolia*, *R.*
396 *grandiflora* e *A. latíssima*, nas concentrações 5, 20 e 40%, contra larvas e adultos de *R.*
397 *(B.) microplus*, observou-se maior ação dos extratos na embriogênese, obtendo-se no

398 TIA uma eficácia do extrato superior ao TIL na concentração de 5%. Este resultado
399 contradiz o fato de larvas de *R. (B.) microplus* serem aparentemente mais susceptíveis
400 tanto a acaricidas químicos, quanto a extratos analisados em diversos trabalhos.

401 Neste trabalho, foi estabelecida a concentração de 40% no TIL, isso se deve ao
402 fato de os compostos secundários das plantas (não essenciais à sobrevivência da planta),
403 serem armazenados em menor quantidade que os compostos primários (essenciais à
404 sobrevivência da planta) (Balandrin, 1985). Kaplan et al. (1994), ao avaliarem a
405 diversidade química de espécies do Cerrado Brasileiro, observaram que as espécies do
406 Cerrado possuem grande número de compostos, mas a quantidade destes compostos é
407 tão pequena que, somente por análise detalhada do perfil fitoquímico poderiam ser
408 identificados. Uma vez que o objetivo deste trabalho era avaliar a atividade acaricida
409 presente nas plantas do Pantanal Sul-mato-grossense para futuramente explorar o
410 composto isolado e não a utilização *in vivo* do extrato bruto a 40%, justifica-se a
411 avaliação de concentrações mais elevadas.

412

413 **5.0 Conclusão**

414 Dezoito extratos apresentam atividade acaricida sobre larvas de *R. (B.)*
415 *microplus* superior a 95% na concentração de 40%, sete extratos na concentração de
416 20% e, apenas o extrato de *Sebastiania hispida*, na concentração de 5%. Quatro plantas
417 apresentaram eficácia inferior a 95% na concentração de 40%, *Randia armata*, *Croton*
418 *glandulosus*, *Hippocratea volubilis* e *Senna obtusifolia*. Dos quatro extratos brutos
419 testados em teleóginas, apenas a espécie *Angelonia hirta* obteve eficácia próximo a 90%
420 e reduziu a eclodibilidade em 80,7%.

421

422 **5.0 Referências bibliográficas**

- 423 Álvarez. V., Loaiza. J., Bonilla. R., Barrios. M., 2008. Control in vitro de garrapatas
424 (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Revista de
425 Biología Tropical, v. 56, n. 1, p. 291-302.
- 426 Andreotti, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus*
427 (*Boophilus*) *microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande: Embrapa Gado de
428 Corte, 2010. 36 p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, 180). Disponível em: <
429 <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC180.pdf> >. Acesso em: 12 maio
430 2012.
- 431 Balandrin, M. F.; Klocke, J. A.; Wurtele, E. S.; Bollinger, W. H.; 1985. Plantas
432 químicas naturais: fontes de materiais industriais e medicinais. Ciência, v. 228 n. 4704.
433 p. 1154-1160.
- 434 Borges. L. M. F., Silva. A. C., Neves. B. P., 1994. Teste “in vitro” de eficácia do
435 cinamomo (*Melia azedarach*, L) sobre fêmeas ingurgitadas do *Boophilus microplus*,
436 Can. (Acari: Ixodidae). Revista de Patologia Tropical, v. 23, n. 2, p. 175-179.
- 437 Borges. L. M. F., Ferri. P. H., Silva. W. J., Silva. W. C., Silva. J. G., 2003. In vitro
438 efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. Medical
439 and Veterinary Entomology, v. 17, n. 2, p. 228-231.
- 440 Broglio-Micheletti, S. M. F. Valente, E. C. N. Souza, L. A. Dias, N. S. Araújo, A. M. N.
441 Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini,
442 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,
443 v. 18, n. 4, p. 44-48, 2009.
- 444 Broglio-Micheletti. S. M. F., Dias. N. S., Valente. E. C. N., Souza. L. A., Lopes. D. O.
445 P., Santos. J. M., 2010. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus*
446 (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Revista
447 Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 46-50.

- 448 Brown. H. A., Minott. D. A., Ingram. C. W., Williams. L. A. D., 1998. Biological
449 activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the
450 Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Science and its Application. v. 18, n.
451 1, p. 9-16.
- 452 Cantrell, C. L. Dayan, F. E. & Duke, S. O., 2012. Natural Products As Sources for New
453 Pesticides. Journal of Natural Products 75, 1231–1242
- 454 Catto. J. B., Bianchin, I., Saito. M., 2009. Efeito acaricida in vitro de extratos de plantas
455 do Pantanal no carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Dados
456 eletrônicos. Embrapa gado de corte 26 p. Disponível em:
457 //www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/bp/BP26. Acesso em: 21 mar. 2011.
- 458 Chagas. A. C., Passos. W. M., Prates. H. T., Leite. R. C., Furlong. J., Fortes. I. C. P.,
459 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus*
460 spp em *Boophilus microplus*. Brazilian Journal of Veterinary Reserch of Animal
461 Science.São Paulo.v. 39, n. 5, p. 247-253.
- 462 Choochote. W.; Chaithong. U.; Kamsuk. K.; Jitpakdi. A.; Tippawangkosol. P.; Tuetun.
463 B.; Champakaew.D.; Pitasawat. P. 2007. Atividade repelente de selecionados óleos
464 essenciais contra *Aedes aegypti*. Fitoterapia. V 18, n 5 , 359-364.
- 465 Chungsamarnyart. N., Jansawan. W., 1996. Acaricidal activity of peel oil of *Citrus* spp.
466 on *Boophilus microplus*. Kasetsart Journal (Natural Science), v. 30, p. 112-117.
- 467 Cordovés. C. O. 1997. Carrapato: controle ou erradicação. Porto Alegre: Guaíba
468 Agropecuária 197p.
- 469 Costa. F. B., Vasconcelos. P. S., Silva. A. M. M., Brandão. V. M., Silva. I. A., Teixeira.
470 W. C., Guerra. R. M. S. N., Santos. A. N. G. 2008. Eficácia de fitoterápicos em fêmeas
471 ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião oeste do Maranhão,
472 Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 17, supl. 1, p. 83-86.

- 473 Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New
474 York: Columbia University Press, 1262p.
- 475 Cronquist, A., 1988. The evolution and classification of flowering plants. Lawrence,
476 Printed by Allen Press, Inc., 555p.
- 477 Drummond, R.O., Ernest. S. E., Trevino. J. L., 1973. *Boophilus annulatus* and *B.*
478 *microplus*: laboratory tests of insecticides. Journal of Economic Entomology, v.66, n.1,
479 p.130-133.
- 480 Facey. P. C., Porter. R. B., Reese. P. B., Williams. L. A., 2005. Biological activity and
481 chemical composition of the essential oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq.
482 Journal of Agricultural Food Chemistry, v. 53, n. 12, p. 4774-4777.
- 483 Falkenberg. M. B.; Santos. R. I.; Simões. C. M. O. 2010. Análise fitoquímica. In:
484 Simões.C. M. O.; Schenkel. E.P.; Gosmann. G.; Mello. J. C. P.; Mentz. L. A.;
485 Petrovick. P. R. 2010. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. UFSC.
- 486 Ferraz. A. B. F., Balbino. J. M., Zini. C. A., Ribeiro. V. L., Bordignon. S. A., von Poser.
487 G., 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three
488 Piper species. Parasitology Research, v. 107, n. 1, p. 243-248.
- 489 Furlong. J., Prata. M. C. A., Martins. J. R., 2007. O carrapato dos bovinos e a
490 resistência: temos o que comemorar? A Hora Veterinária, v.27, n.159, p. 26-32.
- 491 Gandhi.E. & Rahuman. A.A. 2010. Avaliação de extratos de plantas medicinais contra
492 carrapatos e vermes. Parasitology Research.
- 493 Giglioti, R.; Forim, M. R.; Oliveira, H. N.; Chagas, A. C.; Ferrezini, J.; Brito, L.G.;
494 Falcoski, T. O.; Albuquerque, L. G.; Oliveira, M. C.; 2011. In vitro acaricidal activity of
495 neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against
496 *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology 181, 309– 315.

- 497 Gobbo-Neto. L. & Lopes. N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no
498 conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 374-381.
- 499 Gomes. A., 2000. Carrapato-de-boi prejuízos e controle. Embrapa gado de corte
500 divulga. N. 42. Disponível em:
501 <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/sala/artigos/artigolinha.php?id=25>. Acesso em: 12
502 mar. 2011.
- 503 Gomes. A. Koller. W. W. Barros. I. A. T. M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus*
504 (*Boophilus*) *microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciência Rural*,
505 Santa Maria, v.41, n.8, p.1447-1452, 2011.
- 506 Grisi, L.; Massard, C. L; Moya-Borja, G. E; Pereira, J. B., 2002. Impacto econômico
507 das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125,
508 p. 8-10.
- 509 Hernández. L., Parra. D., Ahumada. A., 1989. Actividad repelente y acaricida del aceite
510 y algunas fracciones cromatograficas del pasto *Melinis minutiflora* frente al *Boophilus*
511 *microplus*. *Revista Colombiana de Ciencias Quimico Farmaceuticas*, n. 17, p. 45-50.
- 512 Holdsworth PA, Kemp D, Green P, Peter RJ, de Bruin C, Jonsson NN et al. World
513 Association for the Advacement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) Guidelines
514 for evaluating the efficacy of acaricides agaist ticks (Ixodidade) on ruminants.
515 *Veterinary Parasitology*, 136: 29-43. 2006.
- 516 Honda, N. K.; Garcez, W. S.; Garcez, F. R.; Conceição, C. A. 1990. Estudo químico de
517 plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. *Revista Científica e Cultural*
518 UFMS, v. 5, p. 37-46.
- 519 Kamaraj. C., Rahuman. A. A., Bagavan. A., Elango. G. G., Rajakumar. G., Zahir. A. A.,
520 Marimuthu.S., Santhoshkumar. T., JayaseelanC., 2010. Evaluation of medicinal plant

- 521 extracts against blood-sucking parasites. *Parasitology Research*, v. 106, n. 6, p. 1403-
522 1412.
- 523 Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R. & Gottlieb, O. R. 1994. Chemical diversity of
524 plants from Brazilian Cerrados. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 66 (Supl. 1 -
525 parte I): 50-55.
- 526 Koller, W. W.; Gomes, A.; Barros, A. T. M.; Diagnóstico da Resistência do Carrapato-
527 do-boi a Carrapaticidas em Mato Grosso do Sul. (Boletim de Pesquisa e
528 Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-9715; 25)
- 529 Lewis, J. R. 1983. Biological Activity of some Rutaceous Compounds”; in: “Chemistry
530 and Chemical Taxonomy of the Rutales” (Waterman P.G. and Grundon, M. F. Oeds.),
531 Academic Press, London, págs. 301-18.
- 532 Magadum. S., Mondal. D. B., Ghosh. S., 2009. Comparative efficacy of *Annona*
533 *squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar
534 isolate. *Parasitology Research*, v. 105, n. 4, p. 1085-1091.
- 535 Martinez. S. t.; Kaiser. C. R.; Pinto. A. C. 2009. Estudo Fitoquímico de três espécies do
536 gênero *Crotalaria*. ¹ Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Centro
537 de Tecnologia, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira
538 de Química.
- 539 Martins. J. R. S., Furlong. J., Leite. R. C., 2006. Controle de carrapatos. In: Barros-
540 Battesti. D. M. B., Arzua. M., Bechara. G. H., (Org). Carrapatos de importância
541 médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para identificação de
542 espécies. São Paulo: Instituto Butantam, p. 145-153.
- 543 Melo. A. M. 2003. Estudo fitoquímico e biológico da *Hyptis mutabilis* salz:
544 (Lamiaceae). http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/estudo-

- 545 fitoquimico-biologico-da-hyptis-mutabilis-salz-lamiaceae/id/36760044.html. Acesso em
546 21 de dezembro de 2012.
- 547 Nissanka, A. P., V. Karunaratne, B. M. Bandara, V. Kumar, T. Nakanishi, M. Nishi, A.
548 Inada, L. M. Tillekeratne, D. S. Wijesundara, and A. A. Gunatilaka. 2001.
549 Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*.
550 *Phytochemistry* 56: 857- 861.
- 551 Newman, D. J. & Cragg, G. M. 2012. Produtos naturais como fontes de novas drogas
552 ao longo dos 30 anos de 1981-2010. *Journal of Natural Products*, 75 (3) :311-35.
- 553 Neto. G.G, & Morais. R. G. 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato
554 Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta botânica brasílica*. 17(4): 561-584.
- 555 Paiva, P. M. G.; Souza, A. F.; Kennedy, J. F.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B. B.;
556 Sampaio, C. A. M.; Oliva, Maria Luiza Vilela. 2008. Isolation of a trypsin inhibitor
557 from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized
558 *Cratylia mollis* isolectins. *Journal of Chemical Ecology* .34:681–687.
- 559 Porter, R.B.R.; Reese, P.B.; Williams L.A.D. Acaricidal and inseticidal activities of
560 Candina-4,10(15)-dien-3-one. *Phytochemistry*, v.40, n.3, p.735-738, 1995.
- 561 Prance. G. T. & Schaller. G. B. 1982. Preliminary study of some vegetation types of the
562 Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Brittonia*, 34(2), p. 228-251.
- 563 Pereira. J. R., Famadas. K. M., 2004. Avaliação “*in vitro*” da eficiência do extrato da
564 raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (Leguminosae, Papilionoidae, Millettiedae)
565 sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) na região do Vale do Paraíba, São Paulo,
566 Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 4, p. 443-450.
- 567 Ribeiro. V. L. S., Ribeiro. V. L. ., Toigo. E. , Bordignon. S. A. , Gonçalves. K., von
568 Poser. G., 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum*

- 569 *polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 147,
570 n. 1-2, p. 199-203.
- 571 Ribeiro. V. L. S., Avancini. C., Gonçalves. K., Toigo. E., von Poser. G., 2008a.
572 Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and
573 *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v. 151, n. 2-4, p. 351-354.
- 574 Ribeiro. V. L. S., Rolim. V., Bordignon. S., Henriques. A. T., Dorneles. G. G.,
575 Limberger. R.P. von poser. G., 2008b. Chemical composition and larvicidal properties
576 of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick
577 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*.
578 *Parasitology Research* 102:531–535.
- 579 Ribeiro. V. L. S. Santos. J. P., Martins. J. R., Schripsema. J. S., Siqueira. I. R., Von
580 Poser. G. L., Apel. M. A., 2011. Acaricidal properties of the essential oil and precocene
581 II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus*
582 *(Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 179,195–198.
- 583 Ribeiro. V. L. S.; Vanzella. C.; Moysés. F. S.; Santos. G. C.; Martins. J. R. S.; von
584 Poser. G. L.; Siqueira. I. R. 2012. Efeito de *Calea serrata* Less. n -hexano em extracto
585 da acetilcolinesterase de carrapatos larvas e cérebro de ratos Wistar. *Veterinary*
586 *Parasitology*.Volume 189, Issues 2-4 , 322-326.
- 587 Rosado-Aguilar. J. A., Aguilar-Caballero. A., Rodriguez-Vivas. R. I., Borges-Argaez.
588 R., Garcia-Vazquez.. Z., Mendez-Gonzalez. M., 2010. Acaricidal activity of extracts
589 from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus*
590 *(Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology* 168, 299–303.
- 591 Silva. W. C., Martins. J. R., de Souza. H. E., Heinzen. H., Cesio. M. V., Mato.
592 M., Albrecht. F., de Azevedo. J. L., de Barros.N. M., 2009. Toxicity of *Piper aduncum*

- 593 L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus*
594 (*Boophilus microplus*) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 164 267–274.
- 595 Shaw, R. D., 1966. Culture of an organophosphate resistant strain of *Boophilus*
596 *microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. *Bulletin of*
597 *Entomological Research* 56 four, pp 398-405.
- 598 Simões. K.; Jiang Du.; Kretzschmar. F. S.; Broeckling. C. D.; Stermitz. F. S.; Vivanco.
599 J. M.; Braga.M. R.2008. Phytotoxic Catechin Leached by Seeds of the Tropical Weed
600 *Sesbania virgata*. *Journal of Chemical Ecology*. 34:681–687.
- 601 Soares, A.O., 2006. Estudo fitoquímico das flores e casca do caule de um espécime de
602 *Tabebuia caraíba* (Bignoniacea) coletado na região do Cerrado em Mato Grosso do Sul.
603 Mestrado em Química, Campo Grande, MS.
- 604 Soares, M T. S.; Soriano, B. M. A.; Santos, S. A.; 2009. Monitoramento do
605 Comportamento do Rio Paraguai no Pantanal Sul- Mato-Grossense – 2008/2009.
606 Comunicado Técnico 80. Corumbá, MS
- 607 Sousa. L. A. D., Soares. S. F., Pires Júnior. H. B., Ferri. P. H., Borges. L. M. F., 2008.
608 Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo
609 (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).
610 *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 36-40.
- 611 Srivastava. R., Ghosh. S., Manda. D. B., Azhahianambi.P., Singhal. P. S., Pandey. N.N.,
612 Swarup. D., 2008. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*.
613 *Parasitology Research*, v. 104, n. 1, p. 149-153.
- 614 Valente. M., Barranco, A., Sellaive-Villaroel. A. B., 2007. Eficácia do extrato aquoso
615 de *Azadirachta indica* no controle de *Boophilus microplus* em bovino. *Arquivo*
616 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 5, p. 1341-1343.

- 617 Vivan. M. P., 2005. Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos
618 agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). 72 f. Dissertação
619 (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 620 Williams. L. A. D., 1993. Adverse effects of extracts of *Artocarpus altilis* Park and
621 *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick,
622 *Boophilus* (Canest.), *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 23, n. 2-3, p. 159-
623 164.
- 624 Zahir. A. A., Rahuman. A. A., Kamaraj. C., Bagavan. A., Elango. G., Sangaran.
625 A., Kumar. B. S., 2009. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant
626 extracts for parasites control. *Parasitology Research*, v. 105, n. 2, p. 453-461.

Quadro 1- Plantas coletadas na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul, utilizadas no Teste de imersão larval (TIL) e Teste de imersão de adulto (TIA), famílias, partes das plantas coletadas e classes de substâncias já encontradas na literatura.

