

JULIANA ANTUNES FARIAS

EFEITO ACARICIDA *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) EM LARVAS E ADULTOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

Dissertação apresentada no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. PhD. Antonio
Pereira de Souza
Coorientadora: Dra. PhD. Claudia
Cristina Gulias
Gomes

LAGES/SC

2014

F224e Farias, Juliana Antunes
Efeito acaricida *in vitro* de extratos de
Baccharis trimera, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium*
buniifolium (Asterales: Asteraceae) em larvas e
adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
(Acari: Ixodidae) / Juliana Antunes Farias. -
Lages, 2014.

111 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Antonio Pereira de Souza

Coorientadora: Claudia Cristina Gulas Gomes

Bibliografia: p. 96-102

Dissertação (mestrado) - Universidade do
Estado de

Santa Catarina, Centro de Ciências

Agroveteinárias, Programa de Pós-Graduação em

Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Carrapato. 2. Bovino. 3. *Vernonia nudiflora*.
4. *Baccharis trimera*. 5. *Eupatorium buniifolium*.
6. Testes carrapaticidas *in vitro*. I. Farias,
Juliana Antunes. II. Souza, Antonio Pereira de.
III. Universidade do Estado de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV.
Título

JULIANA ANTUNES FARIAS

EFEITO ACARICIDA *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) EM LARVAS E ADULTOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

Dissertação apresentada no Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: 
Professor Dr. Antonio Pereira de Sousa
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC/CAV

Membro: 
Professor Dr. Anderson Barbôsa de Moura
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC/CAV

Membro: 
Professor Dr. Felipe Geraldo Pappen
Instituto Federal Catarinense - IFC

Suplente: 
Médica Veterinária Dr^a Cristina Perito Cardoso
Companhia Integrada de Desenvolvimento Agropecuário de Santa Catarina - CIDASC

LAGES, SC 10 DE JULHO DE 2014.

Aos meus pais, Antonio Joel e Elizabete, à
minha irmã Joelma e à minha sobrinha Marina.
Ao amigo Bernardo.
Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui!
Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus Santos de devoção por terem me dado força para enfrentar este desafio e por ter escolhido esta profissão.

À minha família, meu esteio. Em especial aos meus pais pela educação, amor e esforço, sem a ajuda deles seria impossível à realização de mais esta etapa. Agradeço os conselhos, a preocupação, o apoio e a torcida em cada conquista alcançada. Meus pais são exemplos de humildade, honestidade, respeito, trabalho, amor e fé a serem seguidos. À minha irmã, Joelma pelo companheirismo, e por sempre me incentivar. Ao meu cunhado, Guilherme, que veio fazer parte da nossa família. A vocês, muito obrigado por tudo, e por me darem o presente mais puro e lindo deste mundo, minha sobrinha Marina.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Pereira de Souza, um exemplo de profissional a ser seguido, muito obrigado pelos ensinamentos e paciência.

À minha coorientadora, Dra. Claudia C. G. Gomes pelos ensinamentos e paciência, por disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Sanidade Animal-CPPSUL.

A todos os funcionários do Laboratório de Sanidade Animal, em especial ao Bernardo M. Frank e à Rossana L. Granada, excelentes profissionais, pelas longas horas de trabalho. Mesmo tendo que repetir muitas vezes os experimentos, nunca desistiram e me ajudaram em todos os momentos. Vocês foram fundamentais. Muitíssimo obrigado.

Ao Dr. Alessandro P. Minho pelos ensinamentos e colaboração.

À Dra. Emanuelle Gaspar por nos emprestar seus equipamentos e pelos ensinamentos disponibilizados.

Ao Robert Domingues pelos ensinamentos e paciência.

Aos estagiários, Lincoln, Amanda, Ana Claudia, Rodrigo, Jemhally e Raoni, muito obrigado pela amizade e colaboração.

Aos professores, Graciela Maldaner (URCAMP) e Flávio Pavan (UNIPAMPA) por gentilmente nos emprestar seus equipamentos para a elaboração dos extratos e pelos ensinamentos disponibilizados.

Ao Professor Davi Miquelluti pelos ensinamentos e colaboração.

À colega e amiga Marcia Lavina, muito obrigada pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Animal e Doenças Parasitárias e do curso de mestrado em Ciência Animal – CAV/UEDESC, Marcio Orides, Rodrigo Rodrigues, Mayckon Antonio, Michelle Federle, Renata Arruda, Renata Casali, Rozyanne Antunes e à Nádia Oliveira obrigado pelos momentos de descontração e amizade.

Aos financiadores: EMBRAPA, CAPES e FAPERGS.

Enfim, muito obrigado a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FARIAS, Juliana Antunes. **Efeito acaricida *in vitro* de extratos de *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora*, e *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) em larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2014. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito, hematófago e monóxeno, cujo hospedeiro preferencial é o bovino, sendo um dos grandes entraves para a produção pecuária devido aos prejuízos econômicos decorrentes de seu parasitismo. Em todo o Brasil, e na vasta área onde se estabelece o Bioma Pampa, a pecuária desempenha um papel primordial no desenvolvimento da economia. A realização desse projeto teve como proposta explorar o potencial da flora nativa do Bioma Pampa, investigando o efeito acaricida *in vitro* de extratos de *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium buniifolium* em *R. (B.) microplus*. Ensaios preliminares foram necessários para avaliar a sensibilidade da cepa de *R. (B.) microplus*, usada no estudo, a bases comerciais, também ao polissorbato 80 para uso deste como solvente dos extratos e foi avaliado simultaneamente três técnicas de imersão de larvas utilizando seringas. Verificou-se que, o polissorbato 80 a 5% e a 10% não provocou mortalidade superior a 3,5% em larvas e teleóginas podendo ser utilizado em testes com diferentes ínstares de *R. (B.) microplus*. O experimento 1 foi realizado

com objetivo de comparar duas novas modificações da técnica original (T1) do Teste de Imersão de Larvas em Seringas, sendo a primeira modificação a utilização de 100 larvas e o tempo de imersão para cinco minutos (T2), a segunda consistiu na adição de 2 mL de solução acaricida, tempo de imersão de 30 segundos em seringas sem orifício lateral (T3). Não houve diferença estatística entre as técnicas, porém, devido à maior praticidade de execução da técnica descrita por (T3), optou-se por usar esta metodologia nos ensaios com extratos de plantas. O experimento 2 foi realizado para avaliar a atividade acaricida dos extratos aquosos, metanólicos e hexânicos de *B. trimera*, *V. nudiflora*, e *E. buniifolium* em larvas e adultos de *R. (B.) microplus*. A utilização dos extratos metanólicos e hexânicos de *B. trimera* induziram 38,96% e 52,02% de mortalidade de larvas na maior concentração testada 25600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em teleóginas, observou-se eficácia do extrato metanólico de *V. nudiflora* e de *B. trimera* próximo de 30%, nas concentrações de 12800 e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os extratos de *E. buniifolium* e os extratos aquosos não apresentaram atividade acaricida. Os resultados indicam potencial acaricida dos extratos metanólico e hexânico de *B. trimera* em *R. (B.) microplus*.

Palavras-chave: Carrapato. Bovino. *Vernonia nudiflora*. *Baccharis trimera*. *Eupatorium buniifolium*. Testes carrapaticidas *in vitro*.

ABSTRACT

FARIAS, Juliana Antunes. **Acaricide *in vitro* effect of *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* and *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) extracts in larvae and adults of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2014. 111 p. Dissertation (Master in Animal Science – Universidade do Estado de Santa Catarina) Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2014.

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an ectoparasite, hematophagous and monoxenous, whose preferential host are the bovines, is one of the major obstacles for cattle raising production due to economic damages from its parasitism. Throughout Brazil, and in the wide area where pampa biome is, cattle raising plays a key role in economy development. The present project aimed to explore the potential of the pampa biome native flora by investigating the *in vitro* acaricide effect of *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* and *Eupatorium buniifolium* extracts for the control of *R. (B.) microplus*. Previous tests were needed to evaluate the sensitivity of the strain of *R. (B.) microplus* used in the study, in commercial basis, also the polysorbate 80 to use it as a solvent of the extracts and three techniques of immersion of larvae using syringes were simultaneously evaluated. It was found that polysorbate 80 at 5% and 10% did not cause mortality rates higher than 3.5% in larvae and engorged females so that it can be used in tests with different instar *R. (B.) microplus*. Experiment 1 was conducted to compare two new modifications of the Immersion Test Larvae in Syringes original technique (T1), the first modification using 100 larvae

and a five-minute immersion (T2), the second consisted in the addition of 2 mL of acaricide solution, 30 seconds immersion in syringes without side hole (T3). There was no statistical difference between techniques, however, due to a better practicality of the technique described by (T3) and reviewers, we chose to use this methodology in essays with plant extracts. Experiment 2 was accomplished to evaluate the acaricidal activity of aqueous extracts, methanol and hexane of *V. nudiflora*, *B. trimera* and *E. buniifolium* in engorged females and larvae of *R. (B.) microplus*. The use of hexane and methanol extracts of *B. trimera* induced 38.96% and 52.02% mortality of larvae at the highest concentration tested 25600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In engorged females, we observed efficacy *V. nudiflora* field and *B. trimera* methanol extracts around 30% at concentrations of 12800 and 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The extracts of *E. buniifolium* and aqueous extracts did not show acaricidal activity. The results indicate acaricide potential of methanol and hexane extracts of gorse in *R. (B.) microplus*.

Key-words: Tick. Bovine. *Vernonia nudiflora*. *Baccharis trimera*. *Eupatorium buniifolium*. Acaricide *in vitro* tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	-	Análise da Variância
BHC	-	Benzenohexaclorado
BOD	-	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CSIRO	-	Comunidade Científica e Organização Pesquisa Industrial
DPI	-	Departamento de Indústrias Primárias Queensland
DDT	-	Dicloro-difenil-tricloroetano
DD	-	Dose Discriminante
EFV	-	Extratos Frutos Verdes
EFM	-	Extratos Frutos Maduros
EFMA	-	Extratos Frutos Maduros Armazenados
EFMAG	-	Extratos Frutos Maduros Armazenados a 4°C
CPPSUL	-	Embrapa Pecuária Sul
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
IPVDF	-	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
RS	-	Rio Grande do Sul
TIA	-	Teste de Imersão de Adultos
TIL	-	Teste de Imersão de Larvas
TILS	-	Teste de Imersão de Larvas em Seringas
TPL	-	Teste do Pacote de Larvas
TPB	-	Tristeza Parasitária Bovina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Baccharis trimera</i> (carqueja).....	50
Figura 2 – <i>Vernonia nudiflora</i> (alecrim-do-campo)	52
Figura 3 – <i>Eupatorium buniifolium</i> (chirca).....	53

EXPERIMENTO 1

Figura 1– Comparação da ação letal da associação entre cipermetrina e clorpirifós em nove diluições seriadas considerando 100% (cipermetrina 150 ppm e 250 ppm de clorpirifós) em larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> avaliado por meio das técnicas de imersão de larvas descritas por Souza et al. (2008), Silva et al. (2011) e Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012)	63
Figura 2 – Efeito dose-resposta da ação letal de acaricida comercial à base de cipermetrina (150 ppm) e clorpirofós (250 ppm) em larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> avaliado por meio das técnicas de imersão de larvas: Souza et al. (2008) (A), Silva et al. (2008) (B) e Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) (C).....	64

EXPERIMENTO 2

Figura 1 – Sistema desenvolvido para preenchimento de seringas com larvas	78
Figura 2 – Efeito acaricida <i>in vitro</i> de extratos aquosos, metanólicos e hexânicos de <i>Vernonia nudiflora</i> , <i>Baccharis trimera</i> e <i>Eupatorium buniifolium</i> (A, B e C) em larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	82
Figura 3 – Efeito dose-resposta da ação letal do extrato hexânico de <i>Baccharis trimera</i> em larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	83

Figura 4 – Percentual de Eficácia dos extratos aquosos e metanólicos de <i>Vernonia nudiflora</i> , <i>Baccharis trimera</i> e <i>Eupatorium buniifolium</i> (A, B e C) em teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	84
Figura 5 – Percentual de Inibição de Oviposição dos extratos aquosos e metanólicos de <i>Vernonia nudiflora</i> , <i>Baccharis trimera</i> e <i>Eupatorium buniifolium</i> (A, B e C) em teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	86
Figura 6 – Percentual de Inibição de Eclosão dos extratos aquosos e metanólicos de <i>Vernonia nudiflora</i> , <i>Baccharis trimera</i> e <i>Eupatorium buniifolium</i> (A, B e C) em teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais diferenças entre três Técnicas de Imersão de Larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> utilizando seringas	41
---	----

EXPERIMENTO 1

Quadro 1– Principais diferenças entre as três Técnicas de Imersão de Larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> utilizando seringas	62
---	----

EXPERIMENTO 2

Quadro 1 – Caracterização química das plantas: <i>Vernonia nudiflora</i> , <i>Baccharis trimera</i> e <i>Eupatorium buniifolium</i>	76
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 PREJUÍZOS ECONÔMICOS CAUSADOS PELO PARASITISMO POR <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ...	33
2.2 CONTROLE QUÍMICO	34
2.3 TÉCNICAS <i>IN VITRO</i> PARA DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA AOS ACARICIDAS UTILIZANDO LARVAS E TELEÓGINAS DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	35
2.3.1 Teste do pacote de larvas (TPL)	35
2.3.2 Teste do pacote de larvas (TPL) modificado Miller; Davey; George (2002)	36
2.3.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA)	37
2.3.4 Teste de Imersão de larvas (TIL)	38
2.3.4.1 Shaw (1966)	38
2.3.5 Teste de Imersão de larvas em Seringas (TILS)	38
2.3.5.1 Souza et al. (2008).....	38
2.3.5.2 Silva et al. (2011)	39
2.3.5.3 Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012).....	39
3 FITOTERAPIA	41
4 BIOMA PAMPA	47
5 FAMÍLIA ASTERACEAE	48
5.1 PLANTAS CONSIDERADAS INDESEJÁVEIS OU INVASORAS PERTENCENTES À FAMÍLIA ASTERACEAE.....	48
5.1.1 <i>Baccharis trimera</i> (carqueja)	49
5.1.2 <i>Vernonia nudiflora</i> (alecrim-do-campo)	51
5.1.3 <i>Eupatorium buniifolium</i> (chirca)	52
5.2 ESTUDOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE EM <i>R. (B.) microplus</i>	53

6 EXPERIMENTO 1: Comparação entre três técnicas de imersão de larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Acari: Ixodidae) em seringas	56
Comparison of three immersion of larvae of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Acari: Ixodidae) in syringes techniques.....	57
7 EXPERIMENTO 2: Efeito acaricida <i>in vitro</i> de extratos de <i>Vernonia nudiflora</i> , <i>Baccharis trimera</i> e <i>Eupatorium buniifolium</i> (Asterales: Asteraceae) em larvas e teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Acari: Ixodidae)	72
<i>In vitro</i> acaricidal effect of <i>Vernonia nudiflora</i> , <i>Baccharis trimera</i> and <i>Eupatorium buniifolium</i> (Asterales: Asteraceae) extracts on larvae and engorged females of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Acari: Ixodidae)	73
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICES	103
ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro foi recentemente estimado em 193.393.388 milhões de cabeças, sendo o segundo maior rebanho do mundo e o primeiro maior exportador e produtor de carne bovina (ANUALPEC, 2013 apud TONIN; DEL CARLO, 2014).

Apesar dos avanços no setor, os parasitos continuam causando muitos entraves à pecuária brasileira. Os prejuízos diretos em decorrência do parasitismo pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* são devido à perda de peso, baixa produção de leite, falhas reprodutivas, lesões na pele favorecendo a ocorrência de miíases e diminuindo a qualidade do couro, transmissão de patógenos (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e por *Anaplasma marginale*) e prejuízos indiretos como os gastos com medicamentos e mão de obra.

O controle deste ectoparasito tem sido focado na sua fase parasitária, predominando o controle químico, com a utilização de banhos carrapaticidas de aspersão e de imersão, antiparasitários de amplo espectro injetáveis e os acaricidas aplicados via *pour on*. O uso inadequado e indiscriminado dos diferentes princípios ativos exerce uma pressão de seleção sobre populações de carrapatos (ALVES-BRANCO et al., 2008). Os principais problemas relacionados com essa prática estão ligados ao desenvolvimento de linhagens resistentes de carrapatos (GULIAS-GOMES, 2009), presença de resíduos químicos nos produtos de origem animal e a poluição ambiental proveniente do uso dos acaricidas nesse controle (BULLMAN et al., 1996).