Espécie	Família	Nome Popular	Parte coletada
<i>Aeschynomene denticulata</i>	Leguminosae	Angiquinho	PA/FL/FR
<i>Angelonia hirta</i>	Scrophulariaceae	-	PA/FL/FR
<i>Aspilia latissima</i>	Asteraceae	Mirassol; fumeiro	FO
<i>Caperonia castaneifolia</i>	Euphorbiaceae	Castanheiro-do-brejo	PA/FL
<i>Centratherum punctatum</i>	Asteraceae	Balaio-de-velho	PA/FL
<i>Crotalaria micans</i>	Leguminosae	Guizo-de-cascavel	PA/FL/FR
<i>Croton glandulosus</i>	Euphorbiaceae	Anxuma	PA/FL
<i>Diodia kuntzei</i>	Rubiaceae	-	PT/FL
<i>Echinodorus paniculatus</i>	Alismataceae	Chapéu-de-couro	PA/FL
<i>Hippocratea volubilis</i>	Hippocrateaceae	Cipó borracha	RF/FO
<i>Hyptis mutabilis</i>	Lamiaceae	Betônica-brava	PA/FL
<i>Lantana canescens</i>	Verbenaceae	Camara e Cidreira	PA/FL
<i>Melanthera latifolia</i>	Asteraceae	-	PA/FL
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	Lauraceae	Canela-preta	RF/FO
<i>Randia armata</i>	Rubiaceae	Limão-bravo	RF/FO/FR
<i>Richardia grandiflora</i>	Rubiaceae	Trevo-mexicano	PA/FL
<i>Sebastiania hispida</i>	Euphorbiaceae	Mercúrio	PA
<i>Sesbania virgata</i>	Fabaceae	-	RF/FO & FR
<i>Senna obtusifolia</i>	Leguminosae	Fedegoso	PA/FL/FR
<i>Tocoyena formosa</i>	Rubiaceae	Genipapinho	RF/FO
<i>Zanthoxylum rigidum</i>	Rutaceae	Mama de cadela	RF/FO

Abrev.: RF: ramos finos PA: parte aérea (inclui folha, ramo fino e caule); PT: parte total (inclui raiz-folha-ramos finos); FL: flor; FR: fruto; FO: folha; CAS: casca &: as partes foram coletadas separadamente.

Tabela1- Percentual da média de eficácia do Teste de imersão larval (TIL) em três concentrações, realizado em triplicata sobre larvas de *R. (B.) microplus*.

Espécie	Parte coletada	Concentrações		
		5%	20%	40%
<i>Aeschynomene denticulata</i>	PA/FL/FR	2	100	100
<i>Angelonia hirta</i>	PA/FL/FR	9,93	97,26	100
<i>Aspilia latissima</i>	FO & RA	5,84	46,14	97,88
<i>Caperonia castaneifolia</i>	PA/FL	15,16	61,45	100
<i>Centratherum punctatum</i>	PA/FL	1,74	98,3	100
<i>Crotalaria micans</i>	PA/FL/FR	4,7	75	100
<i>Croton glandulosus</i>	PA/FL	9,23	12,16	45,97
<i>Diodia kuntzei</i>	PT/FL	11,07	88,53	100
<i>Echinodorus paniculatus</i>	PA/FL	5,21	100	100
<i>Hippocratea volubilis</i>	RF/FO	4	43	84
<i>Hyptis mutabilis</i>	PA/FL	5	78	95
<i>Lantana canescens</i>	PA/FL	22,27	63,82	99,63
<i>Melanthera latifolia</i>	PA/FL	2,93	76,49	100
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	RF/FO	5	64	98
<i>Randia armata</i>	RF/FO/FR	25	28	75
<i>Richardia grandiflora</i>	PA/FL	4	39	100
<i>Sebastiania hispida</i>	PA	99,11	100	100
<i>Sesbania virgata</i>	RF/FO	3,16	46,01	96,52
<i>Sesbania virgata</i>	FR	84,26	98,69	100
<i>Senna obtusifolia</i>	PA/FL/FR	11	20	40
<i>Tocoyena formosa</i>	RF/FO	5	35	95
<i>Zanthoxylum rigidum</i>	RF/FO	3	99	100

Abrev.: RF: ramos finos PA: parte aérea (inclui folha, ramo fino e caule); PT: parte total (inclui raiz-folha-ramos finos); FL: flor; FR: fruto; FO: folha; CAS: casca &: as partes foram coletadas separadamente.

Tabela 2- Médias de peso das teleóginas de *Rhipicephalus (B.) microplus*, do peso da ovipostura, da eclodibilidade e eficiência acaricida de extratos brutos de plantas do Pantanal Sul-mato-grossense no Teste de imersão de adultos (TIA). Teste realizado em duplicata, 10 fêmeas por grupo.

Teste de Imersão de Adulto			
<i>Angelonia hirta</i>		<i>Melanthera latifolia</i>	
Concentração %	Média de Eficácia	Concentração %	Média de Eficácia
40%	88	40%	73
20%	85	20%	35
10%	77	10%	32
5%	57	5%	17,4
2.50%	40	2.50%	19
1,25%	17	1,25%	17
0,63%	8	0,63%	0
0,31%	6	0,31%	0
Controle +	100	Controle +	100
Controle -	0	Controle -	0
<i>Richardia grandiflora</i>		<i>Aspilia latissima</i>	
Concentração %	Média de Eficácia	Concentração %	Média de Eficácia
40%	63	50%	76
20%	53	25%	52
10%	30	12,50%	23
5%	18	6,25%	27
2.50%	7	3,13%	17
1,25%	8	1,56%	8
0,63%	2	0,78%	15
0,31%	0	0,39%	6
Controle +	100	Controle +	100
Controle -	0	Controle -	0

Capítulo II - Artigo II

A ser submetido na revista Veterinary Parasitology

Determinação da ação acaricida de frações polares e apolares de 20 extratos hidroalcoólicos de plantas do Pantanal Sul-mato-grossense

Santos, L. B.^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

* Autor correspondente

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Avenida Senador Filinto Müller 2443, Ipiranga, Caixa Postal 549

CEP: 79074-460 Campo Grande-MS

larissamedvet@hotmail.com

Abstract: During the evaluation of plant extracts it is possible to identify and quantify the compounds potentially bioactive and analyze then separated. One plant can show more than one bioactive compound, that can have separately activity or in combination. Generally the crude extract or essential oil is more activity than the solitary compound from these. The scientific proof of the use of herbal medicine is required by the variety plants found in Brazilian biome. For that reason of this study was to determine the acaricidal action of polar and non-polar fractions of plants in Pantanal sul mato-grossense. Were evaluated and characterized plant species, *Sesbania virgata* (leaves and twigs) and (fruits), *Centratherum punctatum*, *Lantana canescens*, *Melanthera latifolia*, *Polygala molluginifolia*, *Aeschynomene denticulata*, *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Crotalaria micans*, *Senna obtusifolia*, *Tocoyena formosa*, *Zanthoxylum rigidum*, *Richardia grandiflora*, *Hyptis mutabilis* e *Angelonia hirta*,

27 belonging to the Bank extracts of plant species found in Pantanal- Herbarium CG-MS/
28 UFMS. Of the forty fractions tested only one polar fraction (*R.armata*) and four non-
29 polar fractions (*R. grandiflora*, *H. mutabilis* e *Z. rigidum*) show acaricidal activity
30 effectively over than 95% on larval of *R. (B.) microplus*.

31 **Keywords:** ox tick, compound bioactive, polyherbal, in vitro.

32

33 **Resumo:** Durante a avaliação dos extratos vegetais, é possível identificar e quantificar
34 os compostos possivelmente bioativos e analisá-los separadamente. Uma planta pode
35 apresentar mais de um composto bioativo, que podem ter atividade separada ou em
36 associação. Geralmente o extrato bruto ou o óleo essencial é mais ativo do que o
37 composto isolado a partir destes. A validação de fitoterápicos é uma etapa inicial
38 obrigatória. A comprovação científica do uso de fitoterápicos é necessária mediante a
39 diversidade de plantas encontradas nos biomas brasileiros. Por isso o objetivo deste
40 trabalho foi determinar a ação acaricida de frações polares e apolares de plantas do
41 Pantanal Sul-mato-grossense. Foram avaliadas e caracterizadas as espécies vegetais,
42 *Sesbania virgata* (folha e ramos finos) e (fruto), *Centratherum punctatum*, *Lantana*
43 *canescens*, *Melanthera latifolia*, *Polygala molluginifolia*, *Aeschynomene denticulata*,
44 *Echinodorus paniculatus*, *Caperonia castaneifolia*, *Crotalaria micans*, *Senna*
45 *obtusifolia*, *Tocoyena formosa*, *Zanthoxylum rigidum*, *Richardia grandiflora*, *Hyptis*
46 *mutabilis* e *Angelonia hirta*, pertencentes ao Banco de extratos de espécies vegetais
47 encontradas no Pantanal- Herbário CG-MS/ UFMS. Das 40 frações testadas uma fração
48 polar (*R. armata*) e quatro frações apolares (*R. grandiflora*, *H. mutabilis* e *Z. rigidum*)
49 apresentam atividade acaricida com eficácia média superior a 95% sobre larvas de *R.*
50 (*B.*) *microplus*.

51 **Palavras-chave:** carrapato bovino, composto bioativo, fitoterápico, in vitro

52

53 **1.0 Introdução**

54 O carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, dentre todos os
55 parasitas que acometem bovinos no país, é o que mais causa prejuízo econômico (Grisi
56 et al. 2002). Alguns fatores relacionados ao parasitismo por *R. (B.) microplus* são
57 limitantes à pecuária bovina, como anemia, diminuição na resposta imune, supressão do
58 apetite e diminuição no ganho de peso (Jonsson, 2006), baixa na taxa de conversão
59 alimentar e fertilidade (Grisi et al. 2002) e transmissão de patógenos (Furlong, 2005).

60 A pesquisa conduzida com o uso de extratos vegetais, óleos essenciais e frações
61 ativas de plantas, tem se tornado uma constante na procura de uma substância com ação
62 acaricida (Agnolin et al. 2010) e tornando-se uma importante ferramenta como
63 alternativa a toda cadeia produtiva bovina (Marinho et al. 2007). Esse tipo de estudo
64 caracteriza a importância na legitimação de novos parasiticidas (Cantrell et al. 2012).

65 Durante a avaliação dos extratos vegetais, é possível identificar e quantificar os
66 compostos possivelmente bioativos e analisá-los separadamente (Chagas et al. 2012).
67 Uma planta pode apresentar mais de um composto bioativo, que podem ter atividade
68 separada ou em associação. Geralmente o extrato bruto ou o óleo essencial é mais ativo
69 do que o composto isolado a partir destes (Ribeiro et al. 2011). A validação de
70 fitoterápicos é uma etapa inicial obrigatória (Costa et al. 2002).

71 De uma mesma planta, os compostos extraídos e a sua ação podem variar
72 conforme disponibilidade nas diferentes partes dessa planta (Pivoto et al. 2010), como
73 em caules e folhas (Ribeiro et al. 2011), sementes (Giglioti et al. 2011) e metabólitos
74 secundários extraídos das plantas (D'Alessandro, 2008; Ribeiro et al. 2011). Alguns
75 compostos em pequenas proporções podem impedir a atividade de outros compostos

76 bioativos, apresentar sinergismo com substâncias que sozinhas não produziram
77 atividade, ou até mesmo ser a fração mais eficaz (Pontes et al. 2007).

78 Um exemplo disso é o óleo essencial de *Calea serrata*, que é mais ativo em
79 comparação ao composto isolado Prococeno II da mesma planta (Ribeiro et al. 2011).
80 Assim como o extrato bruto pode ser mais ativo do que o composto isolado, também
81 podem existir diferentes níveis de atividade entre as diferentes partes da planta, ter ou
82 não o composto ativo, como no caso da *Simarouba versicolor* com substância acaricida
83 ativa na raiz da planta enquanto nas flores e folhas essa substância é inexistente (Catto
84 et al. 2009).

85 Basicamente a extração de compostos bioativos de plantas segue um mesmo
86 padrão: coleta de matéria-prima, identificação botânica, secagem, congelamento,
87 liofilização, processo de extração, análise cromatográfica, isolamentos de compostos
88 ativos, purificação, fracionamento e avaliação da toxicidade (Sahoo et al. 2010).

89 Para obtenção do extrato hidroalcoólico podem ser utilizadas várias
90 metodologias, mas a mais comumente utilizada para a análise químico-farmacológica é
91 realizada com 50% de água e 50% de etanol.), o etanol a 70 % também é muito
92 utilizado em percolações, por ser um o um solvente capaz de extrair uma ampla
93 variedade de compostos (Quan & Turner, 2009). Com este extrato bruto são realizados
94 testes biológicos e caso haja atividade positiva, o solvente a ser utilizado é o metanol,
95 pois este permite a extração de mais compostos. Posteriormente é realizada uma
96 partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes com a finalidade de
97 uma semi-purificação das substâncias por meio das polaridades dos solventes utilizados.
98 As frações obtidas nesta semi-purificação devem ser utilizados em testes biológicos e
99 caso haja atividade positiva deverá passar por procedimentos cromatográficos com o
100 intuito de isolar e purificar os compostos (Cechinel Filho, 1998).

101 A comprovação científica do uso de fitoterápicos é extremamente relevante e
102 necessária mediante a diversidade de plantas que possuem os biomas brasileiros. Em
103 virtude dos poucos os estudos realizados no estado de Mato Grosso do Sul, foram
104 avaliadas no presente trabalho, as frações polares e apolares de 20 plantas do Pantanal
105 Sul-matogrossense.

106

107 **2.0. Materiais e métodos**

108 **2.1. Isolado de *R. (B.) microplus***

109 Foi utilizado um isolado de campo resistente a piretróide (deltametrina) e,
110 associação de organofosforado e piretróide (ethion e cipermetrina), sensível a amidina
111 (amitraz), associação de organofosforado e piretróide (clorpirifós e cipermetrina),
112 associação de organofosforado e organofosforado (diclorvós e clorpirifós), oriundo da
113 Universidade Federal de Uberlândia, cedida pela Embrapa Gado de Corte. Para sua
114 manutenção, foram inoculadas 5000 larvas de *R. (B.) microplus* semanalmente em um
115 bezerro, que foi previamente desparasitado e permaneceu no setor de isolamento animal
116 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

117 As teleóginas foram coletadas principalmente no início da manhã e final da
118 tarde, foram lavadas e colocadas com o dorso para baixo em placas de petri e levadas a
119 uma estufa B.O.D. por 18 dias em 27° C ±1 e URA (umidade relativa) de 80%. Após
120 este período (0,25 gramas de ovos) foram pesados e mantidos também em B.O.D. em
121 seringas adaptadas, para inoculação semanal do isolado.

122 Todos os procedimentos cumpriram com os requisitos da biossegurança, ética e
123 bem-estar na pesquisa animal, preconizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da
124 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o processo nº 410/2012.

125

126 2.2. Material vegetal e análise química

127 Foram avaliadas no presente trabalho, frações polares e apolares de 20 plantas
128 Pantanal Sul-mato-grossense, com o intuito de verificar em qual fração se encontra o
129 composto bioativo. Estas espécies pertencem a 12 famílias, Alismataceae (*Echinodorus*
130 *paniculatus*), Asateraceae (*Melanthera latifolia* e *Centratherum punctatum*),
131 Euphorbiaceae (*Sebastiania hispida* e *Caperonia castaneifolia*), Fabaceae (*Sesbania*
132 *virgata* - ramos finos e folha; fruto), Hippocrateaceae (*Hippocratea volubilis*),
133 Lamiaceae (*Hyptis mutabilis*), Leguminoseae (*Aeschynomene denticulata*, *Crotalaria*
134 *mican* e *Senna obtusifolia*), Rubiaceae (*Tocoyena formosa*, *Richardia grandiflora*,
135 *Randia armata* e *Diodia kuntze*), Rutaceae (*Zanthoxylum rigidum*), Polygalaceae
136 (*Polygala molluginifolia*), Scrophulariaceae (*Angelonia hirta*) e, Verbenaceae (*Lantana*
137 *canescens*), com autorização de acesso e de remessa de amostra de Componente do
138 Patrimônio Genético nº 010457/2010-0.

139 Os extratos foram obtidos por meio de um extrator de solvente acelerado (ASE)
140 (DIONEX®) (ASE 150) utilizando nitrogênio como gás pressurizador em células de
141 cinco e 100 mL, dependendo da quantidade do material vegetal seco. Os extratos
142 aquosos foram desidratados em um liofilizador (CHRIST®) (Alpha 2-4 LDplus). Os
143 solventes empregados nas extrações foram de grau analítico, ou seja, solvente puro
144 (etanol, acetona e hexano). A extração do material vegetal foi realizada por meio dos
145 métodos descritos a seguir:

- 146 • **Método Bruto:** solvente: etanol/água destilada (7:3), 100° C, 1.600 psi, um
147 ciclo, tempo estático 5 min, 60 % lavagem, 50 seg de purga.
- 148 • **Método FAT (Fração Apolar):** solvente: hexano/acetona (4:1), 125° C, 1.600
149 psi, três ciclos, tempo estático 5 min, 100 % lavagem, 60 seg de purga;

- 150 • **Método POL (Fração Polar):** solvente: etanol/água destilada (7:3), 125° C,
151 1.600 psi, dois ciclos, tempo estático 5 min, 80 % lavagem, 60 seg de purga.

152 Os extratos obtidos por meio dos métodos Bruto e FAT foram concentrados e
153 secos em evaporador rotativo, obtendo materiais de caráter viscoso. O extrato obtido
154 através do método POL foi concentrado em evaporador rotativo e depois liofilizado,
155 obtendo um material em pó. Estes foram armazenados em frascos Falcon® identificados
156 e vedados e mantidos a -20° C. O termo FAT se refere ao extrato apolar extraído com
157 hexano/acetona 4:1 e POL ao extrato polar extraído com H₂O/Etanol 7:3.

158

159 **2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/DAD)**

160 Foi realizada a técnica de CLAE-UV/DAD no extrato apolar da espécie *S.*
161 *hispid*a com o intuito de analisar o perfil cromatográfico da espécie. A análise
162 cromatográfica foi realizada em uma coluna C-18, foram monitorados os comprimentos
163 de onda: 202, 210, 230, 270 e 325 nm. Esta amostra foi diluída em MeOH/H₂O (1:1),
164 foi obtida a concentração de 2 mg/ml, em seguida foram filtradas e o volume de injeção
165 na coluna (CLAE) foi de 20 µL. Foram selecionados no comprimento de onda de 325
166 nm, juntamente com os espectros de UV dos picos majoritários.