A necessidade de novos princípios ativos para o controle de *R. (B.) microplus* é uma realidade, a identificação de novas moléculas com atividade acaricida poderão ser encontradas a partir de estudos com extratos vegetais. Pois, a partir da década de 90, com o aumento desses obstáculos à

produção pecuária, pesquisas buscando medidas alternativas de controle acaricida a partir de fitoterápicos se destacaram (BUZATTI et al., 2011).

O objetivo principal deste trabalho foi comparar três técnicas de Imersão de Larvas em Seringas e avaliar o efeito acaricida das espécies *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium buniifolium* em larvas e adultos de *R. (B.) microplus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PREJUÍZOS ECONÔMICOS CAUSADOS PELO PARASITISMO POR *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os danos causados por ecto e endoparasitos foram contabilizados em \$13,96 bilhões/ano. Somente os custos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram de \$3, 24 bilhões/ano (GRISI et al., 2014).

Segundo Gonzalez (2003), *R. (B.) microplus* é uma das principais causas de perdas produtivas na bovinocultura brasileira. Os prejuízos decorrentes das lesões no couro podem ser desprezíveis, quando a população estiver a níveis normais, ocorrendo desta maneira uma distribuição do carrapato nas regiões marginais do corpo dos bovinos, ou seja, cabeça, orelhas, barbeta, peito, pernas, virilha, escroto (ou úbere), ventre, períneo e cauda. Porém, quando este ácaro se encontra em superpopulação ele se distribui também em outras partes do corpo prejudicando a qualidade do couro para uso industrial, na fabricação de calçados e afins.

Os prejuízos causados aos rebanhos bovinos, tanto de leite quanto de corte, pela Tristeza Parasitária Bovina (TPB), transmitida pelo carrapato, também representam um entrave econômico na pecuária, por acarretar altos índices de mortalidade e de morbidade (SACCO, 2002). Somado a estas perdas, registra-se os altos custos com antiparasitários e mão de obra, além do risco de perdas de mercado externo por barreiras sanitárias.

2.2 CONTROLE QUÍMICO

No início do século XIX no Rio Grande do Sul (RS), iniciaram-se nas fazendas, os primeiros métodos de controle de carrapatos dos bovinos. Em 1922 surgiu o primeiro carrapaticida comercializado no Brasil, o arsênico, para ser utilizado em banheiros de imersão. Foram introduzidos no RS em 1949 os organoclorados passando a utilizar o Diclorodifenil-tricloroetano (DDT) e o Benzenohexaclorado (BHC), mas sendo o toxafeno o mais usado dentre os clorados, como inseticida e carrapaticida. Em 1952 os organofosforados já estavam sendo testados, estes foram muito utilizados, quase exclusivamente usados por vinte anos. Após este período, surgiu o grupo das imidinas (formamidinas, tiuréia e ditioetanos), isso em 1970. Mas na década de 1980 iniciou a utilização dos piretróides (GONZALES, 2003).

Segundo Shoop et al. (1995), o grupo das avermectinas foi desenvolvido por japoneses em 1975, a partir de cultivos de *Streptomyces avermectilis*. Em 1981, a ivermectina passou a ser comercializada. Sendo utilizado tanto em animais de produção quanto em animais de pequeno porte (GEARY, 2005), mudando, desta forma, o manejo das propriedades devido à atividade endectocida de amplo espectro de ação e aplicação por via injetável.

Na década de 1990, outros princípios ativos foram lançados. Um deles pertencente ao grupo das fenilpirazolonas, o fipronil e uma benzoilfenilurea, o fluazuron formulados para aplicação *pour on* (MARTINS, 2006).

De acordo com Gulias-Gomes (2009) há quase cem anos os acaricidas químicos para o controle do *R. (B.) microplus* são utilizados nos rebanhos de bovinos. Durante este período vários produtos foram desenvolvidos, muitos também deixaram de ser utilizados e comercializados por não surtirem mais efeito sobre o carrapato bovino.

2.3 TÉCNICAS *IN VITRO* PARA DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA AOS ACARICIDAS UTILIZANDO LARVAS E TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

As técnicas mais utilizadas para testes com acaricidas sintéticos ou com extratos de plantas são: Teste do Pacote de Larvas (TPL) (STONE; HAYDOCK, 1962) e o Teste de Imersão de Adultos (DRUMMOND et al., 1973), sendo estas as únicas técnicas recomendadas e modificadas pela Food and Agriculture Organization (FAO, 2004).

A partir do Teste de Imersão de Larvas (TIL) desenvolvido por Shaw (1966) uma nova proposta para Testes de Imersão de Larvas utilizando seringas (TILS) foi desenvolvida por Souza et al. (2008). Posteriormente, modificações da técnica proposta por Souza et al. (2008) foram realizadas por Silva et al. (2011) e por Sindhu, Jonsson e Iqbal (2012), que inspirados na TILS desenvolveram modificações. Silva et al. (2011) alteraram o tempo de imersão de 30 segundos para cinco minutos e o número de 200 larvas para 100, mas Sindhu, Jonsson e Iqbal (2012) realizaram outras modificações que consistiram na utilização de 2 mL de solução acaricida, tempo de imersão de 30 segundos, em seringas sem orifício de abertura lateral, ao invés da imersão e do preenchimento da seringa no acaricida através do orifício de abertura. A seguir uma breve descrição destas técnicas.

2.3.1 Teste do pacote de larvas (TPL)

Desenvolvido por Stone; Haydock (1962), esta técnica é a única recomendada pela FAO, desde 1975, para detecção de resistência aos acaricidas utilizando larvas. São utilizadas aproximadamente 100 larvas com 14 a 21 dias de idade. Estas são colocadas entre os papéis de filtro (Whatman n°1) recém

impregnados com soluções acaricidas, que formarão um “sanduíche”, o qual é colocado em um envelope (papel filtro) e vedado posteriormente. Os envelopes permanecem em estufa tipo demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) 27 °C e 80% de umidade relativa (UR) e as leituras são realizadas após 24 horas, contando-se as larvas vivas e as mortas.

Esta técnica baseia-se em protocolos utilizados pela Comunidade Científica e Organização Pesquisa Industrial (CSIRO) e do Departamento de Indústrias Primárias Queensland (DPI), na Austrália. O kit disponibilizado pela FAO contém os materiais e procedimentos padronizados que permitem comparar os dados obtidos de diferentes partes do mundo, para serem discutidos. Porém, um treinamento adequado é essencial para atingir um elevado grau de confiança na técnica (FAO, 2004).

2.3.2 Teste do pacote de larvas (TPL) modificado Miller; Davey; George (2002)

Miller; Davey; George (2002) modificaram o TPL desenvolvido por Stone; Haydock (1962) para o diagnóstico de cepas resistentes ao amitraz, porque esta técnica não possui uma relação linear (probit log) entre a mortalidade e a concentração do acaricida.

A técnica padrão foi modificada de duas maneiras. Utiliza-se tecido de nylon (tipo 2320, Cerex Advanced Fabrics, Pensacola, FL) em vez de papel de filtro Whatman como solução. O amitraz (Tactic® 12,5% CE) é diluído em tricloroetileno e azeite de oliva em vez de utilizar o amitraz técnico. Todas as outras condições são idênticas às da técnica padrão. Estas modificações produzem dados que são adequados para a determinação das razões de resistência e de doses discriminantes.

2.3.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA)

Este teste é utilizado para a detecção e diagnóstico de cepas resistentes aos acarídeos ou para testes de triagem com extratos de plantas. Consiste na utilização de fêmeas adultas ingurgitadas (teleóginas) imersas nas soluções a serem testadas, estas são avaliadas quanto à mortalidade e fertilidade. É um teste de fácil execução, o ideal é realizar o teste no mesmo dia em que as teleóginas são coletadas.

O protocolo para a execução do teste mais utilizado é o de Drummond et al. (1973), são pesados grupos de dez fêmeas ingurgitadas imersas nas soluções por 30 segundos (muitos laboratórios utilizam o tempo de cinco minutos), retiradas, colocadas sobre papel toalha para secar, armazenadas em placas de Petri e mantidas em B.O.D. 27 °C e 80% UR por quinze dias, posteriormente a massa de ovos produzida por cada grupo é avaliada e pesada repassando-os para um recipiente fechado (tubos de vidro) voltando para a B.O.D por aproximadamente seis semanas para que ocorra a eclosão total das larvas, estas serão avaliadas visualmente através da porcentagem de eclosão.

Para a avaliação do índice de eficácia de cada produto que foi testado através das fórmulas (DRUMMOND et al., 1973):

- Eficiência Reprodutiva (ER):

$$ER = \frac{\text{Peso massa de ovos (g)} \times \% \text{ eclosão} \times 20000}{\text{Peso das teleóginas}}$$

20000 é uma constante, significa que em 1g ovos há 20000 larvas.

- Eficácia do Produto (EP) porcentagem:

$$\% ER = \frac{ER (\text{controle}) - ER (\text{tratado}) \times 100}{ER (\text{controle})}$$

A FAO (2004) está em busca de um TIA de resposta rápida. O protocolo será semelhante ao teste descrito por Drummond et al. (1973), mas incluindo uma série de modificações, como o uso de uma dose discriminante (DD) para cada princípio ativo disponível no mercado para diferenciar carrapatos resistentes dos suscetíveis e será avaliada apenas a postura (massa ovos) das teleóginas ao invés da eclosão das larvas, para que a resposta do TIA seja mais rápida.

2.3.4 Teste de Imersão de larvas (TIL)

2.3.4.1 Shaw (1966)

Consiste na imersão de aproximadamente 100 larvas em soluções acaricidas em micro tubos de plástico (tipo eppendorf), com auxílio de pincel, durante 10 minutos. Em seguida, retira-se a umidade excessiva das larvas e do pincel em papel toalha e as mesmas são envelopadas em papel filtro. Posteriormente são levadas para à B.O.D 27 °C e 80% UR por 24 horas contando-se as larvas vivas e as mortas.

2.3.5 Teste de Imersão de larvas em Seringas (TILS)

2.3.5.1 Souza et al. (2008)

Souza et al. (2008) desenvolveram uma nova proposta para verificar a resistência de larvas de *R. (B.) microplus* à cipermetrina e ao amitraz, através de um teste de imersão de larvas utilizando seringas. Neste método, acondiciona-se 10 mg de ovos por seringa plástica, descartável de 5 mL, previamente preparada, pelo corte da extremidade próxima do canhão e com um orifício de aproximadamente 1mm de diâmetro, na metade desta. O êmbolo é posicionado de forma a fechar o orifício, sendo que a extremidade cortada é fechada com tecido de malha fina, fixado com elástico ortodôntico, para impedir a

fuga das larvas. As seringas permanecem em câmara climatizada até a eclosão das larvas.

São utilizadas larvas com idade entre 7 e 10 dias, 10 repetições para cada acaricida e um grupo controle para cada repetição. Cada grupo de larvas é imerso nas respectivas diluições e o grupo controle em água destilada, durante 30 segundos, posicionando o êmbolo posteriormente ao orifício para permitir a saída de ar e conseqüentemente o preenchimento total da seringa com a solução. Após a imersão, a extremidade fechada com o tecido é colocada em contato com papel absorvente para eliminar o líquido excedente. O embolo é novamente posicionado de forma a fechar o orifício e cada seringa é colocada em suporte, com a extremidade cortada e vedada, para cima, e novamente colocada na câmara climatizada por 24 horas. Posteriormente, pressiona-se o êmbolo da seringa até a margem cortada para retirada das larvas com o auxílio de um pincel fino, sobre uma folha de papel branco. Contabilizam-se as larvas vivas e mortas.

2.3.5.2 Silva et al. (2011)

Silva et al. (2011) utilizaram a TILS para os testes de eficácia em larva de *R. (B.) microplus*, utilizando extratos de plantas oriundas da Amazônia, porém aumentaram o tempo de imersão de 30 segundos para cinco minutos e utilizaram 100 larvas ao invés de 200, com idade entre 14 a 21 dias em seringas de 5 mL, anteriormente preparadas. Os demais procedimentos são iguais aos descritos por Souza et al. (2008).

2.3.5.3 Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012)

Na Austrália, Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) desenvolveram um teste de seringas baseados no TILS

(SOUZA et al., 2008), para avaliação de extratos de plantas, porém com algumas modificações.

Neste método, acondiciona-se aproximadamente 10 mg de ovos por seringa plástica, descartável de 3 mL, previamente preparada, pelo corte da extremidade próxima do canhão, esta é fechada com uma dupla camada de gaze (nylon) fixado com elástico. As seringas permanecem em câmara climatizada a 27 °C e a 90% UR até a eclosão das larvas. 14 dias após a eclosão dos ovos realizam-se os testes. Dois mililitros de cada solução teste são colocados na seringa contendo as larvas e invertiam-se as seringas durante 30 segundos para que a solução entre em contato com as larvas. Posteriormente a solução é descartada e o êmbolo empurrado até a gaze para expelir o líquido. A seringa é colocada em contato com papel toalha para remover completamente a solução e o êmbolo puxado para trás até a marca de 2 mL. Todas as seringas tratadas são deixadas em uma grade durante uma hora, com a abertura de corte voltado para cima em capela para auxiliar na secagem das seringas. Posteriormente, são acondicionadas a 27 °C e a 90% UR durante 24 horas e por seis dias. Posteriormente a estes períodos são realizadas as leituras.

As principais modificações entre os TILS descritas por Souza et al. (2008); Silva et al. (2011); Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) encontram-se no (Quadro 1):

Quadro 1- Principais diferenças entre três Técnicas de Imersão de Larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando seringas.

Metodologia	Souza et al. (2008)	Silva et al. (2011)	Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012)
Quantidade de larvas/seringa	200 larvas (10 mg)	100 larvas (5 mg)	200 larvas (10 mg)
Tamanho da seringa	5 mL	5 mL	3 mL
Orifício/local na seringa	1 mm Metade da seringa	1 mm Metade da seringa	Sem orifício
Idade das Larvas	7 - 10 dias	14 – 21 dias	14 dias
Número de Repetições	10	2	Sem repetições
Tempo de imersão	30 segundos	5 minutos	30 segundos
Tipo de Imersão	Em solução acaricida	Em solução de extrato	Adição de 2mL do extrato por seringa + homogeneização
Secagem	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha +1hora em capela (após o teste)
Leitura (após o teste)	24 horas	24 horas	24 horas e 6 dias
Soluções teste	Acaricida comercial	Extratos de plantas	Extratos de plantas

Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)

3 FITOTERAPIA

A palavra fitoterapia vem do grego e significa: vegetal (*phyton*) + tratamento (*therapeia*), ou também “a terapêutica das doenças através das plantas”.

De acordo com Hassum (2007), a utilização de produtos fitoterápicos é uma prática muito antiga, entretanto, pouco explorada pela Medicina Humana e Veterinária.

Chagas et al. (2002) testaram óleos essenciais das espécies de eucaliptos, *Eucalyptus citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* e os concentrados emulsionáveis de *E. globulus* e *E. staigeriana*, em larvas e teleóginas de *R. (B.) microplus*. Verificaram que o citronelal é o principal componente do óleo de *E. citriodora*, sendo responsável por sua ação acaricida. O mesmo ocorreu com o 1,8-cineol em *E. globulus*. O óleo essencial e os concentrados emulsionáveis de *E. globulus* e de *E. staigeriana* causaram 100% de mortalidade em larvas e teleóginas principalmente nas concentrações de 30 e 20% . O óleo de *E. citriodora* também apresentou o mesmo efeito.

Silva (2008) avaliou a eficácia dos extratos de *Palicourea marcgravii* e *Derris negrensis* e de extratos e óleo essencial de *Piper aduncun* em larvas e teleóginas de *R. (B.) microplus*. Preparou extratos, das folhas de *P. marcgravii* e *P. aduncun*, e de caules de *D. negrensis* em solventes hexano, acetato de etila e etanol. Entre as três espécies de plantas avaliadas, o extrato de *P. marcgravii* tendo como solvente o acetato de etila ocasionou 24 e 78% de mortalidade em teleóginas e inibiram 100% da oviposição. O extrato de *P. marcgravii* (acetato de etila) causaram mortalidade entre 30,32 a 95,11% em larvas. O óleo essencial de *P. aduncun* também foi avaliado em larvas, causando 100% de mortalidade das mesmas nas três concentrações testadas 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL.