167

168 **2.4. Teste de imersão larval (TIL) - Shaw (1996)**

169 O procedimento com as teleóginas ocorreram conforme indicado no item 2.1.
170 Após este período (0,025 grama de ovos) foram pesados e mantidos também em B.O.D.
171 em tubos tipo eppendorf, com capacidade de 2 ml. Este tubo foi adaptado com um furo
172 na tampa para que houvesse passagem de ar e injeção dos tratamentos.

173 As espécies *D.kuntzei*, *S. hispid*a, *H. volubilis* e *R. armata*, foram avaliadas
174 primeiramente na versão extrato bruto, e era conhecido seu rendimento em relação a

175 planta pulverizada. As concentrações dos extratos polares e apolares destas plantas
176 variaram de acordo com o enriquecimento destes extratos na extração pelos métodos
177 FAT e POL (métodos de extração direta que resulta num extrato concentrado).
178 Dividindo o valor da concentração ativa (40%) no teste preliminar de três
179 concentrações, pelo número de vezes que o extrato foi enriquecido durante o
180 fracionamento de polar e apolar, obtinha-se o valor da nova concentração tanto para
181 fração polar quanto apolar.

182 Com as demais espécies e respectivas frações polares e apolares, obtidas
183 diretamente no extrator sem a realização de extrato bruto, foi realizado TIL utilizando a
184 concentração de 13%, em triplicata. Esta concentração foi obtida mediante média de
185 enriquecimento que houve nos extratos *D.kuntzei*, *S. hispida*, *H. volubilis* e *R. armata*.
186 Embora esta concentração utilizada igualmente para as duas frações, possa favorecer
187 mais uma fração do que outra, pois o enriquecimento de cada fração assim como para
188 cada espécie é diferente.

189 Cinco das frações que se destacaram foram submetidas ao TIL com dez
190 concentrações seriadas de *S. virgata* (fruto), *E. paniculatus* e *R. armata* foi utilizada a
191 fração apolar, enquanto que de *A. hirta* e *C. micans* foi utilizada a fração apolar. Estas
192 frações não foram as mais eficazes, entretanto, foram as espécies que disponibilizavam
193 quantidade de extrato suficiente para realização de um novo teste.

194 O TIL foi realizado em triplicata com uma concentração e na fase seguinte em
195 concentrações seriadas com os extratos que apresentaram eficácia elevada. Os diluentes
196 empregados nas avaliações *in vitro* foram determinados pela polaridade e solubilidade
197 em água dos extratos brutos. Foram utilizados, etanol a 20%, Tween 80 a 5% e água
198 destilada em todas as diluições dos 22 extratos.

199 Imediatamente após a adição de 1 ml de extrato diluído nos tubos de eppendorf
200 contendo cerca de 500 larvas (0,025 gramas de ovos), o tubo foi fechado e agitado
201 vigorosamente durante alguns segundos e depois a 20 rpm em mesa agitadora(Marca -
202 Q225M) durante 10 minutos. Após os 10 minutos de imersão, as larvas foram colocadas
203 em envelopes de papel filtro com o auxílio de um pincel, presas com prendedores de
204 papel e mantidas em 27° C ± 1 e URA (umidade relativa) de 80%. Após 24 horas foram
205 contadas as larvas vivas e mortas. Para cada teste, foi utilizado um controle positivo
206 (cipermetrina, diclorvós e citronelal na concentração recomendada pelo fabricante) e um
207 controle negativo (etanol a 20%, tween 80 a 5% e água destilada).

208 Não foi possível realizar o TIL com dez concentrações seriadas a todas as
209 frações que obtiveram eficácia elevada, pois seria necessária uma nova coleta das
210 plantas para extração das frações, levando em consideração a necessidade de maior
211 quantidade de planta pulverizada para extração da fração apolar, a qual possui um
212 rendimento muito baixo em relação à quantidade de pó utilizado. A nova coleta só seria
213 possível nas mesmas condições em que foi coletada pela primeira vez, mesma época do
214 ano e no mesmo local.

215

216 **2.5. Análise estatística**

217 Foi avaliado o efeito dos extratos sobre as larvas de *R. (B.) microplus*. Para o
218 cálculo da eficácia sobre as larvas utilizou-se:

219 $E\% = \left[\frac{\text{Média de larvas mortas}}{\text{Média de larvas vivas} + \text{Média de larvas}} \right] \times 100$
220 mortas)] x 100

221 Os valores das concentrações foram transformados logaritmicamente e as
222 médias de contagens de larvas vivas foram expressas como percentual da frequência
223 (normalização). Foram construídas curvas sigmóides de regressão não linear da relação

224 dose x resposta destes dados transformados e normalizados ($Y = \log Y$). Utilizando-se
225 estes valores, foi calculada a concentração letal média (CL50) requerida para matar
226 50% das larvas por meio da seguinte equação: $Y=100(1+10^{((\text{Log CE50} - X))}$, em que:
227 $X=$ logaritmo (base 10) da concentração e $Y=$ número de larvas. Todas as análises
228 foram realizadas empregando o programa GraphPad Prism.Version 5.03 (GraphPad
229 Software, San Diego, California,. USA, <http://www.graphpad.com>). Para avaliar a
230 qualidade da curva, foi calculado o fator de determinação (R^2).

231 O critério de avaliação dos extratos foi estabelecido, de acordo com as diretrizes
232 da Associação Mundial para o Avanço da Veterinária Parasitologia (WAAVP)
233 (HOLDSWORTH et al., 2006), para avaliar a eficácia de acaricidas, eficácia superior a
234 95%.

235

236 **3.0. Resultados**

237 As eficácias das frações polares e apolares, em uma concentração, provenientes
238 de um extrato bruto hidroalcoólico de plantas que apresentaram elevada atividade
239 acaricida em testes preliminares, estão apresentadas na Tabela 1.

240 *Diodia kuntzei* e *Hippocratea volubilis* haviam apresentado eficácia no extrato
241 bruto, porém, quando realizado o fracionamento em extratos polar e apolar, não foi
242 observado efeito acaricida.

243 *Sebastiania hispida* e *Randia armata* apresentaram percentuais de eficácia apenas
244 nas porções apolares, 72% e 97%, respectivamente.

245 As eficácias das frações polares e apolares, obtidas diretamente em extrator sem
246 a realização de extrato bruto, em uma concentração, estão apresentadas na Tabela 2.

247 *Zanthoxylum rigidum* e *Hyptis mutabilis*, ambas as frações apolares,
248 apresentaram eficácia média de 98%. Quando testados na forma de extrato bruto,
249 obtiveram eficácia de 100 % e 95% respectivamente na concentração de 40%.

250 *Tocoyena formosa* apresentou eficácia menor em comparação ao extrato bruto,
251 obteve na fração polar eficácia de 77%, quando avaliado o extrato bruto da planta, a
252 eficácia foi de 95%.

253 *Richardia grandiflora* também obteve eficácia reduzida em relação ao extrato
254 bruto apresentando 82% de eficácia na fração polar.

255 A planta *S.virgata* foi avaliada nas frações polares e apolares do extrato de seus
256 frutos e do extrato de ramos finos e folhas. A fração eficaz foi a fração polar do extrato
257 de frutos, com 75% de eficácia. Quando avaliado o extrato bruto do fruto dessa espécie,
258 a eficácia variou de 84,3% a 100% entre as concentrações de 5% e 40%
259 respectivamente.

260 A espécie *Centraterum punctatum* obteve 100% de eficácia na concentração de
261 40% do extrato bruto, no entanto não refletiu a mesma eficácia quando fracionada em
262 polar e apolar. O mesmo ocorreu com as espécies *Lantana canescens* e *Melanthera*
263 *latifolia*.

264 Garcia et al. (2012) utilizaram o óleo de *Tagetes minuta*, planta também
265 pertencente à família Asteraceae, sobre larvas e adultos de *R. (B.) microplus* e também
266 sobre outras espécies de carrapatos, *R. sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Argas*
267 *miniatus*, a eficácia foi superior a 95% na concentração de 20% para todas as espécies
268 de carrapatos avaliadas.

269 A espécie *Polygala molluginifolia* não foi avaliada quanto ao extrato bruto, mas
270 obteve 43% de eficácia concentrada na fração apolar. *Aeschynomene denticulata* obteve

271 na fração polar 74% de eficácia, reflexo do que foi obtido no teste com extrato bruto,
272 100% na concentração de 40%.

273 As espécies *Echinodorus paniculatus* e *Caperonia castaneifolia* não
274 apresentaram eficácia nas frações polares e apolares. A espécie *Senna obtusifolia* não
275 obteve eficácia nas frações polar e apolar, bem como no extrato bruto da planta.

276 *Crotalaria micans* e *Angelonia hirta* obtiveram eficácia nas frações apolares,
277 90% e 74% de eficácia respectivamente. Quando avaliados os extratos brutos das
278 mesmas a eficácia foi de 100% na concentração de 40%.

279 O registro gráfico da cromatografia realizada com o extrato polar de *S. hispida*,
280 identificou a presença de fenilpropanóide e flavonol glicosilado.

281 Foram submetidas ao TIL com dez concentrações seriadas as frações das
282 plantas, *S. virgata* (polar), *A. hirta* (apolar), *C. micans* (apolar), *A. denticulata* e *R.*
283 *armata* (polar). As espécies *S. virgata*, *A. hirta*, *C. micans* e *A. denticulata*, obtiveram
284 eficácia superior a 95% na concentração de 40%, quando avaliadas no TIL em três
285 concentrações, enquanto que a espécie *R. armata* obteve eficácia inferior a 95% quando
286 avaliada nas mesmas condições, mas demonstrou eficácia superior a 95% quando
287 avaliada a fração polar da planta. *Sesbania virgata* (fruto) (Fig. 1 e 2) apresentou CL50
288 8,770, variando entre 7,072 – 10,88 (IC95%), e R^2 0,7414. *A. denticulata* (Fig. 3 e 4)
289 apresentou CL50 5,946, variando entre 4,977 – 7,102 (IC95%) e R^2 8,4. *R. armata* foi
290 utilizada a fração polar (Fig. 5 e 6), apresentando CL50 17,7, variando entre 8,538 –
291 36,7 (IC95%) e R^2 0,7182, enquanto que de *A. hirta* (Fig. 7 e 8) fração apolar
292 apresentou CL50 8,562, variando entre 6,454 – 11,36 (IC95%) e R^2 6 e *C. micans* (Fig.
293 9), foi utilizada a fração apolar. Estas espécies foram submetidas ao TIL em
294 concentrações seriadas, pois apresentavam quantidades suficientes a realização do teste,

295 o que não ocorreu com as demais espécies avaliadas e que obtiveram média de eficácia
296 igual ou superior a 95%.

297 A diluição do extrato *C. castaneifolia*, na fração polar, não puderam ser
298 contabilizadas as larvas vivas e mortas, pois se encontravam coladas e amontoadas no
299 pacote de papel filtro.

300

301 **4.0. Discussão**

302 As plantas avaliadas neste trabalho apresentaram no extrato bruto, maior
303 atividade acaricida do que o extrato fracionado. De forma semelhante, Chagas et al.
304 (2012) ao utilizarem geraniol e ácido oleico, substâncias isoladas de *Cymbopogon*
305 *martinii* (Palmorosa) e *Carapa guianensis* (Andiroba) respectivamente, não obtiveram
306 efeito significativo sobre larvas e adultos de *R. (B.) microplus*.

307 As plantas podem apresentar diferentes metabólicos secundários (Cechinel Filho
308 & Yunes, 1998), que podem produzir misturas complexas em diferentes proporções
309 (Tarayere et al. 1995) e resultar nas seguintes interações: sinérgica aditiva, em que o
310 efeito final é igual à soma dos efeitos das duas substâncias isoladas; sinérgica
311 antagônica, em que uma substância age contrária a outra; ou sinergismo de potenciação,
312 em que o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais das substâncias (Wink,
313 2010). Estas interações poderiam justificar os diferentes resultados de eficácia obtidos
314 no presente estudo.

315 Atualmente, os trabalhos que viabilizam a utilização de acaricidas com extratos
316 vegetais, intensificam suas avaliações no extrato bruto particionado, com emprego de
317 solventes de polaridades crescente em vários extratos de diferentes níveis de polaridade
318 como hexano, clorofórmio, acetato de etila, n- Butanol e etanol. O presente estudo
319 objetivou avaliar extratos brutos fracionados em uma fração polar e outra apolar, o que

320 prejudica a comparação com os resultados deste trabalho a outros pelo diferente modo
321 de obtenção dos extratos. Embora Arantes et al. (2005) tenham avaliaram extratos de 26
322 espécies de plantas do cerrado brasileiro, obtidos pelo método de maceração, com os
323 solventes clorofórmio ou diclorometano (extrato apolar), etanol ou metanol (extrato
324 polar), contra *Mycobacterium fortuitum*, seus resultados concordam com os do presente
325 estudo, as frações apolares foram as que apresentaram melhor atividade em ambos os
326 trabalhos.

327 O emprego de hexano/acetona no presente estudo, na obtenção do extrato apolar,
328 se deve a tendência mundial do não emprego de solventes clorados pela toxicidade e
329 possível impacto ambiental (Sonaglio et al., 2010) No extrato apolar deste estudo,
330 podem ser encontradas substâncias como esteroides terpenos, acetofenonas, agliconas,
331 ceras, sapogeninas, iridoides e sesquiterpenos, substâncias altamente lipofílicas;
332 (Cechinel Filho, 1998; Cantrell et al., 2001; Sonaglio et al., 2010).

333 Os metabólitos secundários desempenham o papel de proteção às plantas e,
334 algumas destas substâncias já foram descritas na literatura, dentre outros, como os
335 terpenoides (Cantrell et al., 2001) com atividade antimicrobiana e os flavonoides com
336 atividade antifúngica e antimicrobiana (Hamburger & Hostettman, 1991). Muitas destas
337 substâncias apresentam-se em pequena quantidade na planta, chamados de compostos
338 minoritários, estes compostos geralmente apresentam os melhores efeitos biológicos,
339 por isso o estudo que viabiliza a análise de frações ou de substâncias isoladas é de suma
340 importância (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

341 Estes compostos minoritários muitas vezes não são levados em consideração por
342 estarem em quantidades muito baixas. Neste trabalho foi possível observar o quão
343 relevante são as análises de frações. A *E. paniculatus* e a *R. armata* são apenas uma
344 amostra de como as frações podem se comportar de forma diferenciada do extrato bruto,

345 ou vice e versa. A *E. paniculatus* apresentou no extrato bruto média de eficácia de
346 100% nas concentrações de 20 e 40%, e quando fracionada essa eficácia caiu para 36%
347 na fração apolar e 31% na fração polar. A *R. armata* apresentou média de eficácia de
348 75% na concentração de 40% no extrato bruto, quando fracionada a eficácia foi de 97%
349 na fração apolar. Mesmo não havendo sido realizadas análises cromatográficas para
350 identificação de cada composto, interações entre as substâncias presentes nestas plantas,
351 tanto com valor aditivo como antagônico podem ser consideradas.

352 Estas substâncias, sejam elas minoritárias ou majoritárias, podem agir de forma a
353 impedir a atividade de outros compostos bioativos, apresentar sinergismo com
354 substâncias que sozinhas não produziram atividade, ou até mesmo ser a fração mais
355 eficaz (Pontes et al. 2007).

356 As plantas *Z. rigidum* e *H. mutabilis*, mantiveram a eficácia superior a 95%
357 obtida no TIL com extrato bruto, na fração apolar a eficácia foi de 98% para ambas e na
358 fração polar eficácia de apenas 20% e 18% respectivamente. Neste caso, um ou mais
359 compostos ativos destes extratos estão presentes na porção apolar da planta.

360 *Senna obtusifolia* não apresentou eficácia superior a 95% no TIL com extrato
361 bruto e isso refletiu na avaliação das frações polar e apolar, podendo-se concluir que
362 esta planta não apresenta atividade acaricida sobre *R. (B.) microplus*.

363 No presente estudo, os extratos brutos de *D. kuntzei*, *H. volubilis*, *C. punctatum*,
364 *M. latifolia*, *C. castaneifolia*, *T. formosa*, *S. virgata* (fruto), *A. denticulata*, *S. hispida*,
365 *R.armata*, *E. paniculatus*, *R. grandiflora*, apresentaram eficácia acima de 95% contra
366 larvas de *R. microplus*. Porém, *D. kuntzei*, *H. volubilis*, *C. punctatum*, *M. latifolia*, *C.*
367 *castaneifolia* não apresentaram atividade nas frações polares e apolares.

368 Ribeiro et al. (2008a) avaliaram o extrato hexano de partes aéreas de *Calea*
369 *serrata*, planta que pertence à família Asteraceae, conhecida como Quebra-tudo e rica

370 em eupatoriochromene e precoceno II, e observaram eficácia foi de 80% na
371 concentração de 3,12 mg/mL e 100% na concentração de 6,25 mg/mL no teste de
372 imersão larval sobre *R. (B.) microplus*. Desta mesma planta, o precoceno II isolado
373 (concentração 1,56mg), matou aproximadamente 50% das larvas no TIL (Ribeiro et al.
374 2011). No presente estudo, *M. latifolia* e *C. punctatum*, que também pertencem à
375 família Asteraceae, apresentaram eficácia de 100% sobre larvas de *R. (B.) microplus*, na
376 concentração de 40%, porém, quando fracionadas em porções polares e apolares não
377 apresentaram eficácia.

378 O extrato hexânico de *C. serrata* foi eficaz contra larvas de *R. (B.) microplus*,
379 nas concentrações 6,25, 3,12 e 1,56 mg/mL (Ribeiro et al 2008^a), as concentrações 1,5,
380 3 e 6 mg / mL foi eficaz na inibição da acetilcolinesterase em larvas e ratos Wistar
381 (Ribeiro et al. 2012), porém, o precoceno II obtido deste extrato na concentração de
382 1,56 mg/mL, não foi eficaz contra larvas (Ribeiro et al 2011).

383 Assim como o precoceno II não foi tão eficaz contra larvas de *R. (B.) microplus*
384 depois de isolado, o mesmo ocorreu com *D. kuntzei*, *H. volubilis*, *C. punctatum*, *M.*
385 *latifolia* e *C. castaneifolia*, depois de fracionadas a eficácia não foi a mesma do extrato
386 bruto.

387 A(s) substância(s) ativa(s) de *T. formosa*, *S. virgata* (fruto) e *A. denticulata*
388 encontra-se na fração polar destas plantas. Para *S. hispida* e *R. armata*, esta (s)
389 substância (s) encontra-se na fração apolar.