Em Goiânia, Sousa et al. (2008) coletaram frutos verde e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*), para avaliar a

eficácia destes em teleóginas e larvas de *R. (B.) microplus*. Foram obtidos quatro tipos de extratos com solventes hexânicos: um extrato de frutos verdes (EFV) e três com frutos maduros, sendo um com os frutos imediatamente processados (EFM), outro com frutos armazenados por cinco meses (EFMA) e um testado após armazenamento do extrato por dois anos a 4 °C (EFMAG). Os EFV apresentaram eficácia entre 3,6% a 100%, já o extrato de frutos maduros variou de 5,2% a 99,7% em teleóginas. Ambos causaram mortalidade de 100% das larvas nas maiores concentrações. Os EFMA apresentaram eficácia de 14% a 83% sobre teleóginas, enquanto o EFMAG a eficácia foi de 8,4% a 100% mas ambos não apresentaram efeito larvicida.

Em Pernambuco, Silva et al. (2008) compararam a eficácia *in vitro* de extratos de quatro plantas, o *Cymbopogon citratus* (capim santo), *Ipomoea asarifolia* (salsa), *Lippia alba* (erva cidreira) e o *Azadirachta indica* (óleo de nim a 1%) e de produtos químicos com efeito acaricida, através da técnica do biocarrapaticidograma. Os resultados apresentaram eficácia inferior a 95% para os produtos químicos testados. Já os extratos ocorreu indícios de atividade biológica na mortalidade de teleóginas e inibição de eclosão, porém, as soluções aquosas e alcoólica a 50% de óleo de nim 1% apresentaram eficácia superior a 95% e quando foi utilizado a formulação comercial pura foi obtido 100% de eficácia do produto.

No Maranhão, Costa et al. (2008) verificaram a eficácia *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de nim e citronela a 20% e eucalipto a 10%, em teleóginas de *R. (B.) microplus*. Observaram que, no tratamento com o extrato do nim e da citronela, ocorreram 32% e 17% de eficácia, enquanto com o eucalipto ocorreu 96%.

Em Alagoas, Broglio-Micheletti et al. (2009) utilizaram extratos alcoólicos 2% de sementes de *Annona muricata* (graviola), flores de *Syzygium malaccensis* (jambo), folhas de

Cymbopogon citratus (capim-santo), folhas de *Azadirachta indica* (nim), e extrato hexânico de *A. indica* (sementes). O extrato de *A. muricata* apresentou eficácia de 100%, seguido dos extratos de *S. malaccensis* (75 e 59,24%) e *A. indica* (65 e 38,49%). Ocorreram 100% de redução na eclosão das larvas quando se utilizou o extrato de sementes de *A. muricata*. O extrato da semente de graviola apresentou melhor desempenho *in vitro* para o controle de *R. (B.) microplus*, reduziu a oviposição, bem como a eclodibilidade larval.

No México, Rosado-Aguilar et al. (2010) avaliaram a atividade acaricida de extrato metanólico de *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) através do LIT e do TIA de *R. (B.) microplus*. Obtiveram 100% de mortalidade no LIT, mas no TIA os resultados foram de 26% e 86% de mortalidade, a inibição da postura foi de 40 % e 91% e a inibição de eclosão de 26 % e 17 %.

No Rio Grande do Sul, Buzatti et al. (2011) verificaram a atividade acaricida *in vitro* de extratos vegetais de *Glechon spathulata* (manjeroninha do campo) sobre teleóginas de *R. (B.) microplus*. O extrato bruto seco de *G. spathulata* 2% em etanol a 70% apresentou uma eficácia de 99%, quando o mesmo extrato foi diluído em água, a eficácia de 72%. No mesmo estado, Santos; Vogel; Monteiro (2012) avaliaram o efeito *in vitro* do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjericão) em teleóginas de *R. (B.) microplus*. Observaram inibição de postura de 10 a 100%, eclosão larval de 0 a 75 e a eficiência do óleo foi de 28 a 100%.

No Amazonas, Machado et al. (2013) avaliaram os extratos acetato de etila, etanólico e aquoso de raízes de *Lonchocarpus floribundus* em teleóginas e larvas de *R. (B.) microplus*. Os extratos avaliados não foram eficazes para induzir, a mortalidade de teleóginas acima de 50%. Já nos testes com larvas, os extratos acetato de etila e etanólico induziram 100% de mortalidade na concentração de 5 mg/mL.

Na Índia, Ghosh et al. (2013) verificaram a utilização de extrato etanólico a 95% de *Ricinus communis* em teleóginas de bovinos indianos resistentes ao diazinon, deltametrina e associações. O extrato causou mortalidade de 48, 56,7 e 60,0% nas concentrações de 3, 6 e 8%. No experimento *in vivo* utilizando bovinos cruzados (*Bos indicus* x *Bos taurus*) resultaram em 59,9% de eficácia no primeiro desafio, mas no segundo desafio a eficácia foi reduzida para 48,5%. Os resultados indicaram eficácia da planta em testes *in vitro*, já nos experimentos *in vivo* a eficácia não passou de 60%.

De acordo com Borges, Sousa e Barbosa (2011) existem estudos com 26 famílias de plantas, onde 57 espécies destas foram testadas sobre teleóginas e larvas de *R. (B.) microplus*. Segundo as autoras há 58 princípios ativos com atividade acaricida ou inseticida destes extratos, como a *Azadirachta indica* (nim), várias espécies de *Citrus* spp., *Piper* spp., *Eucalyptus* spp., *Cymbopogon* spp., *A. indica*, *Melia azedarach*, *Withania somnifera*, *Tamarindus indicus*, *Annona squamosa* dentre muitas outras plantas. Muitos destes extratos já foram testados *in vitro*, já quanto aos testes *in vivo* ainda são poucos trabalhos realizados. A observação destas autoras é que os extratos vegetais podem ser uma alternativa de controle do *R. (B.) microplus*, devido à vasta quantidade de plantas que apresentam atividade acaricida, por isso muitos trabalhos foram realizados nesta última década. Outro ponto importante que estas destacaram é que muitos estudos *in vitro* utilizando extratos vegetais têm apresentado resultados satisfatórios, mas a maioria destes extratos não tem sido avaliado a campo, ou seja, diretamente sobre os bovinos, para então reafirmar estes resultados. As dificuldades também são encontradas no momento da obtenção dos extratos, várias diferenças são detectadas no princípio ativo das plantas (mesmo que sejam da mesma espécie) são entraves que precisam ser solucionados visando o desenvolvimento deste

campo de pesquisa. Portanto, as dificuldades encontradas em realizar experimentos *in vivo*, obtendo a mesma eficácia dos experimentos *in vitro*, certamente é um dos grandes desafios dos estudos com extratos vegetais.

Segundo George et al. (2014) o potencial de produtos derivados de plantas para o controle de artrópodos de importância médica e veterinária. Quatro tipos principais de produtos derivados de plantas são considerados (piretro, nim, óleos essenciais e extratos de plantas) por suas propriedades pesticidas, reguladores de crescimento e repelentes. Segundo os autores a busca contínua de ingredientes ativos sintéticos como óleos essenciais e seus componentes químicos variados, poderão ser uma esperança para o controle de pragas. Pesquisas baseadas em diagnóstico molecular deverão ser realizadas para garantir a eficácia destes produtos.

4 BIOMA PAMPA

No Brasil o Bioma Pampa está localizado no estado do Rio Grande do Sul ocupando uma área de 176.496 km² que corresponde a 63% do território estadual e a 2,07% do território brasileiro. As paisagens naturais do Pampa são variadas sendo estas formadas por serras, planícies, morros rupestres e coxilhas. Este exibe um imenso patrimônio devido à sua biodiversidade, onde são encontradas muitas espécies de aves, mamíferos, plantas dentre muitos outros seres vivos. As paisagens naturais do Pampa se caracterizam pelo predomínio dos campos nativos, mas há também a presença de diversos tipos de matas e formações arbustivas, butiazais, banhados, afloramentos rochosos. Na região da Campanha a pecuária de corte é uma tradição muito antiga. As pastagens são utilizadas para grandes criações de bovinos, ovinos e equinos de uma maneira extensiva. Neste Bioma encontram-se muitas plantas consideradas invasoras e de difícil controle, algumas destas são tóxicas para os animais (IBAMA 2004).

De acordo com Hassum (2007), os campos da metade Sul e Oeste (região da Campanha ou dos Pampas) no estado do Rio Grande do Sul, atingindo até o Uruguai, e parte da Argentina são denominados de Bioma Pampa, este termo tem origem indígena, que caracteriza uma região plana, formada por extensas planícies, poucas coxilhas, apresentando então campos limpos. Este Bioma apresenta características únicas, onde mais de três mil plantas já foram identificadas, sendo encontradas aproximadamente 450 espécies de gramíneas e 150 de leguminosas e muitas espécies de cactos. Nesse ambiente habitam várias espécies de aves e de mamíferos, onde muitas destas só ocorrem nesse local, ressaltando então a importância do Bioma Pampa para manter o ciclo de vida destas espécies.

5 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae encontra-se em abundância nos campos do RS (BOLDRINI, 1997). Muitas espécies pertencentes a esta família são consideradas invasoras instalam-se nos campos de forma agressiva isto ocorre porque liberaram substâncias químicas inibidoras e também devido a sua rápida germinação (EGLEY, 1995).

É considerada a maior família das Angiospermas com aproximadamente 1100 gêneros e 25.000 espécies. As plantas pertencentes a esta família são muito pesquisadas, principalmente em relação aos princípios ativos que contêm e também pela atividade biológica exercida. Uma variedade de metabólitos secundários foram isolados de plantas da família Asteraceae, com destaque aos flavonóides, como importantes marcadores quimiotaxonômicos e comprovada ação inseticida de algumas espécies desta família. Como as plantas do gênero *Chrysanthemum* produtoras de piretrinas (ou piretro) extraídas de sementes ou flores de *C. cinerariaefolium* e *C. cinem* (VIEIRA; FERNANDES; ANDREI, 2003).

Em consequência disso novos fármacos poderão ser produzidos, principalmente os de ação inseticida, dentre outros (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

5.1 PLANTAS CONSIDERADAS INDESEJÁVEIS OU INVASORAS PERTENCENTES À FAMÍLIA ASTERACEAE

Overbeck et al. (2009) listaram as principais espécies da família Asteraceae encontradas no Bioma Pampa: *Acmella bellidioides*, *Aspilia montevidensis*, *Aster squamatus*, *Baccharis coridifolia*, *Baccharis dracunculifolia*, *Baccharis trimera*, *Chaptalia runcinata*, *Eupatorium buniifolium*, *Gamochoeta spicata*, *Senecio brasiliensis*, *Senecio cisplatinus*,

Senecio oxyphyllus, *Stenachenium campestre*, *Vernonia flexuosa* e *Vernonia nudiflora*.

Segundo Crancio (2004), as espécies indesejáveis nativas do ponto de vista da produção animal, que ocorrem com maior frequência no Rio Grande do Sul são a *B. trimer*a (carqueja), *V. nudiflora* (alecrim-do-campo), *E. horridum* (caraguatá), *B. coridifolia* (mio-mio), *Senecio* spp. (Mariamole) e *E. buniifolium* (chirca).

Nesta revisão, serão descritas as principais características e propriedades das três espécies escolhidas como tema de estudo do projeto: *B. trimer*a (carqueja), *V. nudiflora* (alecrim do campo) e *E. buniifolium* (chirca).

5.1.1 *Baccharis trimer*a (carqueja)

*Baccharis trimer*a (Figura 1) popularmente conhecida como carqueja, é frequentemente encontrada nos campos nativos da região Sul do Brasil, Uruguai e Norte da Argentina. Ocorre na forma de manchas, mas é mais comum a ocorrência de plantas isoladas. O ciclo de floração estende-se de janeiro a maio (CRANCIO, 2004).

A carqueja cresce na primavera, quando cessam os frios do inverno, e seu crescimento se prolonga até o verão quando começa o período de repouso e frutificação da planta, apresentando novo rebrote no outono. A produção de sementes é abundante, e são suscetíveis à seca. Uma planta produz em torno de 50.000 sementes pequenas, que se dispersam pelo vento e pelos animais (NUÑEZ; DEL PUERTO, 1998).

Figura 1 – *Baccharis trimera* (carqueja)



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)

Na Argentina, Brasil, Chile, Colômbia e México há mais de 500 espécies de plantas do gênero *Baccharis*, estas são encontradas ocupando as regiões de maior altitude. No Brasil, estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, a maior parte delas encontradas na região sudeste, 100 espécies na Argentina, 28 no México e 40 na Colômbia (DUPONT, 1966 apud VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Cerca de 120 espécies do gênero *Baccharis* foram estudadas quimicamente e entre estas, 30 apresentam atividade biológica, como efeitos alelopáticos, antimicrobianos e antiinflamatórios. Os compostos que mais se destacaram foram os flavonóides, clerodanos e lábdanos. Também foi observado a presença de kauranos, triterpenos, germacreno, ácidos cumáricos, tricotecenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. As

espécies mais pesquisadas quanto à composição química e também quanto à atividade biológica, são *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Nomes populares: carqueja, bacárida, cacaia-amarga, cacália-amarga, cacália-amargosa, caclia-doce, cuchí-cuchi, carque, carqueja-amarga, carqueja-amargosa, carqueja-domato, carquejinha, condamina, iguape, quina-de-condomiana, quinsu-cucho, tiririca-de-babado, tiririca-de-balaio, três-espigas, vassoura.

5.1.2 *Vernonia nudiflora* (alecrim-do-campo)

Segundo Crancio (2004) *V. nudiflora* (Figura 2) está presente na região Sul do Brasil, sendo frequentemente encontrada em todo o Rio Grande do Sul.

O alecrim-do-campo, como é popularmente conhecido no meio rural, é um subarbusto, perene e ereto que atinge de 60 a 80cm de altura e coloração esverdeada. É resistente aos períodos de seca. Suas flores possuem cor rósea à violácea. A sua floração ocorre em junho.

Está presente geralmente em solos secos e pedregosos, em campos ou beira de matas, é uma planta nativa do Uruguai, Argentina e do Sul do Brasil (TAKEDA et al., 2001).

Esta planta também apresenta ação irritante à mucosa do tubo digestivo, mas, por ser de baixa palatabilidade são raros os casos em que os bovinos cheguem a consumi-la. (TOKARNIA et al., 2000).

Figura 2 – *Vernonia nudiflora* (alecrim-do-campo)



Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

Nome popular: alecrim-do-campo.

5.1.3 *Eupatorium buniifolium* (chirca)

E. buniifolium (Figura 3) é encontrada com maior frequência na região Sudoeste do Rio Grande do Sul, no Uruguai, Argentina (nas regiões centrais e Norte), Paraguai e Bolívia (Sul) (CRANCIO, 2004).

Figura 3 – *Eupatorium buniifolium* (chirca)



Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

Esta planta é um arbusto estival, perene atingindo até 2,5 m da altura. A floração e a sementação ocorrem no final de duas estações distintas, sendo no verão e outono. Suas flores apresentam coloração castanha a marrom escuro e a produção é abundante.

A primavera é a estação onde ocorre maior desenvolvimento.

Nomes populares: Chirca, chilca, romerilo, romero, romero colorado.

5.2 ESTUDOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE EM *R. (B.) microplus*

Chagas e Oliveira (2012) avaliaram a ação dos extratos de *Artemisia annua in vitro* em teleóginas e larvas *R. (B.) microplus*, *in vivo* em bovinos através da ingestão da planta e identificaram e quantificaram seus compostos. Os resultados

das análises químicas dos extratos vegetais permitiram a quantificação da artemisinina, à qual se tem atribuído ação antiparasitária e da deoxiartemisinina presente nos extratos de *A. annua*. Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados, gerando o extrato bruto. Deste foram produzidos outros quatro extratos, utilizando-se diferentes solventes: água, água basificada com bicarbonato de sódio a 0,1%, etanol 96° e diclorometano. Os métodos utilizados *in vitro* não apresentaram eficácia acaricida nas concentrações de 20 a 280 mg/mL. Nos testes *in vivo* os animais receberam durante 30 dias 200 g de folhas moídas e secas de *A. annua*, o consumo de *A. annua* na dose avaliada também não demonstrou atividade acaricida em *R. (B.) microplus* em bovinos naturalmente infestados.