390 *Equinodorus paniculatus* apresentou 36% de eficácia na fração apolar e 31% de
391 eficácia na fração polar, enquanto o extrato bruto apresentou média de eficácia de 100%
392 nas concentrações de 40% e 20%. É necessário estudar a composição química de cada
393 fração, e avaliar possíveis interações entre as substâncias presentes em ambas.

394 *Richardia grandiflora* apresentou 100% de eficácia na fração apolar e 82% na
395 fração polar. Há substâncias ativas contra *R. (B.) microplus*, tanto na fração polar
396 quanto na apolar de *R. grandiflora*, e estas substâncias ainda podem interagir entre si. *R.*
397 *grandiflora* foi a única a apresentar eficácia nas duas frações.

398 Dos cinco extratos que apresentaram eficácia superior a 95% na avaliação de
399 frações polares e apolares, três pertencem à família Rubiaceae, *D. kuntzei*, *R.*
400 *grandiflora* e *R. armata*, uma pertence à família Lamiaceae, *H. mutabilis* e uma à
401 família Rutaceae, *Z. rigidum*.

402 A família Rubiaceae possui um alcaloide (emetina) que pode interferir na síntese
403 ribossomal e induzir apoptose (Möller & Wink, 2007). As saponinas, triterpenoides e
404 esteroides também estão presentes na família Rubiaceae e podem agir como detergentes,
405 dissolvendo membranas fosfolipídicas, ocorrendo citotoxicidade, o que faz destas
406 substâncias passíveis de serem utilizadas como antimicrobianos e antiparasitários
407 (Wink, 2008). A família Lamiaceae compartilha de alguns destes mesmos compostos
408 (Wink, 2012). Por causa disso, é possível que as espécies de ambas as famílias
409 obtivessem estes resultados mediante a semelhança fitoquímica entre elas.

410 Os fenilpropanóides encontrados na espécie *S. hispida*, pela técnica de CLAE-
411 UV/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência), estão presentes em espécies de
412 várias famílias, inclusive em algumas famílias de plantas avaliadas neste estudo como
413 Lamiaceae, Rubiaceae, Verbenaceae, Asteraceae e Lauraceae. Esta substância possui
414 características antiparasitária e antimicrobiana, por dissolver membranas, interferindo
415 na passagem e ação de proteínas. O flavonol glicosilado é um metabólito secundário
416 com propriedades antioxidantes, derivado da quercetina, não isento de toxicidade
417 (Wink, 2008), ainda sem dados quanto atividade acaricida. Novos procedimentos
418 farmacognósticos são necessários na elucidação quanto aos compostos de *S. hispida*.

419

420 **5.0. Conclusão**

421 A fração polar de *R. armata* e as frações apolares de *R. grandiflora*, *H. mutabilis*
422 e *Z. rigidum* possuem substâncias de atividade acaricida, com eficácia média superior a
423 95% sobre larvas de *R. (B.) microplus*.

424

425 **6.0. Referências bibliográficas**

426 Agnolin, C. A. Olivo, C. J. Sangioni, L. A. Parra, D. L. C. Diehl, M. S. Santos, J. C.

427 Aguirre, P. F. Camillo, G. & Irgang, D. M., 2011. Concentrações de óleo de citronela no
428 controle do carrapato de bovinos. *Revista Brasileira de Agroecologia* 5(2), 187-193.

429 Arantes, V.P. Sato, D.N. Vilegas, W. Santos, L.C. Leite, C.Q.F. Plantas do cerrado
430 brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. *Revista de Ciência e*
431 *Farmacognosia Básica e Aplicada*, v. 26, n.3, p. 195-198, 2005.

432 Cantrell, C. L. Dayan, F. E. & Duke, S. O., 2012. Natural Products As Sources for New
433 Pesticides. *Journal of Natural Products* 75, 1231–1242

434 Catto. J. B., Bianchin, I., Saito. M., 2009. Efeito acaricida in vitro de extratos de plantas
435 do Pantanal no carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Dados
436 eletrônicos. Embrapa gado de corte 26 p. Disponível em:
437 [//www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/BP26](http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/BP26). Acesso em: 21 mar. 2011.

438 Cechinel Filho. V., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente
439 ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para
440 otimização da atividade. *Química Nova*, 21(1).

441 Cechinel Filho. V.; Yunes. R. A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos
442 farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação
443 estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21(1).

- 444 Cantrell, C. L.; Franzblau, S. G.; Fischer, N. H.; 2001. Antimycobacterial plant
445 terpenoids. *Planta Medicinal*, 67(1):1-10.
- 446 Chagas. A. C. S., Barros. L. D., Cotinguiba. F., Furlan. M., Giglioti. R., Oliveira. M. C.
447 S., Bizzo. H. R., 2012. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on
448 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 110:295–303.
- 449 Costa. C. T. C., 2002. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L.
450 sobre *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.11, n.2,
451 p.57-60.
- 452 D'Alessandro. W. B. 2008. Avaliação da atividade de acaricidas químicos sintéticos,
453 extrato botânico sobre *Rhipicephalus sanguineus* e ação dos óleos essenciais sobre
454 *Amblyomma cajennense*. Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical- Parasitologia-
455 IPTSP/UFG.
- 456 Furlong. J., 2005. Carrapato: Problemas e Soluções. Juiz de Fora. Embrapa Gado de
457 Leite.
- 458 Garcia. M. V., Matias. J., Barros. J. C., Lima. D. P., Lopes. R. S., Andreotti. R.
459 Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its
460 acaricidal effect on ticks. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.
461 21, n. 4, p. 405-411. 2012.
- 462 Giglioti. R., Forim. M. R., Oliveira. H. N., Chagas. A. C., Ferrezini. J., Brito. L. G.,
463 Falcoski. T. O., Albuquerque. L. G., Oliveira. M. C., 2011. In vitro acaricidal activity of
464 neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against
465 *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* 181 (2011) 309– 315
- 466 Grisi, L.; Massard, C. L; Moya-Borja, G. E; Pereira, J. B., 2002. Impacto econômico
467 das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125,
468 p. 8-10.

- 469 Hamburger. M.; Hostettmann. K. 1991. Bioactivity in plants: the link between
470 phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* .30(1):3864-74.
- 471 Holdsworth PA, Kemp D, Green P, Peter RJ, de Bruin C, Jonsson NN et al. World
472 Association for the Advacement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) Guidelines
473 for evaluating the efficacy of acaricides agaist ticks (Ixodidade) on ruminants.
474 *Veterinary Parasitology*, 136: 29-43. 2006.
- 475 Jonsson. N. N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*)
476 infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses.
477 *Veterinary Parasitology* 137, 1–10.
- 478 Marinho, M. L., Alves, M. S., Rodrigues, M. L. C., Rotondano, T. E. F., Vidal, I.F.,
479 Silva, W. W., Athayde, A. C. R., 2007. A utilização de plantas medicinais em medicina
480 veterinária: um resgate do saber popular. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.9,
481 n.3, p.64-69.
- 482 Möller, M.; Wink, M.; 2007. Características de indução de apoptose pelo emetina
483 alcalóide em linhas celulares tumorais humanas. *Planta Medicinal*, 73: 1389-1396.
- 484 Neto. G.G, & Moraes. R. G. 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato
485 Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasilica*. 17(4): 561-584.
- 486 Pivoto. F. L., Buzatti. A., Krawczak. F. S., Camillo. G., Sangioni. L. A., Zanetti. G. D.,
487 Manfron. M. P., Vogel. F. S. F., 2010. Ação acaricida in vitro de *Tropaeolum majus* sob
488 teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40,
489 n. 10, p. 2141-2145.
- 490 Pontes. W. J. T., Oliveira. J. C. S., Câmara. C. A. G., 2007. Atividade acaricida dos
491 óleos essencias de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus*
492 *urticae* koch). *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 4, 838-841.

- 493 Quan, C. & Turner, C. Extraction of Astaxanthin from Shrimp Waste Using Pressurized
494 Hot Ethanol. *Chromatographia*, 2009.
- 495 Ribeiro. V. L. S. Santos. J. P., Martins. J. R., Schripsema. J. S., Siqueira. I. R., Von
496 Poser. G. L., Apel. M. A., 2011. Acaricidal properties of the essential oil and precocene
497 II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus*
498 (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 179,195–198.
- 499 Ribeiro. V. L. S., Avancini. C., Gonçalves. K., Toigo. E., von Poser. G., 2008a.
500 Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and
501 *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v. 151, n. 2-4, p. 351-354.
- 502 Sahoo. N., Manchikanti. P., Dey. S., 2010. Herbal drugs: Standards and regulation.
503 *Fitoterapia* 81, 462–471.
- 504 Shaw, R. D., 1966. Culture of an organophosphate resistant strain of *Boophilus*
505 *microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. *Bulletin of*
506 *Entomological Research*, 56 four, p 398-405.
- 507 Sonaglio. D.; Ortega. G. G.; Petrovick. P. R.; Bassani. V. L. 2010. Desenvolvimento
508 tecnológico de fitoterápicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Simões. C.
509 M. C.; Schenkel. E. P.; Gosmann. G.; Mello. J. C. P.; Mentz. L. A.; Petrovick. P. R.
510 2010. UFRGS.
- 511 Wink. M.; 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular
512 phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, v.64, n.1, p.3-19.
- 513 Wink. M.; 2008. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-
514 component mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism*. 996–1009.
- 515 Wink. M.; 2010. *Secondary Metabolites: Deterring Herbivores*. Universidade de
516 Heidelberg, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000918.pub2/>
517 full. Acesso em 12 de dezembro de 2012.

Tabela 1- Resultados da média da eficácia do Teste de imersão larval (TIL) com frações polares e apolares das plantas *D. kuntzei*, *S. hispida*, *H. volubilis* e *R. armata*, após enriquecimento do extrato bruto sobre larvas de *R. (B.) microplus*.

Espécies	Fração Apolar Concentração	Eficácia média %	Fração Polar Concentração	Eficácia Média %
<i>Diodia kuntzei</i>	5%	4	12,5%	8
<i>Hippocratea volubilis</i>	9,1%	15	27,3%	10
<i>Sebastiania hispida</i>	4,7%	28	24%	72
<i>Randia armata</i>	4,3%	15	30,8%	97

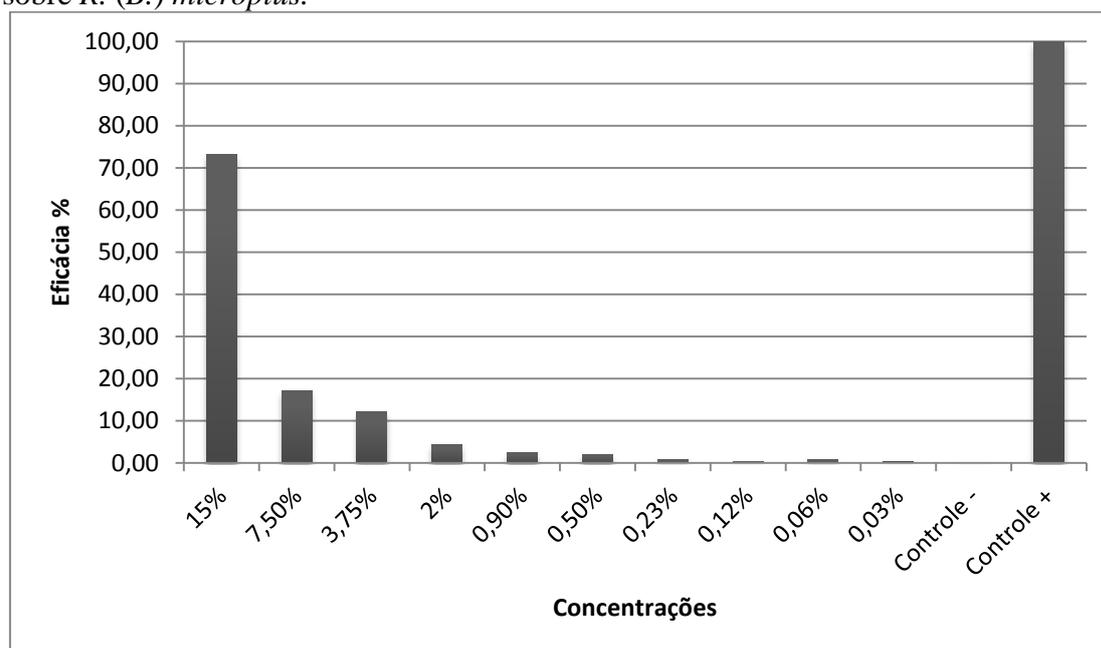
Concentrações obtidas de acordo com o enriquecimento de cada extrato (concentração de 40% dividida pelo número de vezes que a fração foi enriquecida na nova extração). Testes realizados com uma concentração e em triplicata

Tabela 2- Resultados de média de eficácia do Teste de imersão larval (TIL) com frações polares e apolares extraídas de plantas pulverizadas diretamente em extrator de solvente acelerado (DIONEX®) (ASE 150) na concentração de 13%, sobre *R. (B.) microplus*.

Fração Apolar	Média % Eficácia Fração Apolar	Média % Eficácia Fração Polar
<i>Aeschynomene denticulata</i>	29	74
<i>Angelonia hirta</i>	74	1
<i>Caperonia castaneifolia</i>	1	-
<i>Centratherum punctatum</i>	7	4
<i>Crotalaria micans</i>	90	6
<i>Echinodorus paniculatus</i>	36	31
<i>Hyptis mutabilis</i>	98	18
<i>Lantana canescens</i>	26	1
<i>Melanthera latifolia</i>	4	20
<i>Polygala molluginifolia</i>	43	7
<i>Richardia grandiflora</i>	100	82
<i>Sesbania virgata</i> RF/FO	11	17
<i>Sesbania virgata</i> FR	12	75
<i>Senna obtusifolia</i>	8	5
<i>Tocoyena formosa</i>	35	77
<i>Zanthoxylum rigidum</i>	98	20

A concentração de 13% para estas frações foi determinada por meio de cálculo de médias de enriquecimentos de frações polares e apolares das plantas que primeiramente obtiveram extratos brutos (*D. kuntzei*, *S. hispida*, *H. volubilis* e *R. armata*). Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 1- Teste de imersão larval (TIL) com fração polar do fruto da planta *S. virgata* sobre *R. (B.) microplus*.



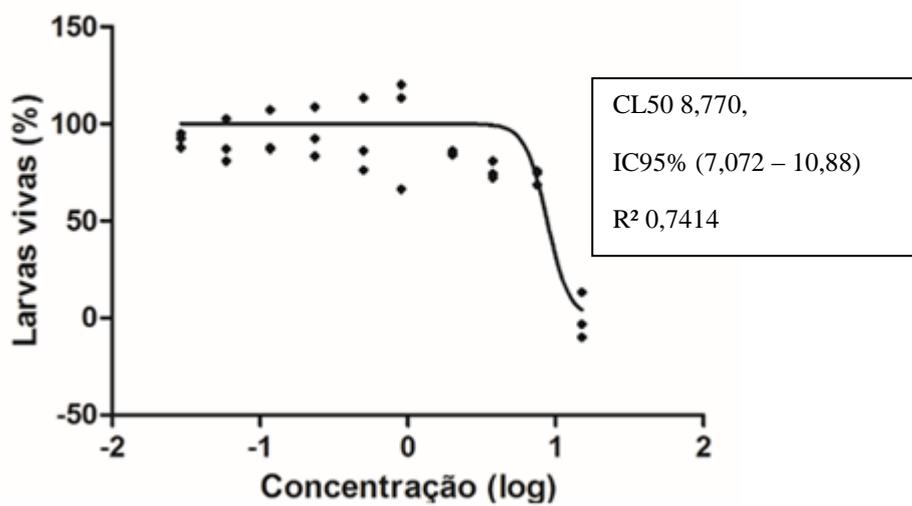
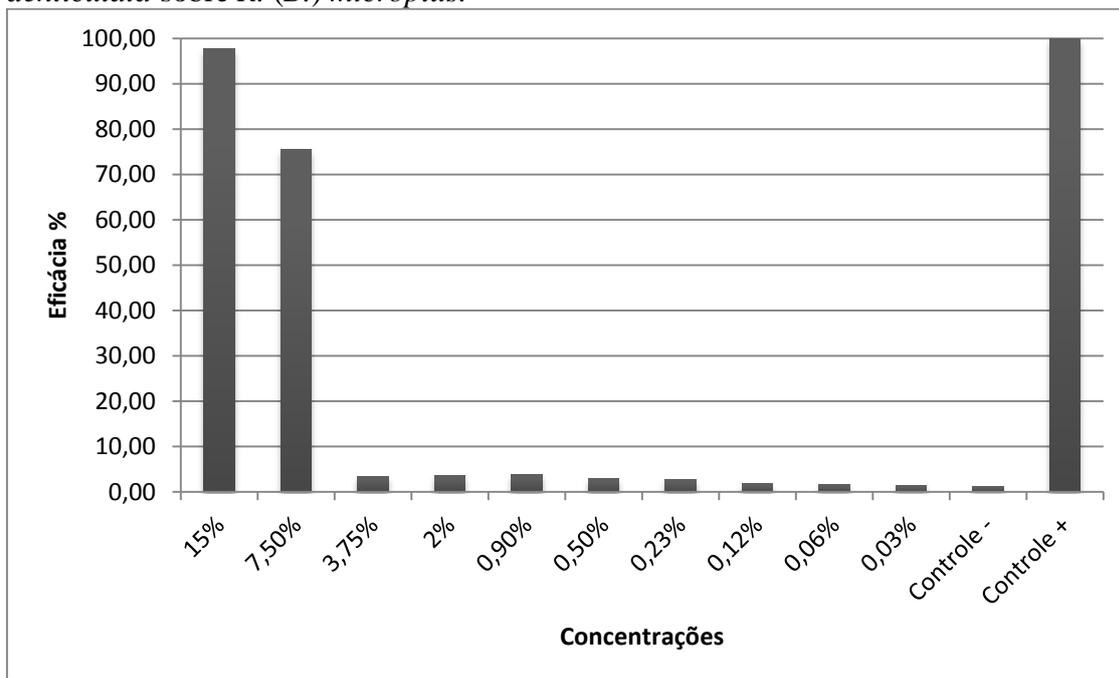


Figura 2- Curva dose X resposta do extrato polar de *S. virgata* sobre larvas de *R. (B.) microplus* em 10 diferentes concentrações entre 15% e 0,029%.