Ribeiro et al. (2011) avaliaram a atividade acaricida do óleo essencial e do prococeno II de *Calea serrata* em larvas de carrapato bovino. Esta espécie é encontrada na região Sul do Brasil, conhecida popularmente como “erva de cobra”, “quebra tudo” ou “chá amargo”. O óleo essencial causou 100% de mortalidade nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL e o prococeno II nas concentrações de 10 mg/mL também apresentou 100% de eficácia no TIL de *R. (B.) microplus*.

Fiori et al. (2011) verificaram a eficácia de *Tagetes minuta* em larvas de *R. (B.) microplus* através da infusão aquosa, da tintura concentrada, da tintura simples e do óleo essencial em diferentes concentrações. Os resultados obtidos com este estudo demonstraram que o óleo essencial e a tintura concentrada causaram maior mortalidade de larvas que a infusão aquosa e a tintura simples. Embora tenham demonstrado efeito acaricida sobre as larvas de *R. (B.) microplus*, os autores relataram que serão necessários mais estudos para comprovação de seu uso *in vivo*.

Garcia et al. (2012) observaram o efeito acaricida do óleo de *T. minuta* em *R. (B.) microplus*, *R. sanguineus*,

Amblyomma cajennense e *Argas miniatus* através do TPL e do TIA. Na concentração de 20% o óleo de *T. minuta* apresentou eficácia acima de 95% tanto, no TIA quanto no TPL nas quatro espécies de carrapatos testadas.

Lázaro et al. (2013) avaliaram os extratos aquosos de folhas frescas de *B. trimera* através do TIA em *R. (B.) microplus*. As concentrações de 150 e 200 mg/mL inibiram 100% da eclosão dos ovos.

6 EXPERIMENTO 1: COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS TÉCNICAS DE IMERSÃO DE LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) EM SERINGAS

RESUMO

O teste de imersão de larvas utilizando seringas (TILS) tem sido utilizado no monitoramento e diagnóstico de resistência aos acaricidas sintéticos e também para pesquisas com extratos vegetais. A realização do presente estudo teve por objetivo comparar duas modificações da técnica TILS com a original T1. Sendo a primeira modificação a utilização de 100 larvas ao invés de 200 e o aumento do tempo de imersão de 30 segundos para cinco minutos T2, a segunda modificação consistiu na aplicação de 2 mL de solução acaricida na seringa contendo as larvas, tempo de imersão de 30 segundos em seringas sem orifício de abertura, ao invés da imersão da seringa no acaricida e do orifício de abertura T3. Larvas, com idade entre 10 a 15 dias, foram transferidas para as seringas testes com auxílio de um sistema de sucção. Para a comparação das três técnicas, utilizou-se acaricida comercial à base de cipermetrina 15% e clorpirifós 25% e butóxido de piperonilda 1% (Texvet[®]), preparado em nove diluições seriadas (100; 25; 6,25; 1,56; 0,39; 0,19; 0,09; 0,02 e 0,006%), sendo a solução 100% preparada na diluição recomendada pelo fabricante (1 mL:1 L, correspondente à 150 ppm de cipermetrina e 250 ppm de clorpirifós). Foram conduzidas seis repetições por tratamento. Foi mantido um grupo controle para cada técnica, nos quais as larvas foram imersas em água destilada e deionizada. Após a imersão das larvas, as seringas permaneceram por uma hora em capela de exaustão, posteriormente foram acondicionadas em sala climatizada a 27 °C e 80% UR por 24 horas. Posteriormente foi contabilizado o

número de larvas mortas e vivas. A CL_{50} nos três métodos foi $T1= 0,1864\%$, $T2= 0,1249\%$ e $T3= 0,1526\%$. Não houve diferença estatística entre as técnicas. Apesar de não ter havido diferença estatística entre as técnicas, as modificações propostas pelo T3 apresentou maior praticidade e segurança para execução.

Palavras-chave: Carrapato. Bovino. Teste carrapaticidas *in vitro*. Seringas.

COMPARISON OF THREE IMMERSION OF LARVAE OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) IN SYRINGES TECHNIQUES.

ABSTRACT

The larvae immersion test using syringes (LITS) has been used in the monitoring and diagnosis of resistance to synthetic acaricides and also for research on plant extracts. This study aimed to compare two modifications of the technique LITS with the original T1. As it is the first modification using 100 larvae instead of 200 and increasing the immersion time of 30 seconds for five-minute immersion described T2, the second modification consisted of the application of 2 mL acaricide solution in the syringe containing the larvae, thirty-second immersion time in syringes without opening hole, developed by T3. Larvae, aged 10 to 15 days, were transferred to testing syringes with the aid of a suction system. For comparison of the three techniques was used commercial acaricide based on cypermethrin (15%) and chlorpyrifos (25%) and piperonilida butoxide (1%) (Texvet[®]), prepared in nine serial dilutions (100, 25, 6.25, 1.56, 0.39, 0.19, 0.09, 0.02 and 0.006%) with the solution 100% prepared in dilution recommended by the manufacturer (1 mL: 1 L, corresponding to 150 ppm

cypermethrin and chlorpyrifos 250 ppm). Six replicates per treatment were conducted. There were a control group for each technique, which the larvae were immersed in distilled and deionized water. After larvae immersion, syringes remained for an hour in laminar flow subsequently they were placed in a room at 27 °C and 80% UR for 24 hours. It was later recorded the number of dead and live larvae. The LC₅₀ in the three methods was: T1= 0.1864%, T2= 0.1249% and T3= 0.1526%. There was not a statistical difference between techniques. Although there was no statistical difference between the techniques, the changes proposed by T3 showed greater convenience and security for execution.

Key-words: Tick. Bovine. *In vitro*. Syringes.

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um dos principais ectoparasitos dos bovinos, encontrado geograficamente entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul. Ocasiona prejuízos, principalmente pela espoliação sanguínea, transmissão de agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina e gastos com medicamentos. Continua sendo um dos carrapatos mais estudados quanto a sua biologia, epidemiologia, controle e resistência aos acaricidas.

Há relatos de resistência na região Sul do Brasil do *R. (B.) microplus* a todas as bases acaricidas que passaram ou ainda se encontram disponíveis no mercado, começando pelos arsenicais (Freire, 1953), orgânicos fosforados e organoclorados (Laranja et al., 1974; Souza et al., 1984), passando pelos piretróides (Alves-Branco; Pinheiro, 1989; Laranja et al., 1989; Alves-Branco; Sapper; Pinheiro, 1993), e formamidinas (Martins et al., 1995; Yamamura; Merlini, 1998; Vargas et al., 2003; Veiga, 2007; Santos et al., 2009), até chegarmos às

avermectinas (Martins; Furlong, 2001), ao fipronil (Martins; Doyle; Gonzales, 2006), as associações de piretróides e organofosforados (Farias; Ruas; Santos, 2008) e, mais recentemente, ao fluazuron (RECK et al., 2014).

O monitoramento das populações de carrapatos, em relação aos carrapaticidas por meio de testes *in vitro*, é um procedimento essencial na detecção precoce de problemas de resistência, sendo que o uso de acaricidas químicos ainda são as principais ferramentas de controle do carrapato bovino. Em função disso, muitos pesquisadores preocupam-se em aprimorar as técnicas de diagnóstico de resistência dos carrapatos aos acaricidas químicos (VARGAS et al., 2003).

A Portaria número 48 de 1997, do Departamento de Defesa Animal, dispõe sobre o Regulamento Técnico a ser observado na produção, no controle e no emprego de antiparasitários de uso veterinário. Assim como no Brasil, cada país possui suas próprias diretrizes. Tais diretrizes orientam como devem ser conduzidos ensaios *in vivo* para avaliação de antiparasitários tanto para a o licenciamento quanto para a renovação de licença de produtos já comercializados. No entanto, considerando a inviabilidade de condução destes testes rotineiramente, a comunidade científica tem buscado desenvolver ensaios *in vitro* para monitoramento do processo de resistência. A Organização das nações unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2004) avaliou e padronizou diferentes ensaios para detecção de resistência a acaricidas. O teste *in vitro* indicado pela FAO para avaliação da sensibilidade de larvas de *R. (B.) microplus* é o Teste do Pacote de Larvas TPL desenvolvido originalmente por Stone; Haydock (1962) e modificado por Miller et al. (2002). Procurando por uma técnica com maior facilidade e rapidez de execução, Souza et al. (2008) elaboraram uma nova proposta baseada na técnica de imersão de larvas TIL desenvolvida por Shaw (1966). A nova técnica descrita por Souza et al. (2008)

tem sido usada na avaliação de extratos de plantas no Brasil e exterior e também em testes de comparação entre técnicas. Dois trabalhos foram publicados alterando a técnica original em pequenos detalhes (SILVA et al., 2011; SINDHU; JONSSON; IQBAL, 2012).

A realização do presente trabalho teve por objetivo comparar simultaneamente três TILS descritas por Souza et al. (2008); Silva et al. (2011); Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) para avaliar no que as novas adaptações resultaram em termos de qualidade de resultado e processo de execução.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas as TILS descritas por Souza et al. (2008) denominada de tratamento um (T1), Silva et al. (2011) denominada de tratamento dois (T2) e Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) denominada de tratamento três (T3) simultaneamente.

Para a condução dos ensaios, foram utilizadas larvas provenientes de teleóginas pertencentes a uma cepa livres de hemoparasitos causadores da tristeza parasitária bovina mantida pela Embrapa Pecuária Sul (CPPSUL) desenvolvidas em bovinos estabulados e mantidas em câmara climatizada, tipo B.O.D. regulada a 27 °C e umidade relativa acima de 80%.

Foram utilizadas larvas entre 10 a 15 dias de idade, introduzidas nas seringas 24 horas antes do teste com o auxílio de um sistema de aspiração, onde se conectava a seringa a uma bomba à vácuo. Após 24 horas de acondicionamento nas seringas, as larvas foram submersas em acaricida comercial, à base de cipermetrina (15%), clorpirifós (25%) e butóxido de piperonila (1%) (Texvet[®]), preparado em nove diluições seriadas (100; 25; 6,25; 1,56; 0,39; 0,19; 0,09; 0,02 e 0,006%), sendo a solução 100% preparada na diluição recomendada pelo fabricante (1 mL:1 Litro, correspondente à 150 ppm de cipermetrina e 250 ppm de clorpirifós). Os grupos controles

foram preparados somente com água destilada e deionizada. Cada tratamento, incluindo o grupo controle de cada método, foi constituído por seis repetições. Após a exposição das larvas às soluções, as seringas foram secas em papel toalha, para retirada do excesso de umidade e mantidas por uma hora em capela de exaustão para, então, serem transferidas para sala climatizada a 27 °C e 80% UR. A leitura foi realizada 24 horas após a exposição das larvas com as soluções teste, considerando-se como mortas, larvas sem motilidade e/ou ressecadas. Na técnica T3, não foram realizadas leituras seis dias após o teste. Para que as três técnicas tivessem o mesmo tratamento. Os demais procedimentos foram seguidos conforme as metodologias originais descritas nos artigos, conforme resumo do (Quadro 1).

Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pela comparação de médias através de blocos casualizados.

Os parâmetros avaliados foram percentuais de mortalidade e cálculo da concentração letal (CL₅₀) para cada método. O percentual de mortalidade dos grupos tratados mostrado no gráfico e no cálculo da CL₅₀ foi corrigido em relação à mortalidade do grupo controle, de acordo com a fórmula desenvolvida por (ABOTT, 1925). A CL₅₀ foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.00 (2007). As análises no GraphPad Prism foram conduzidas após transformação das concentrações do acaricida em logaritmo ($x = \log x$) e a inclinação da curva dose-resposta definida como variável. Os valores máximo e mínimo de mortalidade foram definidos como cem (100) e zero (0), respectivamente.

Fórmula descrita por Abbott (1925):

$$\% \text{ Mortalidad e (corrigido)} = \frac{\% \text{ Mortalidad e Grupo teste} - \% \text{ Mortalidad e Grupo controle}}{(100 - \% \text{ Mortalidad e Grupo controle}) \times 100}$$

Quadro 1- Principais diferenças entre as três Técnicas de Imersão de Larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando seringas.

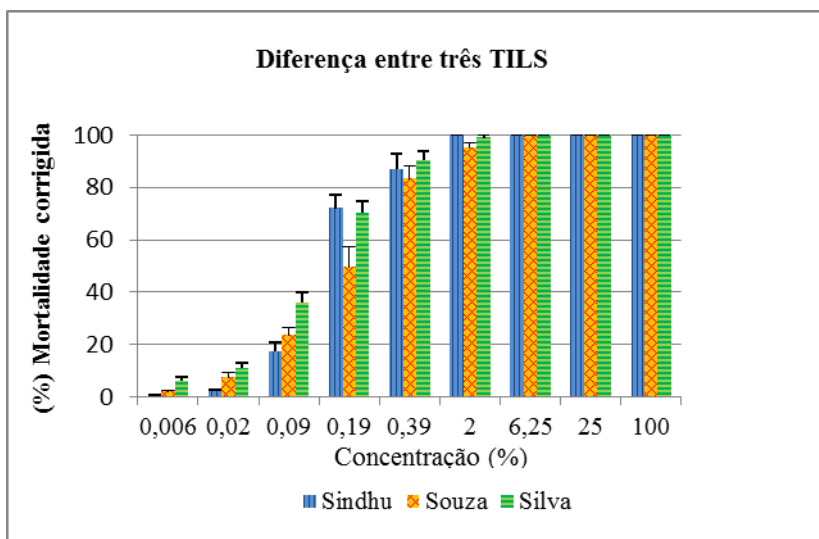
Metodologia	Souza et al. (2008)	Silva et al. (2011)	Sindhur; Jonsson; Iqbal (2012)
Quantidade de larvas/seringa	200 larvas	100 larvas	200 larvas
Tamanho da seringa	5 mL	5 mL	3 mL
Orifício/local na seringa	1 mm Metade da seringa	1 mm Metade da seringa	Sem orifício
Tempo de imersão	30 segundos	5 minutos	30 segundos
Tipo de imersão	Imersão da seringa no acaricida	Imersão da seringa no acaricida	Administração de 2 mL do acaricida por seringa + homogeneização

Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados das três técnicas empregadas verificou-se que os percentuais de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* (Figura 1) foram diretamente proporcionais ao aumento da concentração do acaricida concordando com os dados obtidos por (LOPES et al., 2010). Nas concentrações de 6,25 a 100% ocorreram mortalidades de 100% das larvas nas três técnicas. O percentual de mortalidade médio (\pm EP) nos grupos controle foi de $0,33\pm 0,17$; $1,48\pm 0,79$ e $0,25\pm 0,17$ para as técnicas de T1, T2 e T3, respectivamente. Os testes foram realizados em sala climatizada ($27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 80% UR), pois em testes anteriores realizados em B.O.D. ocorreram 100% mortalidade até mesmo das concentrações mais diluídas.

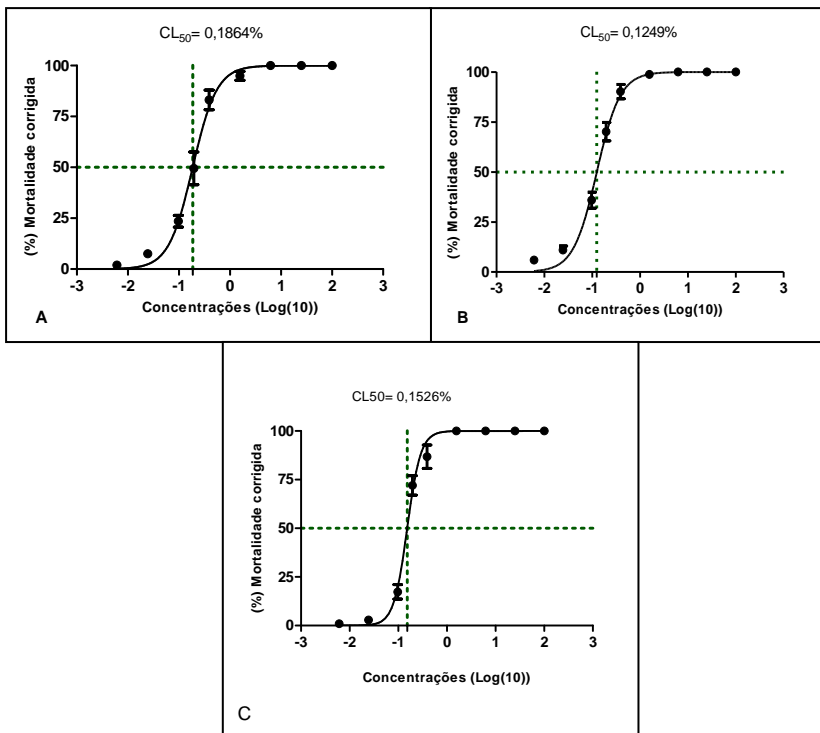
Figura 1- Comparação da ação letal da associação entre cipermetrina e clorpirifós em nove diluições seriadas considerando 100% (cipermetrina 150 ppm e 250 ppm de clorpirifós) em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* avaliado por meio das técnicas de imersão de larvas descritas por Souza et al. (2008), Silva et al. (2011) e Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012).



Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

Os valores de CL_{50} foram de 0,18% (T1) e 0,12% (T2), 0,15% (T3); respectivamente (Figura 2).

Figura 2. Efeito dose-resposta da ação letal de acaricida comercial à base de cipermetrina (150 ppm) e clorpirofós (250 ppm) em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* avaliado por meio das técnicas de imersão de larvas: Souza et al. (2008) (A), Silva et al. (2008) (B) e Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) (C).



Fonte: Pesquisa do Próprio Autora (2014)

Os dados obtidos foram analisados através da análise da variância (ANOVA) e em blocos casualizados e não houve diferença estatística entre as três TILS.

As técnicas do LPT, TIL (SHAW, 1966) e de Souza et al. (2008) têm sido as mais utilizadas para os testes de comparação com outras técnicas de imersão de larvas, para detecção de cepas de *R. (B.) microplus* resistentes aos

acaricidas químicos e avaliação de extratos de plantas. Para detecção de cepas de *R. (B.) microplus* resistentes aos acaricidas químicos à técnica de TPL tem se sobressaído em relação às demais por ser um padrão recomendado pela FAO. No entanto, para avaliação de extratos de planta, a TIL desenvolvida por Shaw (1966) e a modificação proposta por Souza et al. (2008) foram de maior praticidade de execução. Os resultados apresentados neste trabalho indicam, no entanto, que a modificação da T1 proposta por T3 torna o método ainda mais prático, pois reduz o tempo de preparo do material (não usa orifício na seringa), reduz o espaço necessário para armazenamento das seringas (já que é usado à seringa de 3 mL) e reduz o risco de contaminação do ambiente e do manuseador com a substância teste (a solução é injetada através do tecido, ao invés da seringa ser mergulhada na solução) e evita o desperdício de soluções no momento do preparo, pois apenas 2 mL são utilizados por seringa.

A modificação proposta pela T2, de aumento do tempo de imersão das larvas na solução teste de 30 segundos para 5 minutos, teve maior efeito na mortalidade das larvas em concentrações baixas (0,006; 0,0244 e 0,0976%), quando comparado às demais técnicas. O maior tempo de imersão também aumentou a mortalidade das larvas imersas em água (grupo controle), em relação às demais técnicas, o que prejudica a avaliação do efeito letal de substâncias testes. A utilização de 100 larvas foi considerada um benefício, porque diminui o tempo de preparo das seringas e contagem das larvas após os testes.

A comparação entre as técnicas de TPL modificada, descrito por Miller; DAVEY; GEORGE (2002) e recomendado pela FAO no diagnóstico de resistência, TIL desenvolvida por Shaw (1966) e a TILS desenvolvida por Souza et al. (2008) foi realizada por (LOPES et al., 2010). Pela análise linear os três testes apresentaram alta correlação, indicando, assim como os

nossos resultados, que variação dos dados ocorre em função da diluição testada. Quanto maior a diluição, menor a interferência de fatores externos, como o erro experimental, por exemplo. Pelo Test-t, os autores identificaram diferença estatística entre a TPL e a TIL e entre a TPL e a TIS apesar de haver diferença estatística significativa entre o teste padrão TPL e os demais, reforça-se a tendência linear das curvas demonstrando que as demais técnicas são promissoras, principalmente o teste de imersão de larvas utilizando seringa que obteve mortalidade superior a 90% na mais alta concentração assim como o teste padrão.

Santos et al. (2013) verificaram a sensibilidade de cepas de *R. (B.) microplus* em 20 fazendas no RS ao amitraz comparando a TPL modificada (FAO, 2004), TIL (SHAW, 1966) e TILS (SOUZA et al., 2008). Os resultados obtidos limitaram a recomendação de uso do TIL e TILS para diagnóstico de resistência ao amitraz. De acordo com os autores, mais pesquisas seriam necessárias para aprimorar a sensibilidade destes testes em relação ao TPL. Os autores ressaltam, porém, a necessidade de desenvolver um ensaio que fosse mais fácil e rápido de executar do que o TPL.

Embora não tenha sido utilizado amitraz no presente estudo, através dos resultados obtidos pelas três TILS foi possível verificar a sensibilidade e a praticidade das mesmas na solução testada.

Dos três métodos avaliados pode-se observar que a utilização de seringas de 3 mL sem orifício de abertura, 100 larvas por repetição, tempo de imersão de 30 segundos e a administração da substância teste através do tecido facilitam a execução da técnica de imersão sem perder a confiabilidade dos resultados.

CONCLUSÕES

Os resultados dos testes de imersão de larva em seringas pelas técnicas de Souza et al. (2008), Silva et al. (2011) e Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) são equivalentes.

Nos três tratamentos todas as seringas permaneceram por uma hora em capela de exaustão, para auxiliar na secagem das mesmas e evaporação da substância acaricida, posteriormente foram encaminhadas para uma sala climatizada (27 °C e 80% UR). Pois quando se trabalha em B.O.D com altas concentrações pode-se estar influenciando na mortalidade das larvas do grupo controle devido a impregnação do acaricida, o que não ocorreu no presente trabalho devido à utilização da sala climatizada.

A técnica desenvolvida por Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012) apresentou maior praticidade de execução para a realização dos testes de imersão de larvas utilizando seringas.

A sucção das larvas através de bomba a vácuo facilitou a execução dos testes.

A utilização do número de 100 larvas de *R. (B.) microplus* conforme Silva et al. (2011) facilitou no tempo de contagem das mesmas.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic Entomology**, v.18, p. 265-267, 1925.

ALVES-BRANCO, F. P. J.; PINHEIRO, A. C. Controle do *Boophilus microplus* com esquema de banhos estratégicos em bovinos Hereford. **Circular Técnica**: Boletim técnico da EMBRAPA-CNPO, Bagé, n.4, 1989.

ALVES-BRANCO, F. de P. J.; SAPPER, M. F. M.; PINHEIRO, A. C. Estirpes de *Boophilus microplus* resistentes a piretróides. SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1993, Londrina. **Anais...**Londrina: CBPV, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 48 de 16 de maio de 1997. Regulamento Técnico para Licenciamento e/ou Renovação de Licença de Produtos Antiparasitários de Uso Veterinário. **Diário Oficial** 16 de maio de 1997. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=72818869>. Acesso em: 20/08/2013.

FARIAS, N.A.; RUAS, J.L.; SANTOS, T. R.B.dos. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 1700-1704, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Resistance management and integrated parasite control I ruminants: Guidelines. Roma, Itália: Food e Agriculture Organization, Animal Production and Helth Division. 53 p. 2004.

FREIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego do tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Boletim Diretoria de Produção Animal**. Guaíba, v. 9, p. 3-31, 1953.

LARANJA, R. J.; ARTECHE, C. C. P.; ARREGUI, L. A. Concentração que inibe a postura viável em 50% de três carrapaticidas organofosforados “*in vitro*” frente a teleóginas de uma estirpe sensível. **Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, v. 2, p. 9-14, 1974.

LARANJA, R.J., MARTINS, J.R., CERESÉR, V.H. Identificação de uma estirpe de *Boophilus microplus* resistente a carrapaticidas piretróides no Estado do Rio Grande do Sul. SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1989, Bagé. **Anais...** Bagé: CBPV, 1989.

LOPES, A. et al. Avaliação simultânea de técnicas *in vitro* para sensibilidade de larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ao amitraz. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPEL, 19. 2010. Pelotas. Anais Eletrônicos... Pelotas: UFPEL, 2010. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CA/CA_01407.pdf> Acesso em: 20 ago. 2012.

MARTINS, J. R. S. et al. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 3., 1995, Acapulco. **Anais...** Acapulco: SAGAR, CANIFARMA, FAO, IICA, INIFAP, p.1-8, 1995.

MARTINS, J. R. S.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **The Veterinary Record**, v. 149, p. 64, 2001.

MARTINS, J.R., DOYLE, R.L., GONZALES, J.C. Principais resultados de testes carrapaticidas *in vitro* empregando-se o teste de imersão de adultos no IPVDF, Eldorado do Sul, RS. 14º CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto:CBPV, 2006.

MILLER, R.J.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. Modification of the Food and Agriculture Organization Larval Packet Test to

Measure Amitraz-Susceptibility Against Ixodidae. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 645-651, 2002.

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

SANTOS, T.R.B. et al. Análise in vitro da eficácia do Amitraz sobre populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) da Região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 54-57, 2009.

SANTOS, T.R.B. et al. Comparison of three larval bioassays to evaluate susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to amitraz. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 495-501, 2013.

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

SINDHU, Z.-u.-D.; JONSSON, N.N.; IQBAL, Z. Syringe test (modified larval immersion test): A new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 362-367, 2012.

SILVA, W. C. et al. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 189-194, 2011.

SOUZA, A. P. et al. Susceptibilidade do carrapato a carrapaticidas em diferentes propriedades no Planalto Catarinense. **Comunicado Técnico**: boletim técnico da EMPASC, Florianópolis, n. 72, 1984.

SOUZA, A. P. et al. Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 242-245, 2008.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Reserch Entomol Bull**, v. 53, p. 563-578, 1962.

VARGAS, S. M. et al. Avaliação *in vitro* de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 737-742, 2003.

VEIGA, L. P. H. N. **Situação de resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* à cipermetrina e amitraz no planalto catarinense e proposta de um teste de imersão de larvas para avaliação de carrapaticidas**. 2007. 39 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, 2007.

YAMAMURA, M. H.; MERLINI, L. S. Estudo *in vitro* da resistência de *Boophilus microplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do norte do estado do Paraná. **Semina** (Londrina), Londrina, v.19, p.38-43, 1998.

7 EXPERIMENTO 2: EFEITO ACARICIDA *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) EM LARVAS E TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

RESUMO

Os extratos aquosos, metanólicos e hexânicos de *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* foram avaliados quanto à atividade acaricida em teleóginas e larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Para o Teste de Imersão de Teleóginas utilizou-se as concentrações de 25600, 12800, 6400, 3200 e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já para o teste de imersão de Larvas, as concentrações foram de 25600, 12800, 6400, 3200 e 1600, 800 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em teleóginas, observou-se eficácia do extrato metanólico de *V. nudiflora* e de *B. trimera* próximo de 30%, nas concentrações de 12800 e 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A utilização dos extratos metanólicos e hexânicos de *B. trimera* induziram 38, 96% e 52,02% de mortalidade de larvas na maior concentração testada 25600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A concentração letal mediana (CL_{50}), do extrato hexânico foi de $\text{CL}_{50} = 24.417 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos metanólico e hexânico de *B. trimera* apresentaram atividade acaricida em larvas de *R. (B.) microplus*. Os extratos aquosos das três plantas não apresentaram atividade acaricida. Os extratos de *Eupatorium buniifolium* não apresentaram atividade acaricida. Os resultados indicam potencial acaricida dos extratos metanólico e hexânico de *B. trimera* em *R. (B.) microplus*.

Palavras-chave: Carrapato. Teste Imersão de Larvas. Teste de Imersão de Adultos. Asteraceae.

IN VITRO ACARICIDAL EFFECT OF *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* AND *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) EXTRACTS ON LARVAE AND ENGORGED FEMALES OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

ABSTRACT

The aqueous extracts, methanol and hexane of *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* and *Eupatorium buniifolium* were evaluated by their acaricidal activity in engorged females and larvae *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. For the immersion test were used concentrations 25600, 12800, 6400, 3200 and 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ engorged females. Yet for the larval immersion test concentrations were 25600, 12800, 6400, 3200 and 1600, 800 and 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In engorged females, we observed efficacy of rosemary field and gorse methanol extract near to 30% at concentrations of 12800 and 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The use of methanol and hexane extracts of *B. trimera* led to 38, 96% and 52.02% mortality of larvae at the highest concentration tested 25600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The average lethal concentration (LC_{50}) of the hexane extract was ($\text{LC}_{50} = 24.417 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The hexane and methanol extracts of *B. trimera* presented biological activity against larvae of *R. (B.) microplus*. The aqueous extracts of the three plants not present acaricidal activity. The extracts of *E. buniifolium* not present acaricidal activity. The results indicate acaricide potential of methanol and hexane extracts of *B. trimera* in *R. (B.) microplus*.

Key-words: Tick. Immersion test larvae. Adult immersion test. Asteraceae.

INTRODUÇÃO

A região denominada de Pampa ou Campos Sulinos abrangem áreas pastoris de planícies nos três países da América do Sul (cerca de dois terços do estado do Rio Grande do Sul (RS), as províncias Argentinas de Buenos Aires, La Pampa, Santa Fé, Entreríos e Corrientes e a República Oriental do Uruguai). Estão localizados entre 34° e 30° latitude Sul e 57° e 63° latitude Oeste. No Brasil, o Pampa só existe no Rio Grande do Sul e ocupa 63% do território do estado, e há mais de 300 anos é utilizado para a produção pecuária (SUERTEGARAY; PIRES DA SILVA, 2009).

Existem, neste bioma, cerca de 3000 espécies de plantas. Sendo consideradas plantas forrageiras cerca de 400 espécies de gramíneas e mais de 150 espécies de leguminosas (BOLDRINI, 1997). Portanto, este recurso natural representa uma fonte imensa de germoplasma forrageiro sem igual em todo o mundo, mas ainda é pouco pesquisado quanto às suas potencialidades e diversas aptidões, para utilização como pastagens cultivadas ou mesmo para outros usos, como a fitoterapia.

A produção animal, principalmente de bovinos, ovinos e equinos criados de forma extensiva, convive naturalmente com o que conhecemos por plantas indesejáveis. Estas espécies são conhecidas por não integrarem a dieta do animal e, por sua frequência de ocorrência diminuem o rendimento de espécies desejáveis. Algumas destas espécies também podem provocar efeitos tóxicos para os animais, quando eventualmente consumidas. Das espécies nativas consideradas indesejáveis nas pastagens naturais do RS, as de maior ocorrência são a *Baccharis trimera* (carqueja), *Eupatorium buniifolium* (chirca), *Vernonia nudiflora* (alecrim-do-campo), *Baccharis coridifolia* (mio-mio), *Senecio brasiliensis* (maria-mole), *Eryngium horridum* (caraguatá), *Eryngium pandalifolium* (caraguatá-do-

banhado), *Andropogon lateralis* (capim caninha) e a *Erianthus angustifolius* (macega estaladeira) (NABINGUER, 2006).

A fitoterapia adiciona uma nova visão para o papel destas espécies até agora pouco estudadas quanto aos seus efeitos medicinais. Paralelamente a este campo de pesquisa ainda pouco explorado, a escassez de bases químicas disponíveis para o controle de *R. (B.) microplus* conduz a procura por novos princípios ativos e novas formas de controle deste parasito, responsável por grandes prejuízos econômicos na bovinocultura. O uso de extratos vegetais poderá servir de fonte para a identificação de novas moléculas com ação acaricida e/ou de novos métodos de controle baseados em extratos naturais. A realização do presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade acaricida de três espécies de plantas, entre as consideradas indesejáveis em pastagens de criação de bovinos. Estas espécies são conhecidas pelo nome popular de *B. trimeria* (carqueja), *V. nudiflora* (alecrim-do-campo) e *E. buniifolium* (chirca).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ectoparasitologia da Embrapa Pecuária Sul (CPPSUL), município de Bagé, RS, no período de agosto a fevereiro de 2013/2014.