Figura 3- Teste de imersão larval (TIL) com fração polar do fruto da planta *A. denticulata* sobre *R. (B.) microplus*.



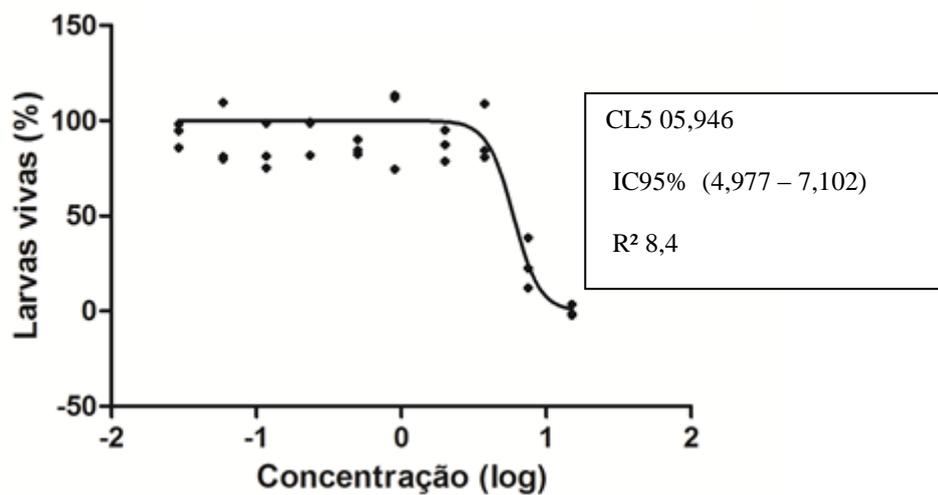
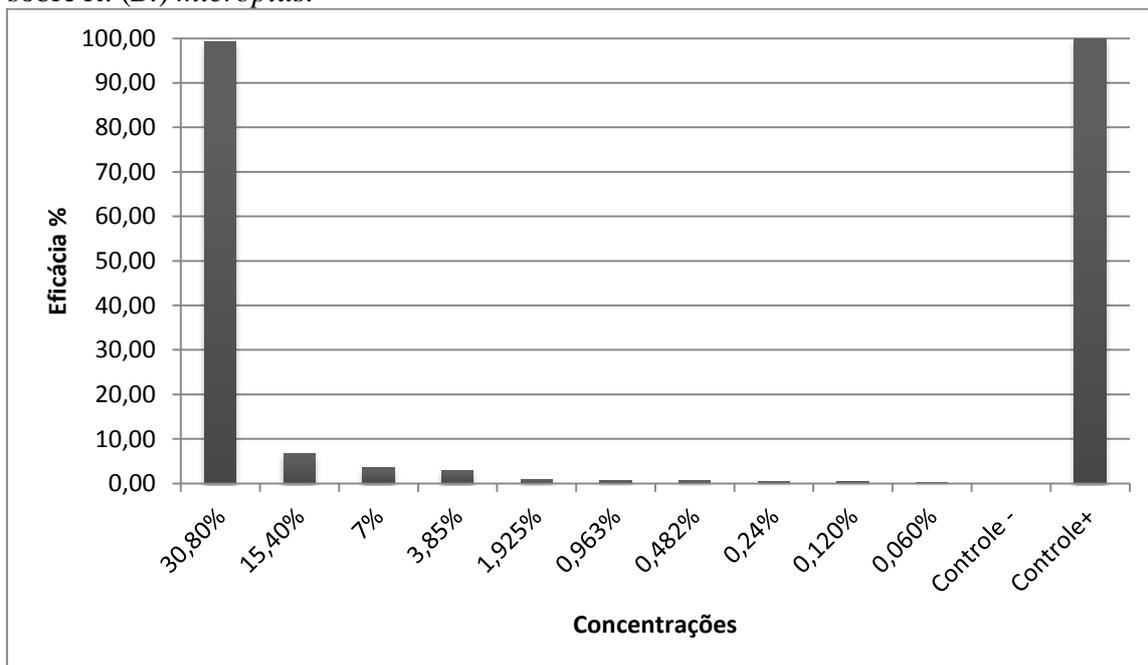


Figura 4- Curva dose X resposta do extrato polar de *A. denticulata* sobre larvas de *R. (B.) microplus* em 10 diferentes concentrações entre 15% e 0,029%.

Figura 5- Teste de imersão larval (TIL) com fração polar do fruto da planta *R. armata* sobre *R. (B.) microplus*.



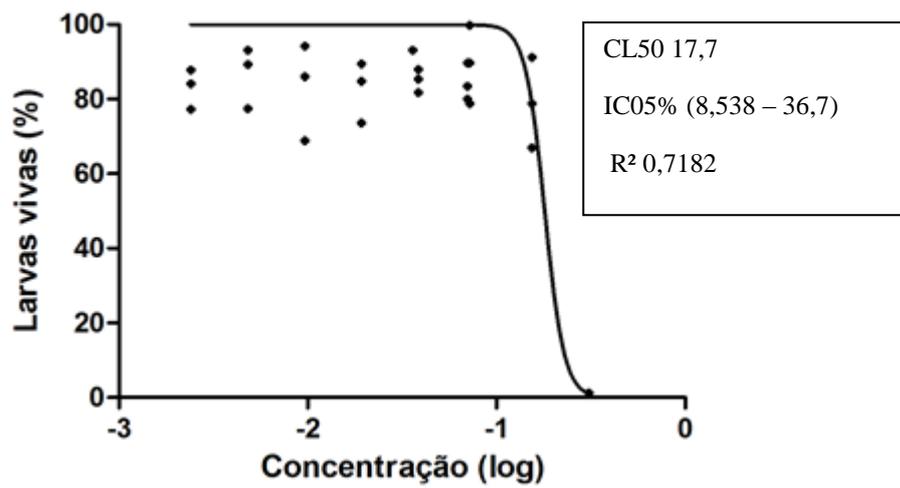
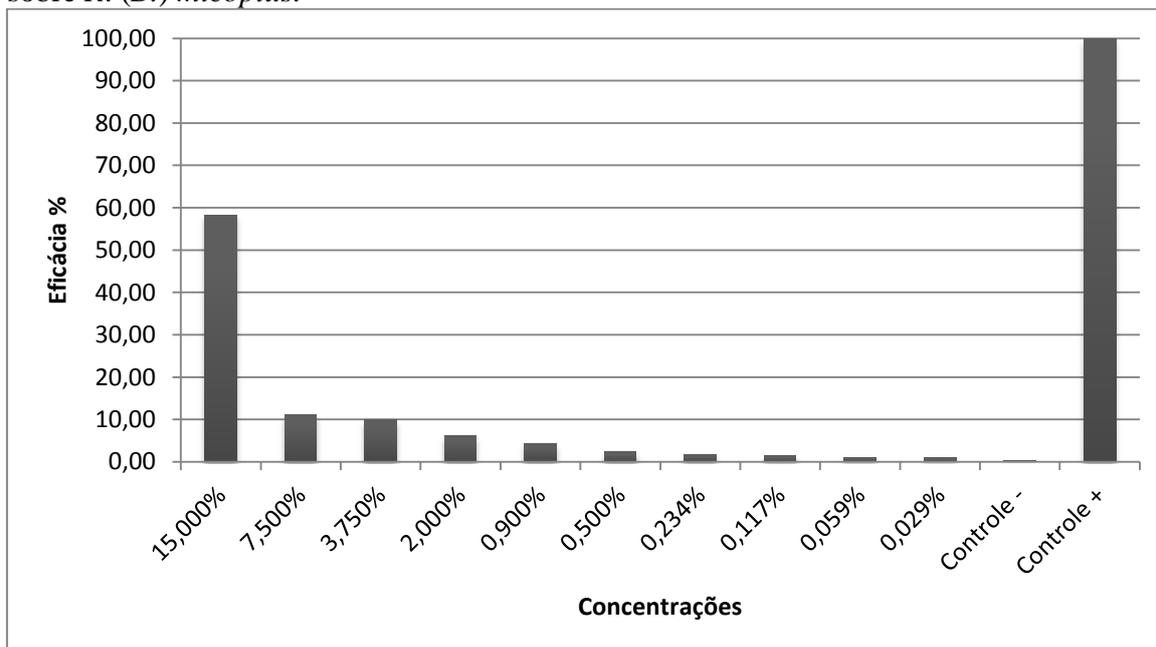


Figura 6- Curva dose X resposta da fração polar da *R. armata* contra *R. (B.) microplus* em 10 diferentes concentrações entre 30,8% e 0,060%.

Figura 7- Teste de imersão larval (TIL) com fração apolar do fruto da planta *A. hirta* sobre *R. (B.) micoplus*.



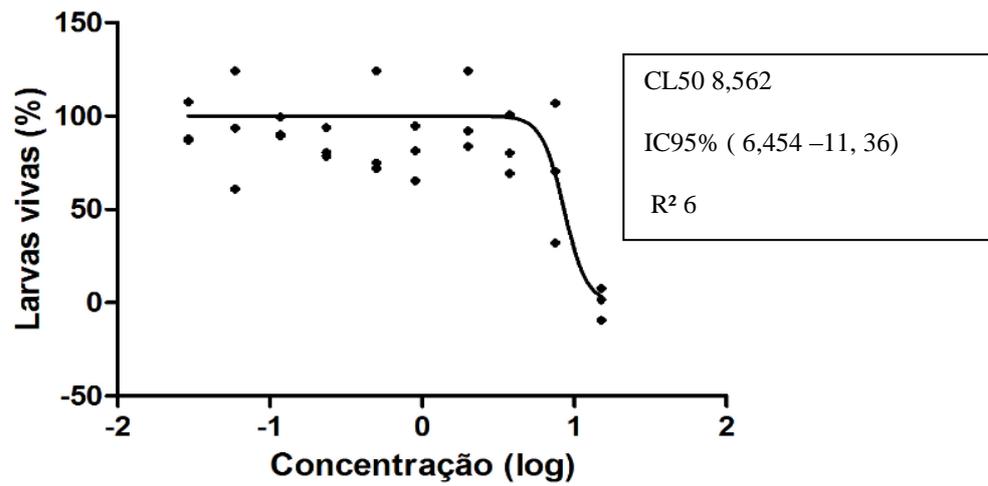
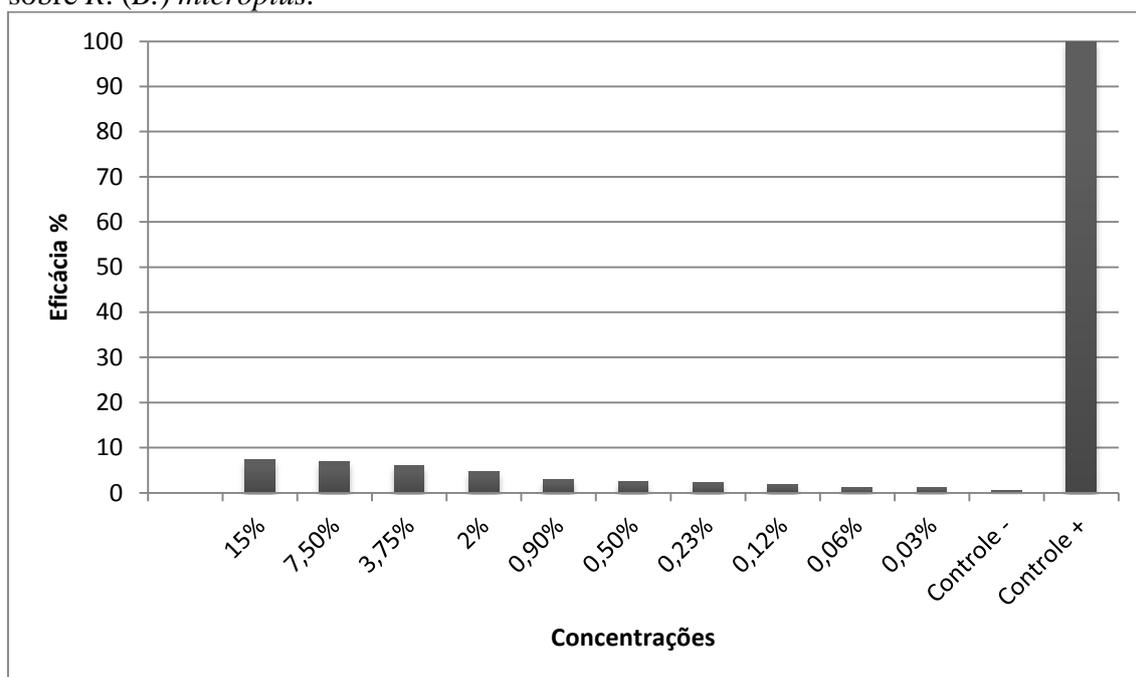


Figura8- Curva dose X resposta do extrato apolar de *A. hirta* contra *R. (B.) microplus* em 10 diferentes concentrações entre 30,8% e 0,240%.

Figura 9- Teste de imersão larval (TIL) com fração apolar do fruto da planta *C. micans* sobre *R. (B.) microplus*.



Capítulo III - Artigo III

A ser submetido na revista Veterinary Parasitology

Ação in vitro de Tabebuia spp. contra Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Santos, L. B.^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

* Autor correspondente

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Avenida Senador Filinto Müller 2443, Ipiranga, Caixa Postal 549

CEP: 79074-460 Campo Grande-MS

larissamedvet@hotmail.com

Abstract: The aim of this study was to evaluate the in vitro acaricidal activity of *Tabebuia aurea*, *T. serratifolia* e *T. rosea* against larvae and adults of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* beyond the fractionation and characterization of active fraction. Was performed the larval immersion test (TIL) in three different concentrations (70%, 40% and 20%) for *T. aurea* and *T. serratifolia* and 40%, 20% and 5% for *T. rosea*. The three species have high average effectiveness. *T. aurea* showed 96.92% mortality of larvae in the higher concentration, *T. serratifolia* average efficiency of 90% in the lowest concentration and 100% in the highest concentration, The *T. rosea* average efficiency was 99% in the highest concentration used. After set acaricidal activity by TIL with three concentrations, the concentrated extract of *T. áurea* and the crude hydro alcoholic *T. serratifolia*, were submitted to TIL in serial concentrations to obtain an x dose response curve. The most manipulated species and which received better emphasis in this work was *T.serratifolia* because was the specie that present better results even if

27 lowest concentrations (LC50 7,07%). With the crude hydro alcoholic extract of this
28 plant, we performed a partition, getting a hexane extract fractioned into classical column
29 chromatography, the fractions were submitted to TIL and hexane fraction obtained the
30 higher efficacy. From this result a crude hexane extract of *T.serratifolia*, was obtained
31 by direct extraction in acelerator solvent extractor a partition was performed using
32 solvents of increasing polarity and these fractions were tested using a concentration of
33 TIL with ethyl acetate fraction and had an average efficiency of 100%, characterizing
34 the presence of the bioactive compound from the less polar compounds from the plant.
35 Were used in the adult immersion test the crude extract of *T.serratifolia* and hexane
36 fraction obtained from the same extract, The *T.serratifolia* showed average efficiency
37 of 96% with the crude extract (in concentration of 40%) and 82% with hexane fraction
38 (in concentration of 5%).

39 **Keywords:** Bignoniaceae, ox tick, herbal medicine, bioactive substances

40

41 **Resumo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade acaricida *in vitro* de *Tabebuia*
42 *aurea*, *T. serratifolia* e *T. rosea* contra larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus)*
43 *microplus*, além do fracionamento e caracterização da fração ativa. Foi realizado o teste
44 de imersão larval (TIL) em três diferentes concentrações (70%, 40% e 20%) para *T.*
45 *aurea* e *T. serratifolia* e 40%, 20% e 5% para *T. rosea*. As três espécies apresentam
46 eficácia média elevada. *T. aurea* apresentou 96,92% de mortalidade de larvas na maior
47 concentração, *T. serratifolia* eficácia média de 90% na menor concentração e 100% na
48 maior concentração, *T. rosea* eficácia média de 99% na maior concentração utilizada.
49 Após definição de atividade acaricida pelo TIL com três concentrações, o extrato
50 concentrado da *T. aurea* e o extrato bruto hidro alcoólico da *T. serratifolia*, foram
51 submetidos ao TIL em concentrações seriadas para obtenção de uma curva dose x

52 resposta. A espécie mais manipulada e a qual recebeu maior destaque no presente
53 trabalho foi a *T. serratifolia*, pois foi a espécie que apresentou melhores resultados
54 mesmo em concentrações muito baixas (CL50 7,07%). Com o extrato bruto hidro
55 alcoólico desta planta, foi realizada uma partição, obtendo um extrato hexânico,
56 fracionado em cromatografia em coluna clássica, as frações obtidas foram submetidas
57 ao TIL e a fração hexânica foi a que obteve eficácia mais elevada. A partir deste
58 resultado um extrato hexânico bruto da *T. serratifolia*, foi obtido por meio de extração
59 direta em extrator de solvente acelerado, foi realizada uma partição utilizando os
60 solventes de polaridade crescente e estas frações foram testadas por meio do TIL com
61 uma concentração e a fração acetato de etila apresentou média de eficácia de 100%,
62 caracterizando a presença do composto bioativo dentre os compostos apolares da planta.
63 Foram utilizados no teste de imersão de adultos o extrato bruto de *T. serratifolia* e a
64 fração hexânica obtida do mesmo extrato. A *T. serratifolia* apresentou média de eficácia
65 de 96% com o extrato bruto (concentração de 40%) e 82% com a fração hexânica
66 (concentração de 5%).

67 **Palavras-chave:** Bignoniaceae, carrapato do boi, fitoterápicos, substâncias bioativas

68

69 **1.0 Introdução**

70 São poucos os estudos conduzidos no estado de Mato Grosso do Sul, referente à
71 catalogação e caracterização de espécies com potencial interesse farmacêutico (Neto &
72 Moraes, 2003).

73 A família Bignoniaceae é uma família com grande potencial medicinal, muito
74 utilizada na medicina tradicional popular; no Brasil, são encontrados 33 gêneros e cerca
75 de 350 espécies, sendo 33 delas raras (Souza & Lorenzi, 2008; Lohmann & Silva-

76 Castro, 2009) e seu potencial como fitoterápico tem sido objeto de estudo de muitos
77 pesquisadores (Jorge, 2000).

78 O gênero *Tabebuia*, um dos símbolos do estado de Mato Grosso do Sul,
79 pertencente à família Bignoniaceae, compreende várias espécies de *Tabebuia*. Sua
80 floração ocorre anualmente, durante os meses de agosto a novembro, com a planta
81 totalmente despida de folhagem. As espécies deste gênero ocorrem em terrenos bem
82 drenados no Cerrado e, em agrupamentos quase homogêneos em solos muito úmidos ou
83 até alagados no Pantanal (Soares et al. 2006).