COLETA E PREPARO DAS PLANTAS

Amostras das espécies *B. trimeria*, *V. nudiflora* e *E. buniifolium* foram coletadas durante o mês de abril de 2013, nos campos da Embrapa Pecuária Sul, localizados na BR 153, Km 603 (Longitude Oeste: 54° 00' 741'', Latitude: S 31° 20' 932''), com autorização do IBAMA (Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético para fins de pesquisa da Embrapa

Nº002/2008 (Anexo I) e a aprovação deste estudo pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UDESC (CETEA/UDESC) através do Protocolo: 01.59.14 (Anexo II).

Uma amostra de cada planta foi armazenada para a confecção de exsicata no herbário do CPPSUL. Da carqueja foram coletadas o cladódio (caule alado), do alecrim as folhas e caule-fino e da chirca as pontas de ramos e folhas (caules pequenos). As plantas foram colocadas em estufa, a temperatura de 37 °C, durante três (carqueja), seis (alecrim) e cinco (chirca) dias para secagem. Posteriormente, foram trituradas em moinho para o tamanho de 1 mm e acondicionadas em sacos de papel até o momento da extração.

Paralelamente à coleta das espécies vegetais, uma amostra do solo do local da coleta foi enviada para análise no Laboratório de Solos da UFRGS. Os resultados se encontram no (Anexo II).

A caracterização química das plantas foi conduzida pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA – USP), de acordo com metodologia descrita por Bueno *et al.* (2008) (Quadro 1). A concentração de Tanino Condensado foi determinada pelo método de HCl-Butanol.

Quadro 1 – Caracterização química das plantas: *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium*.

AMOSTRA	Fenóis totais *	Taninos totais *	Tan. Condensados **
<i>Vernonia nudiflora</i>	84,69	71,87	0,27
<i>Baccharis trimera</i>	98,84	87,74	2,96
<i>Eupatorium buniifolium</i>	115,27	95,21	11,44

* Valores expressos em equivalente grama de ácido tânico/kg de matéria seca

** Valores expressos em equivalente grama de leucocianidina/kg de matéria seca

Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

- **Extratos Metanólicos e Hexânicos:** estes extratos foram preparados em parceria com a Universidade da Região da Campanha (URCAMP). Foram utilizadas duas partes de planta para uma parte de solvente, pelo método de extração por refluxo a 40 °C por quatro horas. Após este período, o extrato foi filtrado e, então, foi adicionado mais solvente, até que todo material vegetal ficasse submerso, para dar continuidade à extração por refluxo por mais quatro horas a 40 °C. Após todo este processo, o extrato foi filtrado em funil de vidro com algodão e armazenado em frascos de vidros em local escuro. Na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), os extratos foram submetidos à retroevaporação a 50 °C até que todo o solvente fosse evaporado. Após a rotaevaporação os extratos foram armazenados em placas de Petri protegidos da luz (papel alumínio). Estes extratos foram solubilizados no momento de preparação dos testes em polissorbato 80 a 5% e solvente. Para solubilizarmos os extratos metanólicos adicionava-se 100 µL de etanol, para os extratos hexânicos adicionava-se 100 µL de hexano. Posteriormente os extratos eram levados ao sonificador por dez minutos a 2500 rpm para que houvesse uma melhor homogeneização dos extratos, principalmente dos extratos hexânicos.

- **Extratos Aquosos:** estes extratos eram preparados no dia do experimento. A quantidade de planta seca (em gramas) era pesada em balança analítica. A água destilada e deionizada foi aquecida previamente a 40 °C. Adicionava-se a planta a ser utilizada (seca e moída), deixando-a em infusão durante 30 minutos sob constante agitação, em agitador magnético mantido a 40 °C. Posteriormente, a solução era transferida para tubos falcon para centrifugação por 3500 rpm durante 5 minutos. O pellet formado era desprezado. O sobrenadante foi

filtrado em funil de vidro com algodão. A partir desta solução concentrada eram preparadas as demais diluições.

CARRAPATOS

As teleóginas foram obtidas de cinco bovinos machos da raça holandesa pertencentes ao rebanho da CPPSUL, mantidos estabulados. Os animais foram infestados a cada 15 dias com 20.000 larvas de *R. (B.) microplus* livres dos agentes da tristeza parasitária bovina. Parte das fêmeas adultas coletadas foram incubadas em câmara climatizada a 27 °C e umidade relativa superior a 80% para obtenção de larvas.

TESTE DE IMERSÃO DE LARVAS

As seringas para os testes foram anteriormente preparadas (cortadas e fechadas com tecido voal e elástico), e identificadas. Um sistema desenvolvido no laboratório de Ectoparasitologia (CPPSUL), através de uma bomba a vácuo, mangueira, e ponteira, foi utilizado para o preenchimento das seringas com as larvas (Figura 1).

Figura 1 – Sistema desenvolvido para preenchimento de seringas com larvas



Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

Quando as larvas apresentavam idade entre 10 e 15 dias após a eclosão, estas eram selecionadas pela sua mobilidade, e por aspiração eram introduzidas em cada seringa, posteriormente introduzia-se o êmbolo, e as seringas voltavam para a câmara climatizada até a realização dos testes.

A ação larvicida dos extratos aquosos, metanólicos e hexânicos de *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* foi avaliada por meio do teste de imersão de larvas descrito por Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012), com algumas modificações, pois a leitura foi realizada apenas 24 horas após o teste e utilizou-se aproximadamente 100 larvas por seringa. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800 e 25600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Tanto no Teste de Imersão de teleóginas, quanto no teste de imersão de larvas foi utilizado acaricida comercial (Apêndice 1) a base de cipermetrina e clorpirifós, água destilada e deionizada e solução de polissorbato 80 a 5% (Apêndice 2) como controles positivo e negativo, respectivamente. Nos extratos aquosos foi utilizado apenas um controle negativo, a água destilada e deionizada. O acaricida comercial Texvet® foi preparado de acordo com a recomendação do fabricante (1 mL para 1 L). Foram preparadas sete repetições por tratamento.

O percentual de mortalidade dos tratamentos mostrado nos gráficos foi corrigido em relação à mortalidade do grupo controle negativo polissorbato 80 5% para os extratos metanólicos e hexânicos, já os extratos aquosos foram corrigidos apenas pelo grupo controle negativo, composto por água destilada e deionizada, de acordo com a fórmula desenvolvida por Abott (1925). Em todos os testes, o controle positivo apresentou 100% de mortalidade das larvas.

$$\% \text{ Mortalidade (corrigido)} = \frac{\% \text{ Mortalidad e Grupo teste} - \% \text{ Mortalidad e Grupo controle}}{(100 - \% \text{ Mortalidad e Grupo controle}) \times 100}$$

TESTE DE IMERSÃO DE TELEÓGINAS

O efeito acaricida dos extratos aquosos, metanólicos e hexânicos de *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* foi avaliado por meio do Teste de Imersão de Adultos, descrito por (DRUMMOND et al. 1973). Para cada extrato, foram avaliadas as concentrações de 1600, 3200, 6400, 12800 e 25600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para cada diluição, foram utilizados quatro repetições, com grupos de 10 teleóginas cada, previamente lavadas e selecionadas pelo tamanho e condição geral. As teleóginas foram submersas nas soluções pelo período de cinco minutos.

Após o tratamento, os grupos de fêmeas foram fixados com fita dupla face em placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada regulada a 27 °C e umidade relativa superior a 80% para registro do número de teleóginas mortas, massa de ovos e percentual de eclosão para cada grupo. A partir destes valores foram calculados o percentual de eficácia de cada solução (DRUMMOND et al. 1973), percentual de inibição de oviposição e percentual de inibição de eclosão, estes últimos de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ IO (Inibição de oviposição)} = (\text{IO}_{\text{controle}} - \text{IO}_{\text{tratado}}) - \times 100 / \text{IO}_{\text{controle}}$$

Onde, IO = Índice de oviposição = massa ovos (g)/massa teleóginas (g)

$$\% \text{ IE (Inibição de eclosão)} = (\text{IE}_{\text{controle}} - \text{IE}_{\text{tratado}}) - \times 100 / \text{IE}_{\text{controle}}$$

Onde, IE = Estimativa de eclodibilidade = massa ovos férteis(g) x % eclosão / massa ovos inférteis(g) x % eclosão

ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pela comparação de médias através do teste de Tukey (STEEL; TORRIE; DICKEY, 1997). Todas as análises foram conduzidas com o uso do software SAS[®] (Statistical Analysis System, 2003). Para todos os testes efetuados foi considerado o nível mínimo de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

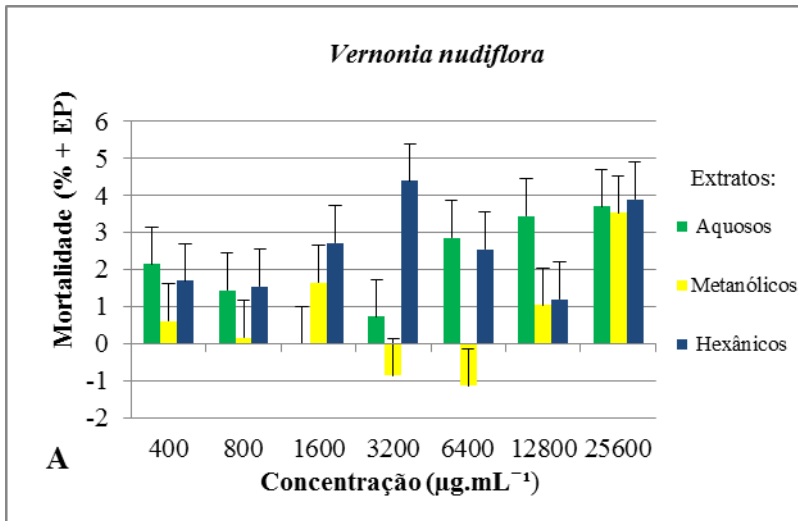
Teste de imersão de larvas

Os resultados de *V. nudiflora* (alecrim-do-campo) (Figura 1A) foram inferiores a 5% de mortalidade nos três extratos testados.

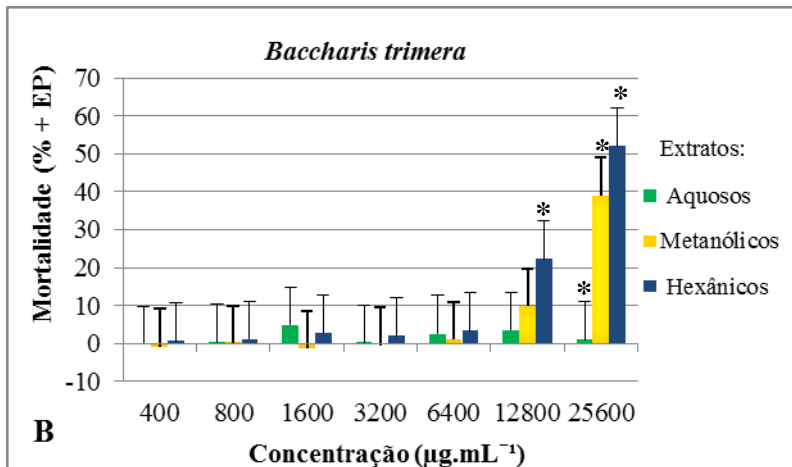
Verificou-se efeito acaricida nos extratos metanólicos e hexânicos de *B. trimera* (carqueja) (Figura 1B) na maior concentração testada ($25600 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com percentual de mortalidade corrigido de 38,96 e 52,02%, respectivamente. Houve diferença estatística entre os três extratos na concentração de $25600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e na concentração de $12800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apenas no extrato hexânico.

Já para *E. bunifoliim* (chirca) (Figura 1C), a mortalidade se aproximou de 20% no extrato hexânico, sem resultados expressivos para os demais extratos.

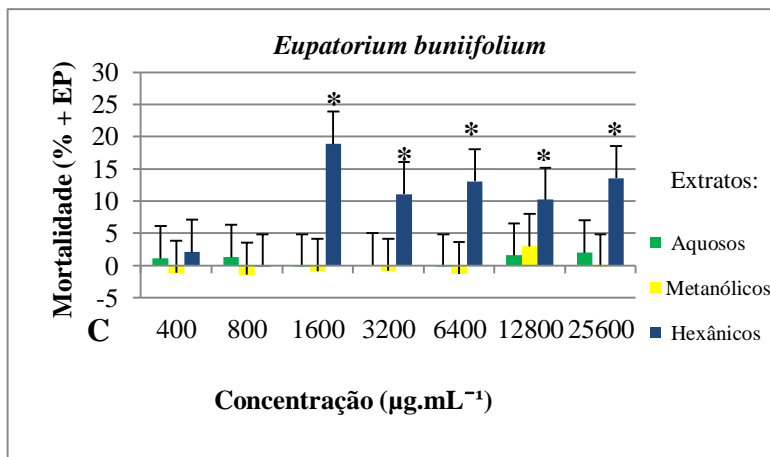
Figura 2 – Efeito acaricida *in vitro* de extratos aquosos, metanólicos e hexânicos de *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* (A, B e C) em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



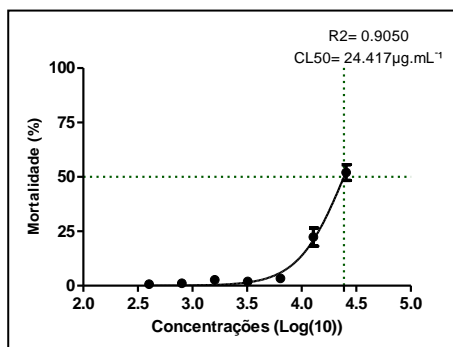
Comparação entre os extratos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* O asterisco significa diferença estatística entre os extratos.

Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

O extrato hexânico de *B. trimera* causou 52,02% de mortalidade de larvas, posteriormente foi calculado a CL_{50} para este extrato, o valor encontrado foi de $24,417 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Figura 3 – Efeito dose-resposta da ação letal do extrato hexânico de *Baccharis trimera* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

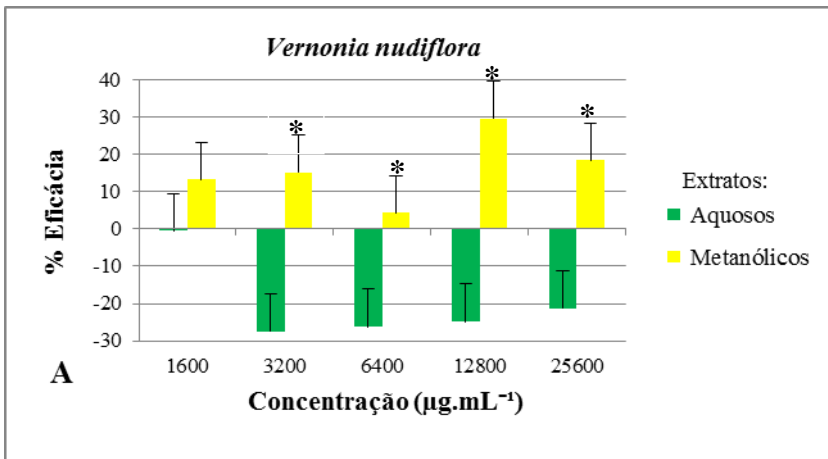


Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

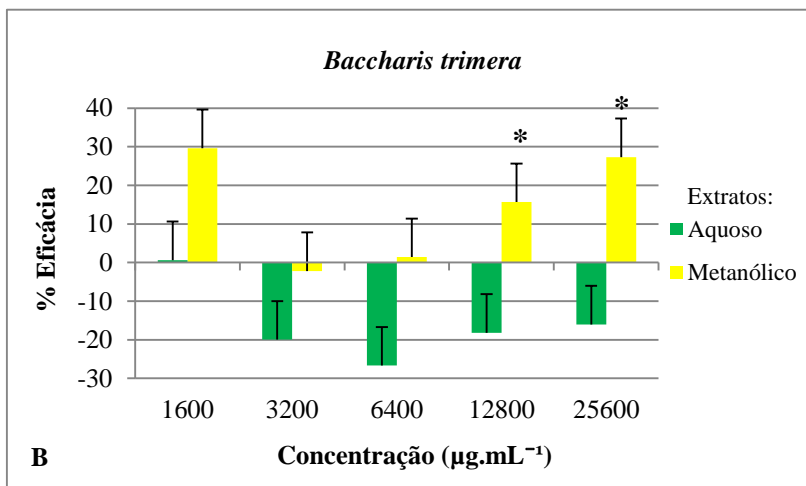
Teste de imersão de teleóginas

No Teste de Imersão de Adultos (TIA), os extratos metanólicos de *V. nudiflora* (alecrim-do-campo) (Figura 3A) e *B. trimera* (carqueja) (Figura 3B) apresentaram eficácia máxima próxima de 30%. Para a *E. buniifolium* (chirca), este índice foi inferior a 20% (Figura 3C).

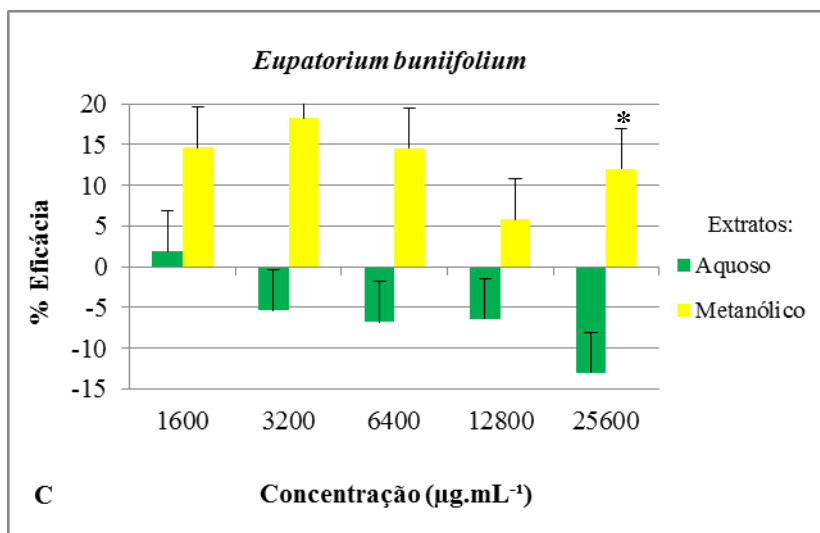
Figura 4 – Percentual de Eficácia dos extratos aquosos e metanólicos de *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* (A, B e C) em teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



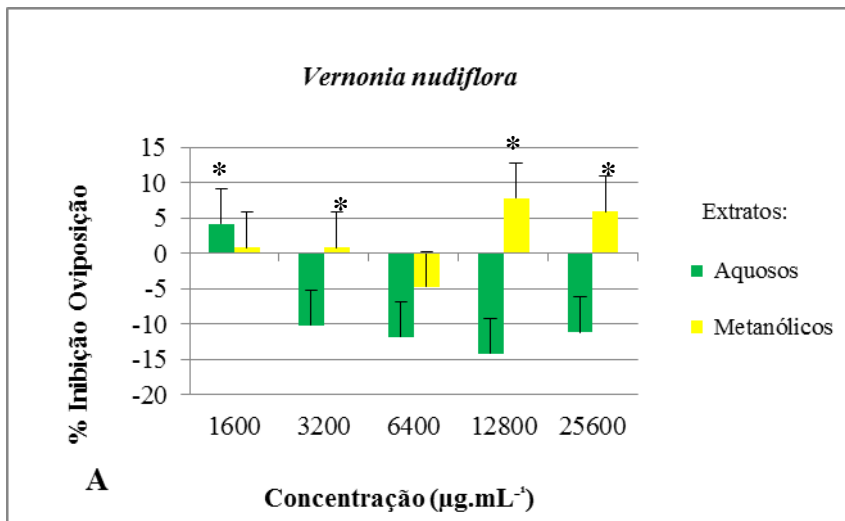
Comparação entre os extratos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

* O asterisco significa diferença estatística entre os extratos.

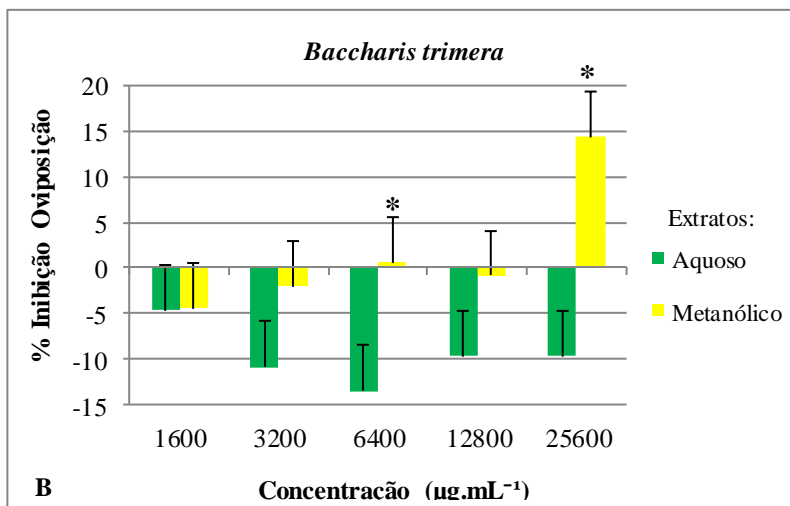
Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

Com relação ao percentual de inibição de oviposição, apenas os extratos metanólicos das três plantas apresentaram algum efeito. *Vernonia nudiflora* (alecrim-do-campo) inibiu 7,78% de oviposição na concentração de 12800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 4A). Já *B. trimera* (carqueja) (Figura B) e a *E. buniifolium* (chirca) (Figura 4C) inibiram 14,42% e 8,38% na maior concentração testada, respectivamente.

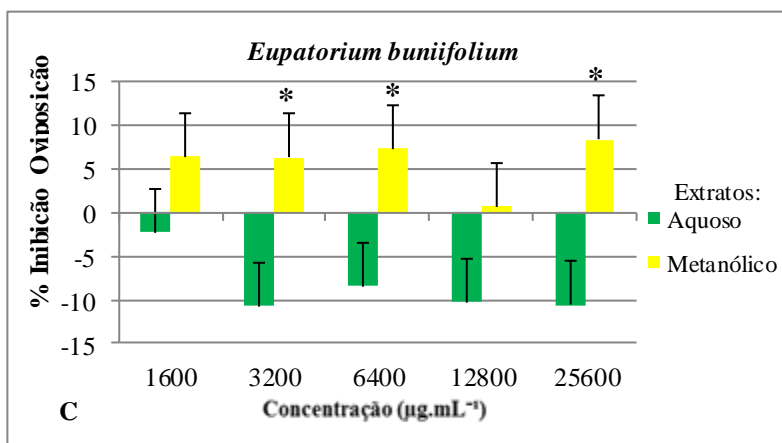
Figura 5 – Percentual de Inibição de Oviposição dos extratos aquosos e metanólicos de *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* (A, B e C) em teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



Comparação entre os extratos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* O asterisco significa diferença estatística entre os extratos.

Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

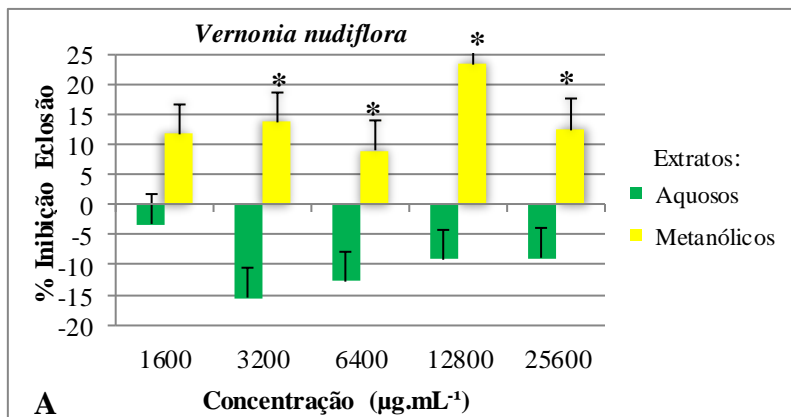
O extrato metanólico de *V. nudiflora* (alecrim-do-campo) (Figura 5A) inibiu 23,53% ($12800 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de eclosão

dos ovos. Já a *B. trimera* (carqueja) (Figura 5B) inibiu 31,86%, mas na concentração mais diluída (1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Na maior concentração, os valores foram inferiores a 20%. O extrato metanólico *E. buniifolium* (chirca) (Figura 5C) inibiram 12,03% na concentração de 3200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

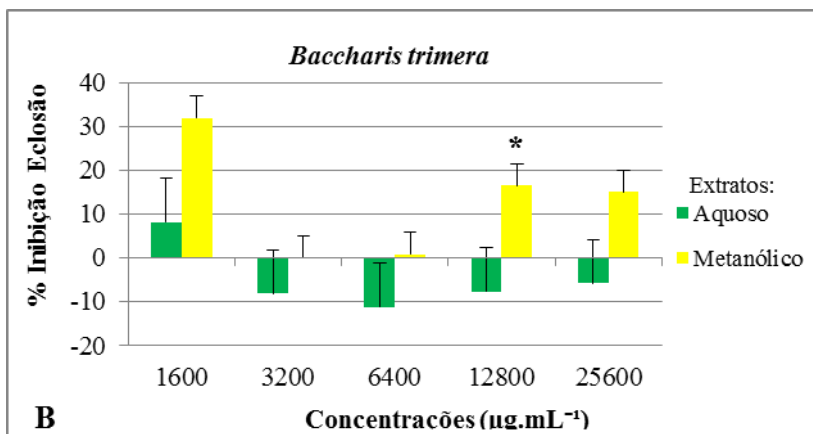
Os extratos aquosos não apresentaram eficácia acaricida ou inibição de oviposição e inibição de eclosão dos ovos, apresentando resultados negativos ou inferiores a 10% para as três espécies de plantas avaliadas.

Os extratos hexânicos não se solubilizaram completamente nas concentrações preparadas para os ensaios de TIA. Há necessidade de se avaliar outros diluentes para o preparo de soluções com este extrato. Por este motivo, os dados deste teste não foram incluídos neste trabalho.

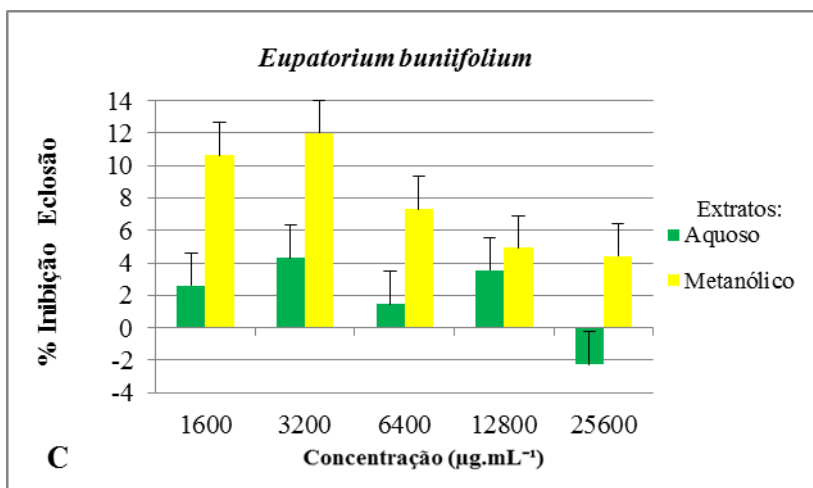
Figura 6 – Percentual de Inibição de Eclosão dos extratos aquosos e metanólicos de *Vernonia nudiflora*, *Baccharis trimera* e *Eupatorium buniifolium* (A, B e C) em teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



Comparação entre os extratos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* O asterisco significa diferença estatística entre os extratos.

Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

Observou-se que apenas *B. trimera*, popularmente conhecida como carqueja, apresentou alguma eficácia acaricida, o efeito foi maior em larvas do que em adultos. Os percentuais de mortalidade de larvas foram de 38,96 e 52,02%

obtidos com os extratos metanólicos e hexânicos na concentração de $25600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estes resultados poderão ser superiores a este com o aumento da concentração. Em teleóginas, observou-se eficácia do extrato metanólico de alecrim do campo e de carqueja próximo de 30%, nas concentrações de 12800 e $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Lázaro et al. (2013), também avaliaram a eficácia de extratos aquosos de *B. trimera* em teleóginas *R. (B.) microplus* e obtiveram 100% de eficácia na inibição da eclosão dos ovos nas concentrações de 150 e 200mg.ml^{-1} , concentração muito superior a usada no presente estudo. A forma de produção do extrato também pode ser um fator interferente. No trabalho de Lázaro et al. (2013), foram utilizadas plantas frescas que passaram por 15 minutos em ebulição.

Não encontramos na literatura até o presente momento testes *in vitro* com larvas e teleóginas de *R. (B.) microplus* utilizando *V. nudiflora* e *E. buniifolium*, porém algumas plantas da família Asteraceae foram e estão sendo testadas quanto ao seu efeito acaricida.

Mendes et al. (2007) identificaram a presença de metabólitos secundários como alcaloides, flavonóides, saponinas, polifenóis, taninos e cumarinas em extratos hidroalcóolicos de *B. trimera*. O presente trabalho também identificou a presença de taninos nas três espécies vegetais avaliadas. Fernández-Salas et al. (2011) ao avaliaram a ação acaricida *in vitro* de extrato liofilizado de quatro plantas ricas em tanino (*Acacia pennatula*, *Piscidia piscipula*, *Leucaena leucocephala* e *Lysiloma latisiliquum*) observaram mortalidade de 54,8% das larvas com o extrato de *Acacia pennatula* na concentração de $4800 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Este efeito foi inibido pelo polietilenoglicol (PEG), confirmando a ação acaricida do tanino sobre larvas de *R. microplus*. Como ressaltado por Bueno et al. (2008), os taninos podem apresentar diferença de atividade de acordo com a fonte, diferenças no processamento dos extratos e

consequente alteração na composição química podem ter contribuído para estes achados.

Politi et al. (2012) testaram à ação acaricida *in vitro* do extrato etanólico 70% de *Tagetes patula* (Asteraceae). De acordo com os autores, a importância econômica e comercial desta planta é devido à produção de metabólitos secundários encontrados com potencial acaricida e inseticida, principalmente flavonóides, tiofenos e terpenos. Foram realizados testes de imersão de larvas (SHAW, 1966) e de teleóginas em *R. sanguineos*. As concentrações utilizadas foram 12,5; 25, 50 e 100 mg/mL. A concentração de 50 mg/mL reduziu 21,5% a oviposição e a mortalidade no teste de imersão de larvas foi de 99,78%. Segundo o autor, a aplicação deste produto no ambiente, poderia eliminar completamente a fase larval deste ixodídeo. Novamente, observa-se efeito em concentrações superiores às testadas no presente estudo.

Garcia (2012) avaliaram à atividade acaricida do óleo essencial das folhas e caules de *Tagetes minuta* contra o *R. (B.) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Argas miniatus*. Foram conduzidos testes de imersão de adulto (TIA) e de pacote de larvas (TPL) nas concentrações de 2,5%; 5%; 10%; 20% e 40%. Os resultados do TPL e TIA demonstraram que o óleo essencial na concentração de 20% de *T. minuta* apresentou eficácia superior a 95% para as quatro espécies de carrapato. A composição química do óleo foi determinada por GC-MS e análises de espectroscopia de RMN, que revelaram a presença de monoterpenos. Os autores sugerem que o óleo essencial de *T. minuta* pode ser usado como um acaricida eficaz e com baixo impacto ambiental.

O percentual de eficácia observado para os extratos metanólicos e hexânicos de *B. trimera* (carqueja) na concentração de 25600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a relação positiva de aumento da dose-resposta indicam a possibilidade de se alcançar melhores resultados em concentrações superiores.

Tratamentos alternativos, como os fitoterápicos, são, frequentemente, complementares ao tratamento químico ou podem substituí-los parcialmente no controle de parasitos. Portanto, porcentagens de eficácia entre 50 e 95% são promissoras para potenciais produtos de origem vegetal que possam ser utilizados como participantes de um controle integrado de ectoparasitos de ruminantes. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram potencial de uso do extrato de carqueja no controle de *R. microplus*. Estudos adicionais são necessários para avaliar o efeito acaricida em larvas em concentrações superiores a 25600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e determinação da contribuição do papel do tanino condensado sobre este efeito.