84 O lapachol é um princípio ativo presente na casca do caule da *Tabebuia*
85 *serratifolia* (Ipê-amarelo, Ipê-do-cerrado, Pau-d'arco-amarelo) (Matos, 2000; Ferreira et
86 al. 2004), espécie arbórea que atinge de 5-25m de altura, possui interesse econômico
87 madeireiro, ornamental e medicinal (Dousseau et al. 2008). Outras espécies de *Tabebuia*
88 possuem na casca e no cerne do caule quantidades variáveis de lapachol e de outras
89 substâncias (Ferreira et al. 2004). O lapachol é denominado agente antimalárico,
90 esquistossomicida, antiviral, antiinflamatório e anticâncer (Oliveira et al. 1990; Fonseca
91 et al. 2003), presente também em outras plantas da família Bignoniaceae (Ferreria et al.
92 2004).

93 As espécies de *Tabebuia* diferem entre si, *T. aurea* apresenta tronco tortuoso e, é
94 de ocorrência na Região Amazônica e Nordeste até São Paulo e Mato Grosso do Sul, *T.*
95 *caraiiba* é uma espécie arbórea de 12-20m de altura com tronco tortuoso, além do Mato
96 Grosso do Sul, ocorre também em São Paulo, na Região Amazônica e Nordeste
97 (Guerbas Neto, 2003; Ferreira et al. 2004). A entrecasca de *T. aurea*, apresenta 17
98 compostos distribuídos em quatro classes químicas, terpenos, flavonóides, esteróides e
99 irirdóides (Guerbas Neto, 2003). A *T. caraiiba*, também conhecida como Ipê e Caraíba
100 (Ferreria et al. 2004), possui dentre seus compostos químicos os triterpenos e os

101 iridóides. Da casca do caule, folhas e cerne da *T. aurea* (Paratudo, Pau-d'arco, Ipê),
102 foram isoladas, além das substâncias triterpenos e iridoides, também substâncias
103 esteroides e flavonoides (Guerbas Neto, 2003). E ainda há outras espécies do gênero
104 *Tabebuia*, possuidoras de atividade bactericida, fungicida, entre outras (Dousseau et al.
105 2008).

106 A flora do Cerrado é rica e diversificada, bem como todo o bioma Cerrado e,
107 poucos estudos são direcionados à identificação e caracterização química desta flora de
108 grande potencial bioativo (Gottlieb & Borin, 1994). De acordo com Gottlieb et al.
109 (1996), menos de 1% da flora brasileira é conhecida quimicamente. Em busca de novas
110 abordagens para o controle de carrapatos, as pesquisas com recursos naturais como
111 extratos de plantas tornam-se uma importante ferramenta como alternativa a cadeia
112 produtiva bovina. Por meio de metodologias adequadas aliadas ao uso de fitoterápicos,
113 novas formulações farmacêuticas poderão ser promovidas (Marinho et al. 2007).

114 Os fitoterápicos podem ser preparados a partir de extratos brutos de plantas,
115 substâncias isoladas, frações obtidas por meio destes extratos brutos (Klein et al., 2009)
116 e, por meio de processos fitoquímicos é possível identificar as substâncias bioativas dos
117 extratos naturais, até mesmo isolar cada constituinte. Esses processos fitoquímicos
118 garantem eficiência de forma segura (Han et al., 2007), são testes de triagem,
119 qualitativos ou semiquantitativos, que utilizam reagentes de detecção específicos para
120 evidenciar a presença de grupos funcionais característicos na matéria-prima vegetal e
121 que auxiliam na identificação da espécie vegetal e a diferenciação de outras espécies
122 (RDC nº14, 2010).

123 As características químicas destes constituintes variam entre diferentes espécies.
124 Os mesmos extratos de plantas podem variar dependendo da colheita, da origem
125 vegetal, do processo de secagem e de outros fatores como partes da planta a serem

126 utilizadas (Ribeiro et al. 2010; Pivoto et al. 2010; Giglioti et al. 2011). Por meio de
127 técnicas utilizando cromatografia líquida de alto desempenho, pode-se analisar o perfil
128 de extratos de plantas, identificar e avaliar a composição química das mesmas (Alves,
129 2005).

130 Quando o extrato bruto é semi-purificado utilizando solventes de polaridade
131 crescentes como hexano, diclorometano, metanol, acetona, acetato de etila e butanol, os
132 respectivos extratos obtidos possuem possíveis constituintes de acordo com a polaridade
133 do solvente (Cechinel Filho, 1998). No extrato hexano podem ser encontradas
134 substâncias como esteroides terpenos e acetofenonas, substâncias altamente lipofílicas.
135 No extrato de diclorometano podem ser encontradas substâncias como ligninas,
136 flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos, cumarinas e alcalóides
137 na forma livre, substâncias lipofílicas. Nos extratos metanol e acetona ocorre extração
138 de agliconas, ceras, saponinas, iridóides e sesquiterpenos, substâncias miscíveis com
139 água. No extrato acetato de etila podem ser encontradas substâncias como taninos,
140 xantonas, ácidos triterpenos, iridóides, saponinas e compostos fenólicos em geral. No
141 extrato de butanol podem ser encontradas substâncias como flavonoides glicosilados,
142 taninos, saponinas e carboidratos (Cechinel Filho, 1998; Sonaglio et al., 2010).

143 Após testes biológicos, o extrato selecionado é submetido à técnica de
144 cromatografia em coluna aberta com sílica gel, novamente as frações são avaliadas por
145 meio de cromatografia de camada delgada. O isolamento dos compostos bioativos
146 acontece após esta fase, quando as frações são analisadas por cromatografia líquida de
147 alta eficiência. A identificação e quantificação desses compostos ocorrem com a
148 utilização da cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa e a
149 identificação da estrutura molecular das substâncias naturais ocorre por meio do uso da
150 ressonância magnética (Cechinel Filho, 1998).

151 Rosado-Aguilar et al. (2010), demonstraram eficácia de extratos vegetais em
152 isolados resistentes a organofosforados, amidinas e piretróides de 93,6%, por meio de
153 partições do extrato bruto de *Petiveria alliacea* (raiz-de-guiné), geraram frações semi-
154 purificadas, a fim de avaliar o perfil metabólico de extratos. A fração hexânica na
155 concentração de 10% obteve maior eficácia contra larvas de *R. (B.) microplus* (Teste de
156 imersão larval), com esse resultado e levando em consideração a utilização de solventes
157 de polaridade crescente na coluna cromatográfica, foi possível identificar que a ação
158 carrapaticida está presente entre os compostos apolares da planta.

159 Este tipo de pesquisa com produtos naturais faz parte de uma área em
160 crescimento constante e de extrema relevância e vêm buscando cada vez mais a
161 possibilidade de uma formulação que possa vir a ser distribuída comercialmente de
162 forma segura e eficiente (Chagas et al. 2011). Uma formulação com base em produtos
163 naturais necessita destas metodologias para garantir a descoberta de ativos naturais
164 (Newman & Cragg, 2012). A comprovação científica do uso de fitoterápicos é
165 extremamente relevante e necessária mediante a diversidade de plantas que os biomas
166 brasileiros possuem.

167 O presente estudo teve como objetivo, avaliar a atividade acaricida *in vitro* de
168 *Tabebuia aurea*, *T. rosea* e *T. serratifolia* contra larvas e adultos de *Rhipicephalus*
169 (*Boophilus*) *microplus*, além do fracionamento e caracterização da fração ativa.

170

171 **2.0. Materiais e métodos**

172 **2.1. Isolado de *R. (B.) microplus***

173 Foi utilizado um isolado de campo resistente a piretróide (deltametrina) e,
174 associação de organofosforado e piretróide (ethion e cipermetrina), sensível a amidina
175 (amitraz), associação de organofosforado e piretróide (clorpirifós e cipermetrina),

176 associação de organofosforado e organofosforado (diclorvós e clorpirifós), oriundo da
177 Universidade Federal de Uberlândia, cedida pela Embrapa Gado de Corte. Para sua
178 manutenção, foram inoculadas 5000 larvas de *R. (B.) microplus* semanalmente em um
179 bezerro, que foi previamente desparasitado e permaneceu no setor de isolamento animal
180 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

181 As teleóginas foram coletas principalmente no início da manhã e final da tarde,
182 foram lavadas e colocadas com o dorso para baixo em placas de petri e levadas a uma
183 estufa B.O.D. por 18 dias em 27° C ±1 e UR (umidade relativa) de 80%. Após este
184 período (0,25 gramas de ovos) foram pesados e mantidos também em B.O.D. em
185 seringas adaptadas (com a ponta cortada), para inoculação semanal do isolado.

186 Todos os procedimentos cumpriram com os requisitos da biossegurança, ética e
187 bem-estar na pesquisa animal, preconizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da
188 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o processo nº 410/2012.

189 **2.2. Material vegetal e análise química**

190 Foram coletadas diferentes partes de três espécies, *T. aurea* (entrecasca), *T.*
191 *serratifolia* (flor) e *T. rosea* (flor), do bioma de cerrado. Foi coletada a entrecasca do
192 caule (rica em terpenos, flavonóides, esteróides e iridóides) de indivíduos da espécie *T.*
193 *aurea*, distribuídos em um paratadal localizado na sub-região do Pantanal, Miranda-
194 Abobral, Mato Grosso do Sul - na Fazenda São Bento (19°34'7"S; 57°1'15"O), próximo
195 à Base de Estudos do Pantanal da UFMS (BEP/UFMS). As espécies *T. serratifolia* e *T.*
196 *rosea* foram coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) da
197 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), área de Cerrado situada em
198 Campo Grande, MS (20°27'S; 54°37'W). Essas espécies foram identificadas pelo
199 Herbário CG-MS/ UFMS, com autorização de acesso e de remessa de amostra de
200 Componente do Patrimônio Genético nº 010457/2010-0.

201 O método de extração para obtenção de extratos enriquecidos de especiosídeos
202 iridóides glicosilados, como é o caso da *T. aurea*, foi determinado com base na
203 metodologia proposta por Verçosa (2011). O extrato foi obtido utilizando as proporções
204 de 100g da droga vegetal (casca) em 400 mL de água quente em banho-maria, em
205 seguida adicionados 400 ml de etanol e extraído em ultrassom, por 30 minutos. Depois
206 de filtrada a solução, o resíduo de droga vegetal foi extraído novamente em ultrassom,
207 por 30 minutos, com 800 mL de etanol/água 1:1 (v/v), seguido de filtração. Este
208 procedimento foi realizado duas vezes. O filtrado obtido foi concentrado em rota-
209 evaporador, dando origem ao extrato bruto de *T. aurea*. Em seguida, parte deste extrato
210 foi submetida à partição com 160 ml de acetato de etila: metanol 85:15 (v/v), repetindo-
211 se o procedimento até exaustão da fase aquosa, entorno de 6 vezes. A fase orgânica foi
212 transferida para outro funil de separação e lavada com 20 ml de água, em seguida
213 adicionado sulfato de sódio anidro para eliminar os resquícios aquosos na fração.
214 Depois de filtrada, a fase orgânica foi concentrada em rota-evaporador e armazenada em
215 dessecador para total eliminação do solvente, o resultado é um extrato concentrado de *T.*
216 *aurea*.

217 A extração das flores de *T. rosea* foi realizada em extrator de fluido pressurizado
218 (ASE) (DIONEX®) (ASE 150), utilizando nitrogênio como gás pressurizador em
219 células de cinco e 100 ml, dependendo da quantidade do material vegetal seco. O
220 método bruto utilizado no extrator foi o seguinte:
221 Solvente: etanol/água destilada (7:3), 100° C, 1.600 psi, um ciclo, tempo estático 5 min,
222 60 % lavagem, 50 seg de purga.

223 O extrato aquoso de *T. rosea* foi desidratado em um liofilizador (CHRIST®)
224 (Alpha 2-4 LDplus), concentrado e seco em evaporador rotativo, obtendo material de
225 caráter viscoso.

226 As flores de *T. serratifolia* foram secas em estufa a 40° C, pulverizadas em um
227 moinho de facas (MARCONI®) com padronização do tamanho da partícula de 20
228 Mesh, resultando em 488,30g. Foi realizada uma extração pelo método de percolação
229 utilizando 400g de droga vegetal, álcool 70%, 20 gotas por minuto por 65 horas,
230 resultando em 2,5 litros de extrato hidroalcoólico, sendo rotaevaporado em uma
231 temperatura de aproximadamente 50°C tendo o peso final de 102,34 gramas
232 (rendimento de 25,59%).

233

234 **2.3. Isolamento e purificação dos compostos**

235 Para obtenção de uma fração de *T. aurea* enriquecida em iridoides, realizou-se
236 purificação do extrato em coluna cromatográfica, na qual 600g da resina Amberlite
237 XAD-2 (poliestireno-divinil-benzeno), ambientada com metanol por 15 minutos, em
238 seguida foi utilizada água durante 10 minutos, foram adicionados à coluna, juntamente
239 com 2 litros de água a um fluxo de 1 ml/segundo. Acrescentou-se 30g do extrato
240 solubilizado em 10 ml de água, eluído com mais 3 litros de água, assim que os
241 primeiros compostos foram coletados, a um fluxo de 50 ml/min, sendo esta fração (F1)
242 descartada. Em seguida, a amostra foi eluída com 1 litro de etanol e a fração obtida
243 (F2), rica em iridoides, foi recolhida e armazenada.

244 A fração (F2) obtida foi submetida à cromatografia em camada delgada de
245 escala preparativa. A amostra foi solubilizada em metanol e aplicada nas
246 cromatoplasmas. Depois de eluídas as placas foram reveladas no UV (270-370 nm). A
247 placa foi raspada para retirar o composto impregnado na sílica coletada, esta foi
248 colocada em um erlenmeyer e solubilizada em metanol, sob ultrasom por 10 minutos. A
249 solução foi filtrada e concentrada em rota-evaporador. A fração (F3) obtida foi
250 armazenada em dessecador para eliminação de resquícios de solvente presente.

251 Com 70 gramas do extrato hidroalcoólico de *T. serratifolia*, foi feito uma
252 partição obtendo um extrato hexânico. Este extrato hexânico foi fracionado em uma
253 cromatografia em coluna clássica, na qual foram utilizados 1,23 gramas da fração, 150
254 gramas de sílica-gel e solventes com concentrações crescentes de acordo com o
255 aumento da polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila, n- Butanol e etanol.

256 Foi obtido um extrato hexânico bruto da *T. serratifolia*, por meio de extração
257 direta em extrator utilizando hexano 8:2 acetona. Com este extrato hexânico foi
258 realizada uma partição utilizando os solventes Hexano 100%, Hexano 8:2 cloroformio,
259 Hexano 2: 8 Cloroformio, Cloroformio 100%, Acetato de etila 100%, Metanol 100%.

260

261 **2.4 . Teste de imersão larval (TIL) - Shaw (1996)**

262 O TIL foi realizado em três diferentes concentrações (70%, 40% e 20%) para *T.*
263 *aurea* e *T. serratifolia* e 40%, 20% e 5% para *T. rosea* baseado em estudo anterior
264 (dados não publicados). Os testes foram realizados em triplicata, utilizando a técnica de
265 Shaw (1996) com modificações.

266 O procedimento com as teleóginas ocorreram de acordo ao item 2.1. Após este
267 período (0,025 grama de ovos) foram pesados e mantidos também em B.O.D. em tubos
268 tipo eppendorf, com capacidade de 2 ml. Este tubo foi adaptado com um furo na tampa
269 para que houvesse passagem de ar e injeção dos tratamentos.

270 O diluente empregado nas avaliações *in vitro* de *T. aurea* e *T. serratifolia* foi a
271 água destilada, para *T. rosea* foram utilizados etanol a 20%, Tween 80 a 5% e água
272 destilada.

273 Imediatamente após a adição de 1 ml de extrato diluído nos tubos tipo eppendorf
274 contendo cerca de 500 larvas (0,025 gramas de ovos), o tubo foi fechado e agitado
275 vigorosamente durante alguns segundos e depois a 20 rpm em mesa agitadora (Mesa
276 Agitadora Microprocessada - Q225M) durante 10 minutos. Após os 10 minutos de

277 imersão, as larvas foram colocadas em envelopes de papel filtro com o auxílio de um
278 pincel, presas com prendedores de papel e mantidas em $27^{\circ} \text{C} \pm 1$ e UR (umidade
279 relativa) de 80%. Após 24 horas, foram contadas as larvas vivas e mortas. Para cada
280 extrato, foram utilizados um controle positivo (cipermetrina, diclorvós e citronelal na
281 concentração recomendada pelo fabricante) e um controle negativo (etanol a 20%,
282 Tween 80 a 5% e água destilada).

283 Após definição de atividade acaricida pelo TIL com três concentrações, na qual
284 foi definida a presença ou ausência de atividade acaricida nos extratos, o extrato
285 concentrado da *T. aurea* e o extrato bruto hidro alcoólico da *T. serratifolia* obtido pelo
286 método de percolação, extração exaustiva do princípio ativo, foram submetidos ao TIL
287 em concentrações seriadas para obtenção de uma curva dose x resposta.

288 Determinada a curva dose x resposta do extrato bruto hidro alcoólico da *T.*
289 *serratifolia*, foi realizada uma partição, obtendo um extrato hexânico, que fracionado
290 em uma cromatografia em coluna clássica, foi obtida as frações hexano, clorofórmio,
291 acetato de etila, n- Butanol e etanol/ água. Estas frações foram submetidas ao TIL com
292 uma concentração, variando de acordo com o quanto cada fração foi concentrada em
293 relação ao extrato bruto, realizado em triplicata com controle positivo e negativo.

294 Após a análise do perfil cromatográfico, um extrato hexânico bruto da *T.*
295 *serratifolia*, foi obtido por meio de extração direta em extrator, e as frações obtidas
296 foram testadas por meio do TIL com uma concentração em triplicata com controle em
297 ambos os testes de partições da *T. serratifolia* foi utilizado um controle positivo e um
298 negativo.

299

300 **2.5. Teste de imersão de adulto (TIA) - Drumond et al. (1973)**

301 Foram utilizados no TIA (Drumond et al. 1973), o extrato bruto da planta, *T.*
302 *serratifolia* e a fração hexânica obtida do mesmo extrato.

303 Os testes foram realizados em duplicata (10 fêmeas por grupo,
304 N=20/concentração) para o estudo do efeito de diferentes concentrações sobre a
305 mortalidade e os aspectos reprodutivos das fêmeas. As teleóginas foram distribuídas
306 entre as repetições de forma homogênea (de acordo com o peso). Foram testadas entre
307 quatro e oito diluições, dependendo da disponibilidade de fêmeas. Foi utilizado um
308 grupo controle positivo (cipermetrina, diclorvós e citronelal) e um negativo (água
309 destilada, etanol 20% e tween 80 5%).

310

311 **2.6. Análise estatística**

312 Para o cálculo da eficácia sobre as larvas utilizou-se:

313 $E\% = [Média \text{ de larvas mortas} / (Média \text{ de larvas vivas} + Média \text{ de larvas}$
314 $mortas)] \times 100$

315 Os valores das concentrações foram transformados logaritmicamente e as
316 médias de contagens de larvas foram expressas como percentual da frequência
317 (normalização). Foram construídas curvas sigmóides de regressão não linear da relação
318 dose x resposta destes dados transformados e normalizados. ($Y = \log Y$), empregando o
319 programa GraphPad Prism.Version 5.03 (GraphPad Software, San Diego, California.
320 USA, <http://www.graphpad.com>).

321 O critério de avaliação dos extratos foi estabelecido, de acordo com as diretrizes
322 da Associação Mundial para o Avanço da Veterinária Parasitologia (WAAVP)
323 (HOLDSWORTH et al., 2006), para avaliar a eficácia de acaricidas, eficácia superior a
324 95%.

325 Para avaliar a qualidade da curva, foi calculado o fator de determinação (R^2). Foi
326 avaliado o efeito dos extratos sobre as larvas e adultos de *R. (B.) microplus*. A eficiência
327 reprodutiva (ER) e o índice de eficácia (IE) do extrato vegetal foram calculados
328 segundo Drummond et al. (1973):

329
$$ER = (\text{Peso da massa de ovos} / \text{Peso da massa de fêmeas}) \times \% \text{ eclosão} \times 20.000$$

330
$$IE = [(\text{ER do grupo controle} - \text{ER do grupo tratado}) / \text{ER do grupo controle}] \times$$

331 100

332

333 3.0. Resultados

334 Os resultados dos testes de imersão larval com três concentrações estão
335 representados na Tabela 1. *T. aurea* obteve eficácia superior a 95% somente na
336 concentração de 70%, *T. serratifolia* obteve a mesma eficácia na concentração de 40%
337 e, *T. rosea* obteve eficácia superior a 95% somente na concentração de 40%.

338 Após definição de atividade acaricida pelo TIL, foi obtida a curva dose x
339 resposta do extrato concentrado de *T. aurea* (Fig. 1; Fig. 2), o CL_{50} foi de 33,41
340 ($IC_{95\%}$ entre 28,05 e 39,79) e o R^2 0,7591. Para o extrato bruto hidroalcoólico da *T.*
341 *serratifolia* (Fig. 3; Fig.4), o CL_{50} foi de 7,07 ($IC_{95\%}$ entre 5,975 e 8,375) e o R^2
342 0,9542. Mesmo em concentração tão baixa, 0,07%, o extrato bruto hidroalcoólico da *T.*
343 *serratifolia* conseguiu 50% de mortalidade de larvas. Após o fracionamento em uma
344 cromatografia em coluna clássica do extrato hexânico, foram obtidas as frações,
345 hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Estas frações foram submetidas ao TIL
346 com uma concentração e a fração hexânica foi a de maior eficácia com 69% de
347 mortalidade de larvas (Fig. 5).

348 Das frações do extrato bruto hexânico, avaliadas por meio do TIL, a fração
349 acetato de etila apresentou eficácia contra larvas. As porcentagens de eficácia estão
350 representadas na Figura 6.

351 Os resultados obtidos no TIA com extrato bruto de *T. serratifolia* e a fração
352 hexânica obtida do extrato bruto da *T. serratifolia* estão apresentados na Tabela 2. A
353 ação do extrato bruto sobre teleóginas resultou em 40% de mortalidade, reduziu a
354 eclodibilidade dos ovos em 90,5%, com eficácia média de 96%. O efeito da fração
355 hexânica sobre teleóginas resultou na morte 25% das fêmeas, a eclodibilidade dos ovos
356 foi de 25,65% e a eficácia média de 82% com a fração mais apolar de *T. serratifolia* na
357 concentração de 5%. A fração acetato de etila resultou em 70% de mortalidade na
358 concentração de 5%, eclodibilidade de 8,45% e média de eficácia de 99%.

359 A amostra de *T. aurea* solubilizada em metanol e aplicada nas cromatoplasas,
360 revelou no UV (270-370 nm) uma faixa azul clara visível, essa faixa é correspondente
361 ao composto iridoide.

362

363 **4.0. Discussão**

364 Este trabalho teve como objetivo a busca de novas moléculas com atividade
365 acaricida, a partir de extratos obtidos de plantas do gênero *Tabebuia*, pertencente ao
366 Cerrado do Mato Grosso do Sul. As espécies *T. aurea*, *T. rosea* e *T. serratifolia* foram
367 avaliadas pela primeira vez quanto atividade acaricida. Entre as três espécies, a de
368 melhores resultados foi a *T. serratifolia*, a qual foi particionada por dois métodos
369 distintos e apresentou resultados de eficácia elevada mesmo após a partição.

370 As plantas do gênero *Tabebuia* pertencem ao Cerrado, bioma onde ocorre maior
371 diversidade taxonômica quando comparado à Amazônia, o que implica em maior
372 distanciamento filogenético entre as espécies e conseqüente diversidade química

373 (Gottlieb & Borim, 1994). Segundo Kaplan et al. (1994), as espécies do Cerrado
374 possuem uma grande variedade de compostos presentes em baixa quantidade, diferente
375 das espécies da Mata Atlântica, que dispõem de pouca variedade de compostos mas em
376 grande quantidade. Por estas características pertinentes ao Cerrado, neste trabalho foram
377 utilizadas altas concentrações no extrato bruto de *T. aurea*, *T. rosea* e *T. serratifolia*.

378 *Tabebuia aurea* e *T. rosea* apresentaram no TIL em três concentrações, média de
379 eficácia superior a 95% somente na maior concentração avaliada, 70% e 40%,
380 respectivamente, enquanto que *T. serratifolia* apresentou eficácia superior a 95% nas
381 concentrações de 70% e 40% e, de 90% na concentração de 20%. Por isso, a *T.*
382 *serratifolia* foi escolhida para ser fracionada e reavaliada. Além disso, o extrato bruto
383 (concentrado) de *T. aurea* apresentou CL50 de 33,41 contra larvas de *R. (B.) microplus*,
384 enquanto *T. serratifolia* (bruto) apresentou CL50 de 7,07, portanto 4,72 vezes menor do
385 que *T. aurea*. Enquanto o extrato bruto hidroalcoólico da *T. serratifolia* conseguiu 50%
386 de mortalidade de larvas mesmo na concentração de 7,07%, *T. aurea* só alcançou este
387 mesmo resultado na concentração de 33,41%. No caso do emprego in vivo, ou em larga
388 escala, a quantidade de extrato necessária seria bem menor utilizando *T. serratifolia*.

389 O R² de *T. aurea* foi 0,7591, pois foram utilizadas concentrações muito baixas
390 do extrato, o resultado foram percentuais de eficácia muito próximos e reduzidos, o que
391 não caracteriza *T. aurea* como uma planta ineficaz, é necessário o ajuste das
392 concentrações para uma curva dose x resposta melhor. Para o extrato bruto
393 hidroalcoólico da *T. serratifolia* o R² foi 0,9542, isso foi possível ao estreitar a
394 distâncias entre as concentrações.

395 A casca de *T. aurea* é rica em iridoídeos, flavonóides, esteróides e terpenóides.
396 (Guerbas Neto, 2003), sendo o composto majoritário e de alta concentração, o
397 especiosídeo iridoide 6-O-E-*p*- cumaroilcatalpol (20 vezes maior do que a quantidade

398 encontrada nas folhas) (Verçosa, 2011). A folha de *T. aurea* apresenta perfil
399 cromatográfico mais complexo, há presença de um número maior de substâncias,
400 inclusive deste mesmo especiosídeo, no entanto, o teor é muito baixo em relação ao
401 encontrado na casca (Verçosa, 2011).

402 Neste estudo, apesar da riqueza de metabólitos encontrados em *T. aurea*, sua
403 atividade foi baixa quando comparada à *T. serratifolia*, o mesmo resultado de *T. aurea*
404 foi observado para *T. rosea*.

405 Neste estudo a *T. serratifolia* foi submetida a duas diferentes partições (semi-
406 purificação), com solventes de polaridade crescente, o que caracterizou a presença de
407 atividade acaricida entre os compostos apolares da planta. Na primeira partição, foram
408 utilizados os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, n- Butanol e etanol, a partir
409 da planta pulverizada foi realizado um extrato bruto hexânico e, em seguida foi
410 realizada uma partição com os solventes hexano 100%, hexano 8:2 cloroformio, hexano
411 2: 8 cloroformio, cloroformio 100%, acetato de etila 100% e metanol 100%.

412 Em cada semi-purificação apenas uma fração apresentou eficácia sobre larvas de
413 *R. (B.) microplus*, a fração hexânica da primeira semi-purificação realizada com o
414 extrato bruto hidro alcoólico de *T. serratifolia* (69%) e, a fração acetato de etila da
415 segunda semi-purificação (100%). A fração hexânica é a porção mais apolar do extrato
416 desta planta, enquanto que a fração acetato de etila (fração da fração hexânica)
417 representa uma porção polar, inserido nesta fração apolar, levando em consideração a
418 utilização de solventes de polaridade crescente nas colunas cromatográficas.

419 Rosado-Aguilar et al. (2010), demonstraram eficácia de *Petiveria alliacea* (raiz-
420 de-guiné) por meio de partições do extrato bruto da planta. Foram geradas frações semi-
421 purificadas a fim de avaliar o perfil metabólico do extrato. Assim como ocorreu no
422 presente estudo com a *T. serratifolia*, a fração hexânica de *P. alliacea* obteve maior

423 eficácia contra larvas de *R. (B.) microplus* na concentração de 10% e apresentou
424 eficácia de 93,6% no teste de imersão larval.

425 O extrato bruto de *T. serratifolia* apresentou média de eficácia sobre larvas, na
426 concentração de 40%, de 99,53% e, na mesma concentração, sobre teleóginas, a média
427 de eficácia foi de 96%. A eficácia sobre larvas foi em relação à mortalidade das
428 mesmas, enquanto que sobre as teleóginas, a mortalidade foi de 40% e a eficácia do
429 extrato resultou da mortalidade das fêmeas e interferência sobre a eclodibilidade dos
430 ovos, que foi reduzida em 90,5%.

431 A fração hexânica (primeira partição) de *T. serratifolia* foi enriquecida 36 vezes,
432 em relação ao extrato bruto da planta, ou seja, as substâncias presentes nesta fração,
433 ativas ou não, passaram por um processo de concentração. Por isso na avaliação sobre
434 teleóginas a maior concentração avaliada foi de apenas 5%. Nesta concentração houve
435 25% de mortalidade das fêmeas, a redução na eclodibilidade foi de 74,35% e a eficácia
436 média de 82%. A média de eficácia em adulto foi maior do que a média de eficácia
437 obtida contra larvas, que foi de 69%.

438 *Tabebuia serratifolia* apresenta alto teor do composto lapachol presente na casca
439 do caule e outras espécies de *Tabebuia* possuem na casca e no cerne do caule
440 quantidades variáveis de lapachol e de outras substâncias, assim como outras plantas da
441 família Bignoniaceae (Ferreria et al. 2004). O lapachol possui várias funções descritas
442 na literatura, como antimalárico, esquistossomicida, antiviral, antiinflamatório e
443 anticâncer (Oliveira et al. 1990). É possível que o lapachol esteja presente também nas
444 flores de *T. serratifolia*, bem como outras substâncias, em maior ou menor quantidade.

445 O extrato bruto de *T. serratifolia* apresentou na concentração de 40%, média de
446 eficácia de 100% e 96% sobre larvas e adultos de *R. (B.) microplus* respectivamente.
447 Quando avaliada sua fração hexânica a concentração foi bem menor em relação ao

448 extrato bruto, 1,67% para larvas e de 5% para adultos. A eficácia de 69% para larvas e
449 86% para adultos em relação à baixa concentração utilizada foi satisfatória. Quando
450 avaliada a fração mais pura deste trabalho, fração acetato de etila, o resultado de
451 atividade acaricida se manteve no caso das larvas (100% de eficácia na concentração de
452 24%) e, aumentou com adultos (99% na concentração de 5%), apresentando 70% de
453 mortalidade, número bem maior do que o obtido com o extrato bruto e a fração hexânica
454 de *T. serratifolia*.

455 Neste trabalho foi realizada uma Cromatografia em Coluna com a fração
456 hexânica obtida do extrato bruto de *T. serratifolia*. O fracionamento separou os
457 compostos pela polaridade, apenas a fração hexânica demonstrou atividade à primeira
458 avaliação do extrato semi-purificado, neste caso os compostos apolares da planta foram
459 os responsáveis pela eficácia da fração.

460 De posse desta informação, foi realizado um segundo extrato de *T. serratifolia*,
461 agora um extrato apolar, visando somente os compostos ativos. Com este extrato apolar
462 (bruto hexano) foi realizada uma nova separação de compostos, assim, o (s) composto
463 (s) ativo (s) ficou somente em um das frações (acetato de etila), por isto todas as outras
464 foram inativas. A fração ativa contem os compostos em alta concentração.

465 As frações obtidas após a coluna cromatográfica da fração hexânica (primeiro
466 fracionamento), foram avaliadas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear,
467 no entanto, as amostras estavam contaminadas com ácidos graxos (provindos do
468 solvente), optou-se por realizar novas técnicas cromatográficas na análise do extrato
469 apolar de *T. serratifolia*, pois a contaminação que ocorreu com a primeira fração
470 poderia mascarar os resultados. Novas análises em prol da elucidação química e
471 estrutural de *T. serratifolia* estão em andamento.

472 Os resultados apresentados neste estudo fornecem o primeiro relatório da
473 atividade acaricida sobre larvas e adultos de *R. (B.) microplus*, principalmente com o
474 extrato bruto de *T. serratifolia* e suas respectivas frações, hexânica e acetato de etila.

475

476 **5.0. Conclusão**

477 O extrato bruto hidro alcóolico de *T. aurea* e *T. rosea* apresentam atividade
478 acaricida *in vitro* sobre larvas de *R.(B.) microplus*, nas concentrações de 70% e 40%
479 respectivamente. O extrato bruto hidro alcóolico e a fração hexânica da flor de *T.*
480 *serratifolia*, apresentam atividade acaricida em larvas e teleóginas de *R.(B.) microplus*.
481 A fração acetato de etila da *T. serratifolia* possui eficácia superior a 95% na
482 concentração de 24% sobre larvas de *R.(B.) microplus* e, na concentração de 5% sobre
483 adultos da mesma espécie. Considerando os resultados da fração hexânica e fração
484 acetato de etila, concluímos que os compostos apolares da *T. serratifolia* são os
485 responsáveis pela atividade acaricida da planta.

486

487 **6.0. Referências bibliográficas**

488 Alves. F. N. R., 2005. Desafio para inovação de fitomedicamentos no contexto da
489 indústria farmacêutica nacional. Revista Fito, 1: 18-29.

490 Cechinel Filho. V., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente
491 ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para
492 otimização da atividade. Química Nova, 21(1).

493 Chagas. A. C. S., Georgetti. C. S., Carvalho. C. O., Oliveira, M. C. S., Rodrigues. R. A.
494 F., Foglio. M. A., Magalhães. P. M., 2011. In vitro activity of *Artemisia annua* L
495 (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista Brasileira
496 de Parasitologia Veterinária, v. 20, p. 31-35.

- 497 Dousseau. S., Alvarenga. A. A., Castro. E. M., Soares. R P., Emrich. E. B., Melo. L. A.,
498 2008. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas
499 *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. Ciência e agrotecnologia. V.32, n.6, p. 1694-
500 1700.
- 501 Drummond, R.O., Ernest. S. E., Trevino. J. L., 1973. *Boophilus annulatus* and *B.*
502 *microplus*: laboratory tests of insecticides. Journal of Economic Entomology, v.66, n.1,
503 p.130-133.
- 504 Ferreira. L. 2004. Ipê- amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nickols. Informativo
505 técnico rede de sementes da Amazônia. Versão impressa ISSN 1679-6500 Versão on-
506 line ISSN 1679-8058. Acesso em 23 de janeiro de 2013.
- 507 Guerbas Neto. P., 2003. Estudo químico da casca, folhas e cerne de um espécime de
508 *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae) coletado no Pantanal. (2003). 120 f. (Mestrado),
509 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- UFMS, Campo Grande- MS.
- 510 Gottlieb, O. R. & Borin, M. R. M. B. 1994. The diversity of plants. Where is it? Why is
511 it there? What will it become? Anais da Academia Brasileira de Ciências (Supl. 1 -
512 Parte I): 205-210.
- 513 Han. J., Ye. M., Xu. M., Sun. J., Wang. B., Guo. D., 2007. Characterization of
514 flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid
515 chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. Journal of
516 Chromatography B, 848 (2007) 355–362.
- 517 Holdsworth PA, Kemp D, Green P, Peter RJ, de Bruin C, Jonsson NN et al. World
518 Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) Guidelines
519 for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants.
520 Veterinary Parasitology, 136: 29-43. 2006.

- 521 Jorge. L. I. F., 2000. Botânica aplicada ao controle de qualidade de alimentos e de
522 medicamentos. São Paulo: Atheneu.
- 523 Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R. & Gottlieb, O. R. 1994. Chemical diversity of
524 plants from Brazilian Cerrados. Anais da Academia Brasileira de Ciências (Supl. 1 -
525 parte I): 50-55.
- 526 Lohmann. L. G., Silva-Castro. M. M., 2009. Bignoniaceae. In: Giulietti. A. M., Rapini.
527 A., Andrade. M. J. G., Queiroz. L. P., Cardoso da Silva. J. M. (Ed.). Plantas raras do
528 Brasil. Belo Horizonte, MG: Conservação Internacional, p. 96-100, 2009.
- 529 Marinho, M. L., Alves, M. S., Rodrigues, M. L. C., Rotondano, T. E. F., Vidal, I.F.,
530 Silva, W. W., Athayde, A. C. R., 2007. A utilização de plantas medicinais em medicina
531 veterinária: um resgate do saber popular. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.9,
532 n.3, p.64-69.
- 533 Newman, D. J. & Cragg, G. M. 2012. Produtos naturais como fontes de novas drogas
534 ao longo dos 30 anos de 1981-2010. Journal of Natural Products, 75 (3):311-35.
- 535 Neto. G.G, & Moraes. R. G. 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato
536 Grosso: um estudo bibliográfico. Acta Botânica Brasilica. 17(4): 561-584.
- 537 Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Miraglia, M. C. M.; Mesquita, A. A. L.; Zani, C. L ;
538 Ferreira, D. T. ; Maia, J. G. S. 1990. Chemical structures and biological activities of
539 naphthoquinones from Brazilian Bignoniaceae. Química Nova. 13: 302-307.
- 540 Pivoto. F. L., Buzatti. A., Krawczak. F. S., Camillo. G., Sangioni. L. A., Zanetti. G. D.,
541 Manfron. M. P., Vogel. F. S. F., 2010. Ação acaricida in vitro de *Tropaeolum majus* sob
542 teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ciência Rural, Santa Maria, v. 40,
543 n. 10, p. 2141-2145.
- 544 Ribeiro, V.L.; dos Santos, J.C.; Bordignon, S.A.; Apel, M.A.; Henriques, A.T.; von
545 Poser, G.L.; 2010. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens*

546 (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Bioresource
547 Technology. 101, 2506–2509.

548 Resolução de diretoria colegiada - RDC N° 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o
549 registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo,
550 Brasília, DF, 5 abr. 2010

551 Rosado-aguilar, J. A. Aguilar-Caballero, A. Rodriguez-Vivas, R. I. Borges-Argaez, R.
552 Garcia-Vazquez, Z. Mendez-Gonzalez, M., 2010. Acaricidal activity of extracts from
553 *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus)*
554 *microplus* (Acari: ixodidae). Veterinary Parasitology 168, 299–303.

555 Shaw, R. D., 1966. Culture of an organophosphate resistant strain of *Boophilus*
556 *microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. Bulletin of
557 Entomological Research 56 four, pp 398-405.

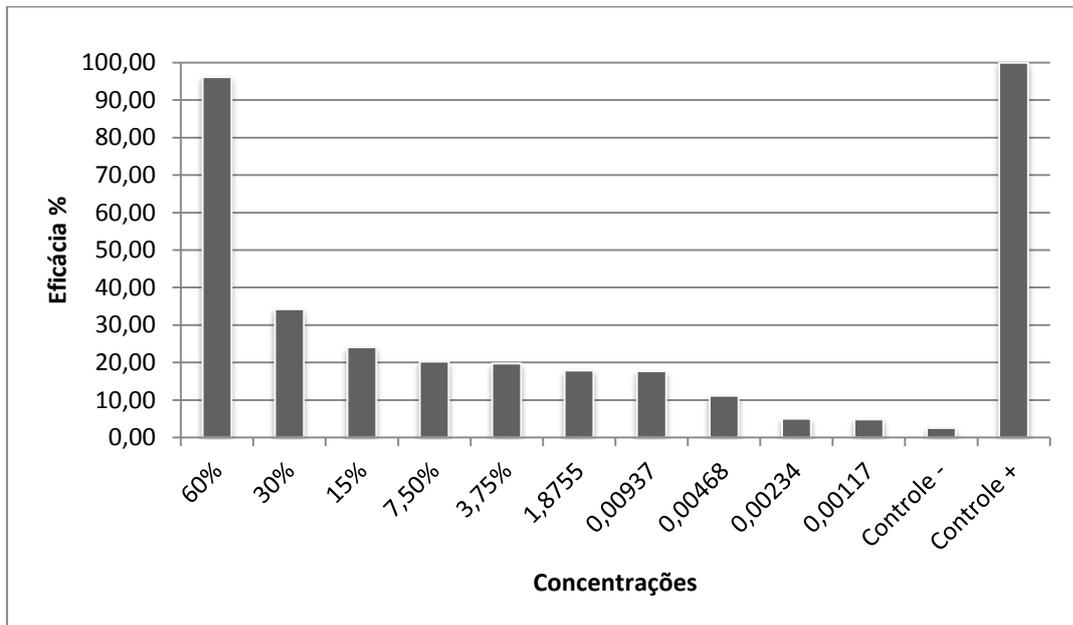
558 Soares, A.O., 2006. Estudo fitoquímico das flores e casca do caule de um espécime de
559 *Tabebuia caraíba* (Bignoniaceae) coletado na região do Cerrado em Mato Grosso do Sul.
560 Mestrado em Química, Campo Grande, MS.

561 Verçosa. D. 2011. Variação sazonal e espacial de metabólitos secundários em formação
562 monodominante de *Tabebuia aurea*. Dissertação de mestrado. Campo Grande, MS:
563 UFMS. 63 f.

Tabela 1- Eficácia média do extrato bruto de *T. aurea*, *T. serratifolia* e *T. rosea* no Teste de imersão larval (TIL) em três concentrações contra *R. (B.) microplus*.

Espécie	Parte coletada	Concentrações		
		20%	40%	70%
<i>Tabebuia aurea</i>	casca	0,49	2,08	96,92
<i>Tabebuia serratifolia</i>	flor	90,62	99,53	100
		5%	20%	40%
<i>Tabebuia rosea</i>	flor	1,52	73,67	99,41

Figura 1- Média de eficácia do extrato concentrado de *T. aurea* no Teste de imersão larval em dez concentrações seriadas, sobre *R. (B). microplus*.



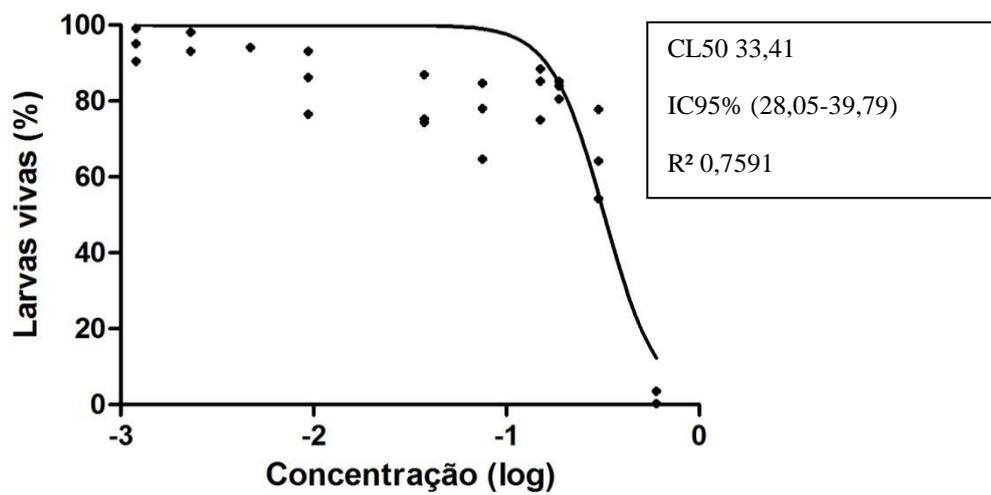
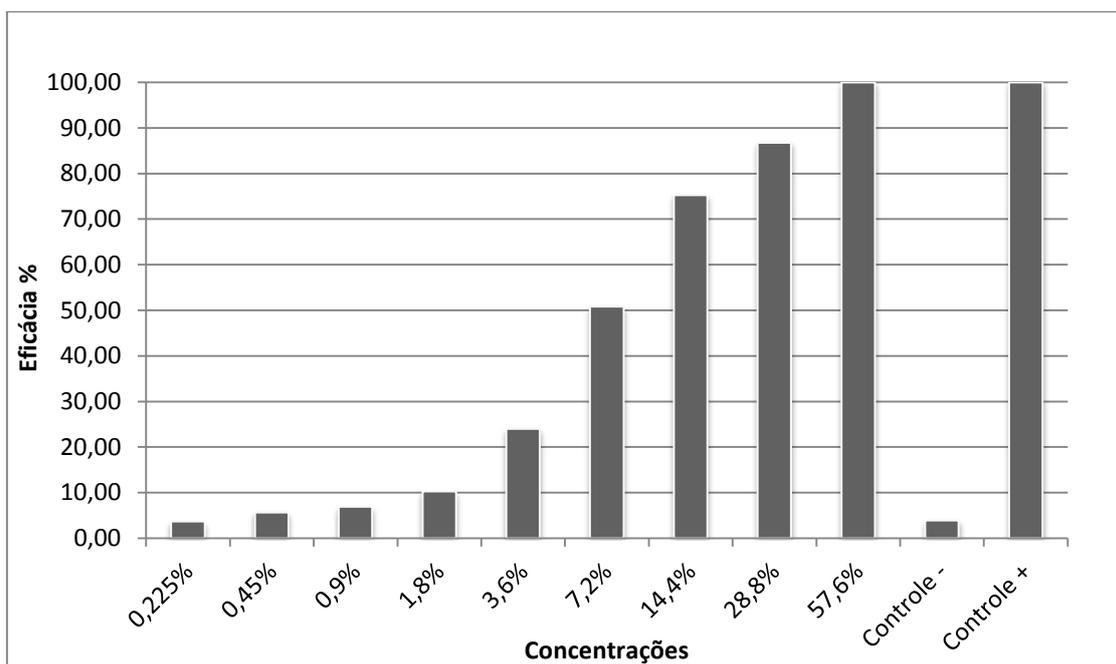


Figura 2- Curva dose X resposta do Teste de imersão larval do extrato bruto concentrado de *T. aurea* sobre larvas de *R. (B.) microplus* em 10 diferentes concentrações entre 60% e 0,117%.

Figura 3- Média de eficácia do extrato bruto hidroalcoólico de *T. serratifolia* no Teste de imersão larval em dez concentrações seriadas, sobre *R. (B.) microplus*.



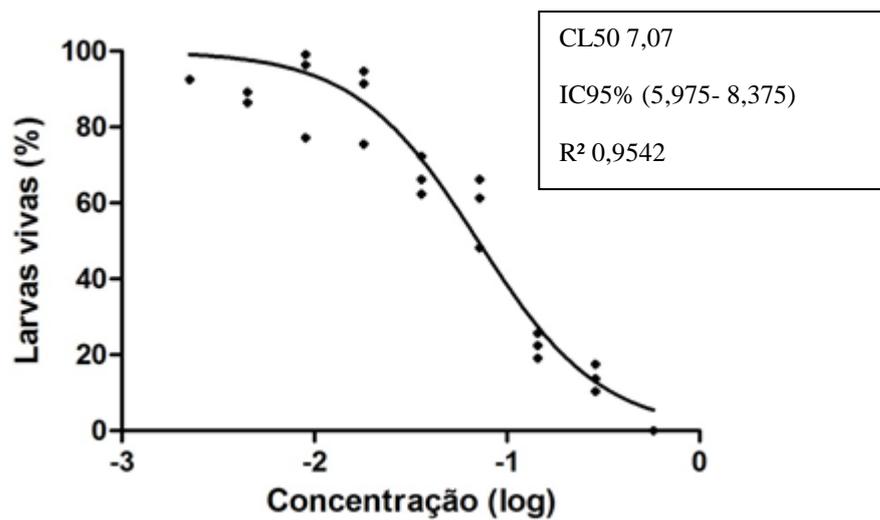


Figura 4- Curva dose X resposta do extrato bruto da *T. serratifolia* no Teste de imersão larval em 10 diferentes concentrações entre 57,6% e 0,225%, sobre *R. (B). microplus*.

Figura 5- Média de eficácia das frações obtidas do extrato hexânico bruto obtido do extrato hidroalcoólico de *T. serratifolia*, no Teste de imersão larval sobre *R. (B.) microplus*.

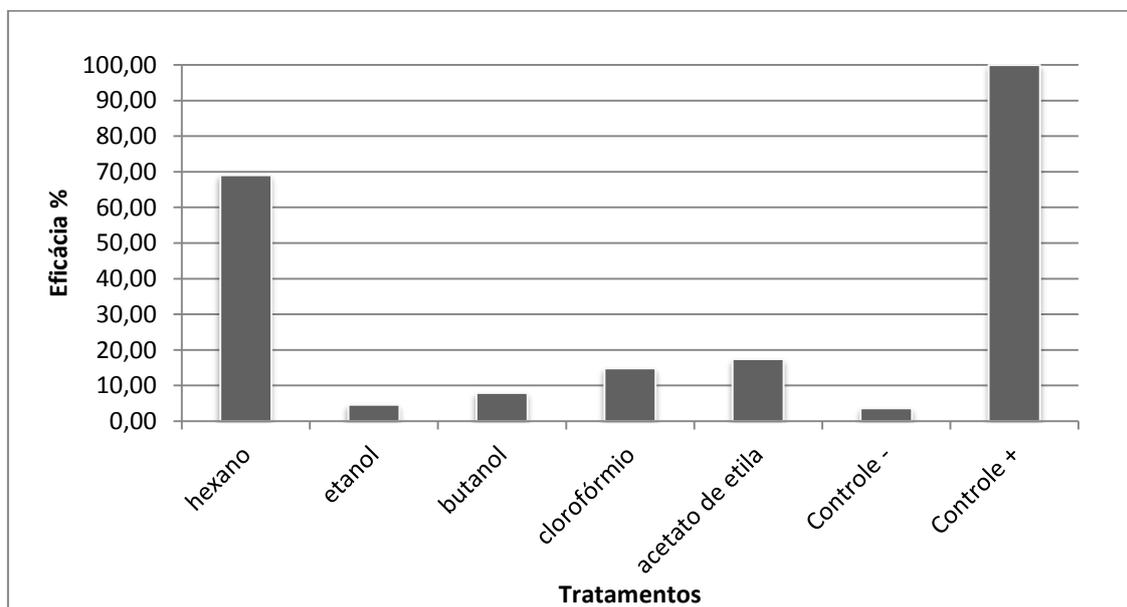


Figura 6- Média de eficácia das frações do extrato hexânico bruto de *T. serratifolia*, obtidas do extrato hexânico bruto obtido diretamente em extrator, no teste de imersão larval sobre *R. (B.) microplus*.

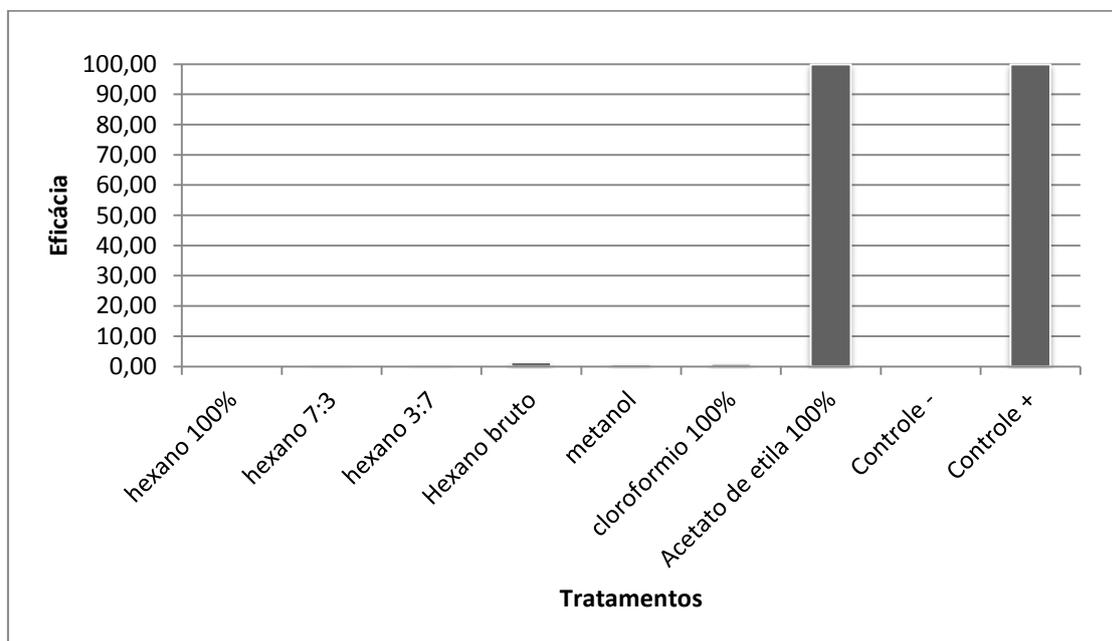


Tabela 2- Médias de peso das teleóginas de *Rhipicephalus (B.) microplus*, do peso da ovipostura, da eclodibilidade e eficiência acaricida do extrato bruto, fração hexânica de *T. serratifolia* e fração acetato de etila, no teste de imersão de adultos (TIA), segundo Drummond et al. (1973). Teste realizado em duplicata, 10 fêmeas por grupo.

Imersão de adulto						
Extrato	Concentração (%)	Peso das fêmeas (g)	Peso dos ovos (g)	Eclodibilidade (%)	Eficiência reprodutiva	Eficácia média (%)
<i>T. serratifolia</i>	40%	2,11	0,344	9,4	30638	96
Extrato bruto	10%	2,10	0,608	22,6	130695	85
	2,50%	2,16	0,851	20,3	159735	81
	0,63%	2,14	1,003	41,2	385193	56
	Controle -	2,13	1,075	85,9	864326	
	Controle +	-	-	-	-	100%
<i>T. serratifolia</i>	5%	2,59	0,614	25,6	121615	82
Fração hexânica	2,50%	2,60	0,732	26,6	150423	79
	1,25%	2,58	1,123	74,8	652304	10
	0,63%	2,60	1,213	71,1	663866	9
	0,30%	2,58	1,199	70,3	654023	10
	0,16%	2,59	1,225	67,5	637760	12
	0,07%	2,59	1,193	74,3	685117	6
	0,04%	2,58	1,190	89,9	830711	0
	Controle -	2,59	1,276	73,8	727028	
	Controle +	-	-	-	-	100%
<i>T. serratifolia</i>	5%	2,26	0,18	8,45	13460	99
Fração Acetato de etila	2,5%	2,24	0,28	37,8	94500	90
	1,25%	2,28	0,52	61,2	279158	70
	0,63%	2,22	0,87	81,3	637216	31
	Controle -	2,22	1,158	89,3	931616	-2
	Controle +	2,23	-	-	-	100