CONCLUSÕES

Os extratos metanólicos e hexânicos de *B. trimera* (carqueja) apresentaram eficácia acaricida de 38,96 e 52,02% em larvas de *R. (B.) microplus*.

Já os extratos aquosos de *B. trimera* não apresentaram atividade acaricida.

Os extratos aquosos, metanólicos e hexânicos de *Vernonia nudiflora* (alecrim-do-campo) e *Eupatorium buniifolium* (chirca) não apresentaram atividade acaricida em larvas de *R. (B.) microplus*.

Os extrato metanólico de *Vernonia nudiflora* (alecrim-do-campo) e de *B. trimera* (carqueja) apresentaram eficácia acaricida, próximo de 30% em teleóginas.

Os extratos aquosos e metanólicos de *Eupatorium buniifolium* (chirca) não apresentaram atividade acaricida em teleóginas de *R. (B.) microplus*.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A. Method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18 p. 265-266, 1925.

BOLDRINI, I. I. Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização fisionômica e problemática ocupacional. **Boletim do Instituto de Biociências**, n. 56, p.39,1997.

BUENO, I. C. S. et al. A new approach for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v.141, p. 153–170, 2008.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal Economic Entomology**, v. 66, p. 130-133, 1973.

FERNÁNDEZ-SALAS, M.A. et al. *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 113-118, 2011.

GARCIA, M.V. et al. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 405-411, 2012.

LÁZARO, S.F. et al. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 194, p. 79-82, 2013.

MENDES, F.R., TABACH, R., CARLINI, E.A. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. **Reserch Phytotherapy**, v. 6, p. 517–522, 2007.

NABINGER, C. Manejo de campo nativo na região sul e a viabilidade do uso de modelos. SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM PRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2006, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: Departamento de Zootecnia, 2006. CD-rom.

POLITI, M. V. et al. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 405-411, 2012.

SAS Institute Inc[®] 2003 **SAS Ver. 9.1.3** SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA. Lic. UDESC.

SINDHU, Z.-u.-D.; JONSSON, N.N.; IQBAL, Z. Syringe test (modified larval immersion test): A new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 362-367, 2012.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H.; DICKEY, D. A. **Principles and procedures of statistics** – a biomerical approach. 3. ed. McGraw-Hill : New York, USA. 666 p. 1997.

SUERTEGARAY, D. M. A.; PIRES DA SILVA, L. A. Capítulo 03 – Tchê Pampa: histórias da natureza gaúcha. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade** / Valério De Patta Pillar... [*et al.*]. Editores. – Brasília: MMA, p.403, 2009

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle do *R. (B.) microplus* continua sendo um entrave para produção pecuária devido aos prejuízos causados por este ectoparasito.

Muitas são as dificuldades encontradas na execução de testes com extratos de plantas em *R. (B.) microplus*, devido à quantidade de testes de triagem necessários para a execução dos testes, para saber qual dose utilizar, a solubilização dos extratos, para que o solvente utilizado não seja o causador da mortalidade de larvas e teleóginas. A identificação e a caracterização dos compostos exigem equipamentos específicos e conhecimento de profissionais de outras áreas que estejam comprometidos com o trabalho proposto. Para o desenvolvimento de pesquisas e soluções para estes entraves serão necessárias pesquisas multidisciplinares.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-BRANCO, F de P. J. et al. Carrapato dos Bovinos (*Boophilus microplus*) “Controle e Resistência a Carrapaticidas no Rio Grande do Sul”. In: V SEMINÁRIO DE PECUÁRIA DE CORTE. p. 84, 2008, Bagé. **Palestras...Bagé**, 2008.

BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.; BARBOSA, C.S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 89-96, 2011.

BOLDRINI, I. I. Campos do Rio Grande do Sul: caracterização fisionômica e problemática ocupacional. **Boletim do Instituto de Biociências**, Porto Alegre, v. 56, p. 1-39, 1997.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. et al. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, p. 44-48, 2009.

BULLMAN, G.M.; MUÑOS CABENAS, M. E.; AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinária Argentina**, v. 8, p. 3-15, 1996.

BUZATTI, A. et al. Atividade acaricida *in vitro* de *Glechon spathulata* Benth. sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1813-1817, 2011.

CHAGAS, A.C.S., OLIVEIRA, M.C.S. Parecer sobre a atividade antiparasitária de *Artemisia annua* sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em laboratório e a

campo. 2012. **Circular Técnica:** EMBRAPA-CPPSE, São Carlos, n. 69, 2012.

CHAGAS, A. C. S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Veterinary Reserch Animal Science**, v. 39, p. 247-253, 2002.

COSTA, F. B. et al. Eficácia de fitoterápicos em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião oeste do maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p. 83-86, 2008.

CRANCIO, L. A. **Plantas nativas indesejáveis: suas conseqüências sobre a produção animal e métodos de controle.** 2004. 123p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B.microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal Economic Entomology**, v. 66, p. 130-133, 1973.

FIORI, G.P. et al. Ação acaricida de extratos de *Tagetes minuta* sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. XX Congresso de Iniciação Científica e III Mostra Científica-UFPEL. **Anais...CIC** 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Rome: Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, p. 53, 2004. Disponível em:

<<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ag014e/ag014e03.pdf>>
Acesso em: 15/10/2013.

GARCIA, M. V. et al. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 405-411, 2012.

GEARY, T.G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends Parasitology**. v.21, p. 530-533, 2005.

GEORGE, D.R. et al. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. **Parasites & Vectors**, 7:28, 2014.
Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com>> Acesso em: 03/05/2014.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 3.ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2003. 128 p.

GHOSH, S. et al. Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 259-267, 2013.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GULIAS-GOMES, C.C. O Carrapato-do-Boi e o Manejo da Resistência aos Carrapaticidas. **Comunicado Técnico 70**. Bagé, p. 5, 2009.

HASSUM, I. C. Uso potencial dos fitoterápicos. Revista do Produtor. **Revista de Tecnologias, Serviços e Produtos da Embrapa Pecuária Sul**. Ano I, n. 2, p. 16-17, 2007.

IBAMA. Ecossistemas. 2004. Disponível em:
<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/campos_sulinos.html>
Acesso em: 12/12/2012.

LAZARO et al. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. **Veterinary Parasitology**, v.194, p. 79-82, 2013.

MACHADO, A. F. et al. Atividade biológica de extratos acetato de etila, etanólico e aquoso de timbó (*Lonchocarpus floribundus*) sobre carrapato bovino. **Revista Acta Amazônica**, v. 43, p. 135-142, 2013.

MARTINS, J. R. de S. **Carrapato *Boophilus microplus* (Can. 1887)(Acari: Ixodidae) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina**. 2006. 74 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE.; J. E. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against Ixodidae. **Journal of Medical Entomology**, v.39, p. 645-651, 2002.

NUÑEZ, H.; DEL PUERTO, O. Biología Del *Baccharis trimera*. In: Reunión del grupo técnico regional Sel cono Sur em mejoramientos y utilización de los recursos forrajeros del area tropical u subtropical. **Anais** Taquarembó: Grupo Campos Y Chacos, p. 99-102, 1998.

OVERBECK, G.E. et al. **Os Campos Sulinos – Conservação e uso sustentável da biodiversidade:** Parte 1 – História ambiental e cultural dos campos. Capítulo 2: Um bioma negligenciado. Brasília: MMA, 2009. 403p.

RIBEIRO, V.L.S. et al. 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**, v. 179, p. 195-198, 2011.

ROSADO-AGUILAR, J.A. et al. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 299-303, 2010.

SACCO, A. M. S. Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina: Por quê, quando e como fazer. **Circular Técnica 28**. Bagé, p. 12, 2002.

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Efeito do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em ensaios *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p. 1133-1140, 2012.

SHAW, R.D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin Entomological Research**, v. 56, p. 389-404, 1966.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 139-156, 1995.

SILVA, F.F. et al. 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, p. 1-8, 2008.

SILVA, W.C. et al. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 189-194, 2011.

SILVA, W.C. **Potencialidade acaricida sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e estudo fitoquímico de *Piper aduncum* L. (Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)**. 2008. 167p. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2008.

SINDHU, Z.-u.-D.; JONSSON, N.N.; IQBAL, Z. Syringe test (modified larval immersion test): A new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 362-367, 2012.

SOUSA, L.A.D. et al. 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, p. 36-40, 2008.

SOUZA, A.P. et al. Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 242-245, 2008.

STONE, B.F.; HAYDOCK, K.P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bull Entomology Reserch**, v. 53, p. 563-578, 1962.

TAKEDA, I. J. M. et al. Catálogo polínico do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná – 2.parte. **Biological and Health Sciences**, London, v. 7, n. 1, p. 7-18, Jul. 2001.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, p. 320, 2000.

TONIN, F.; DEL CARLO, R. J. Estatísticas Brasileiras. Números da Medicina Veterinária e Zootecnia no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. n. 61, ano XX, jan-abr., p.86, 2014.

VERDI, L.G; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae) aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; ANDREI, C.C. Plantas Inseticidas. In: SIMÕES, C.M.O.; et al. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora: UFRGS/ Editora: UFSC, 2003. c. 35, p. 903-918, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE I – Testes Preliminares

Avaliação de Sensibilidade da cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizada nos experimentos da Dissertação a bases químicas comerciais (Biocarrapaticidograma)

PROVA DE SENSIBILIDADE A CARRAPATICIDAS DE CONTATO (Biocarrapaticidograma)	
Técnico responsável: Dra Claudia Cristina Gulias Gomes	
Procedência da cepa de <i>R. microplus</i> : Bagé, RS - Embrapa Pecuária Sul	
Data colheita do material: 11/09/2013	
Data realização do exame: 11/09/2013	
PRINCIPIO ATIVO	EFICÁCIA
Amitraz 1 ¹	94,97
Deltametrina ²	89,83
Cipermetrina ²	88,50
Clorpirifós ³ + Cipermetrina ² + Citronelal ⁴	99,25
Clorpirifós ³ + Cipermetrina ² + Butóxido de Piperonila	100
Triclorfon ³ + Diclorvos ³ + Cipermetrina ² + Butóxido	100

Grupos químicos: ¹ Amidina; ² Piretróide; ³ Organofosforado; ⁴ Monoterpeno acíclico

Método de Análise: Teste de Drummond (1973)

Eficácia: valores acima de 95% indicam sensibilidade da linhagem do carrapato à base química. Valores abaixo de 95% indicam resistência à base química.

Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)

APÊNDICE II - Testes Preliminares

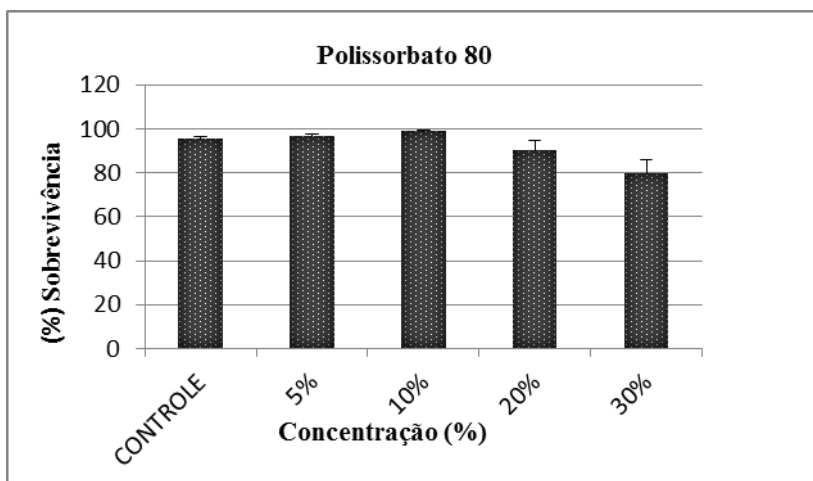
Avaliação de Sensibilidade da cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizada nos experimentos da Dissertação ao Polissorbato 80

Foram realizadas cinco repetições para o teste de imersão de larvas através da técnica de Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012), e duas para o teste de imersão de teleóginas, sendo que as concentrações utilizadas para ambos os testes foram de 5, 10, 20 e 30% de polissorbato 80. Como controle negativo, foi utilizada água destilada e deionizada para ambos os testes. A sobrevivência no teste de imersão de larvas foi de 96,77; 99,10; 89,92 e 79,65% respectivamente. No teste de imersão de teleóginas, se observou inibição de eclosão na concentração de 20% ($10,91 \pm 2,49$, Média \pm EP). Nas demais concentrações, este efeito foi nulo. O percentual de inibição de oviposição apresentou aumento proporcional ao aumento das concentrações (Amplitude: 5,72 – 19,02). Baseado nestes resultados concluiu-se que o uso de polissorbato 80 é seguro como solubilizante na concentração de 5% em testes de imersão de teleóginas e a 5 a 10% em testes de imersão de larvas. Acima destas concentrações, poderá haver efeito significativo do produto na sobrevivência e desenvolvimento de *R. (B.) microplus*.

APÊNDICE II - Testes Preliminares

Teste de Imersão de Larvas – Técnica de Sindhu; Jonsson; Iqbal (2012)

Percentual de Sobrevivência de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ao Polissorbato 80

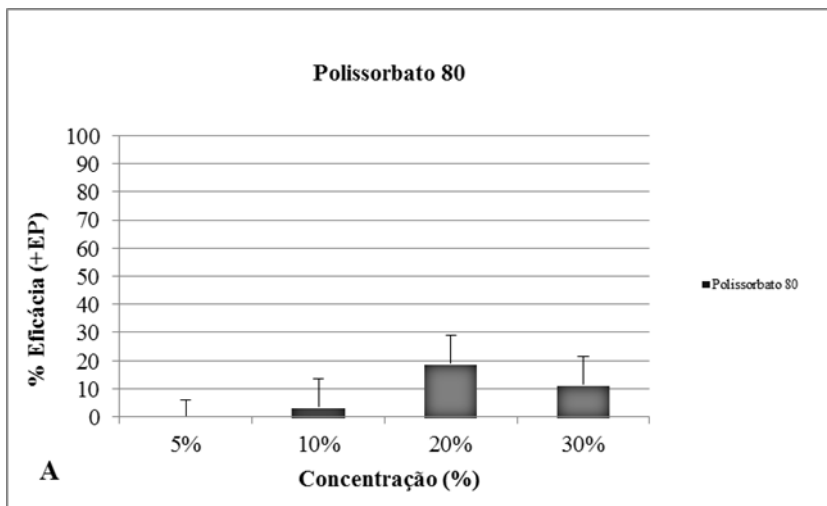


Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)

APÊNDICE II - Testes Preliminares

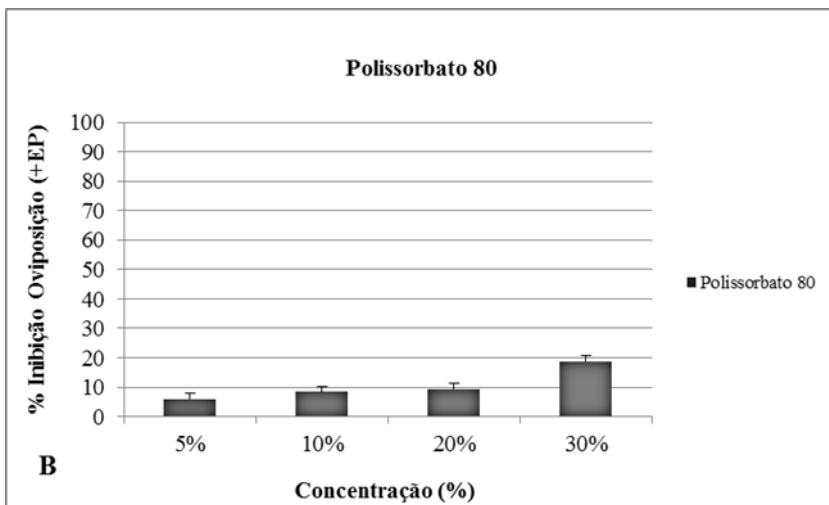
Teste de Imersão de Adultos

Percentual de Eficácia, Inibição de Oviposição e Inibição de Ecloração (A, B e C) ao Polissorbato 80 em teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

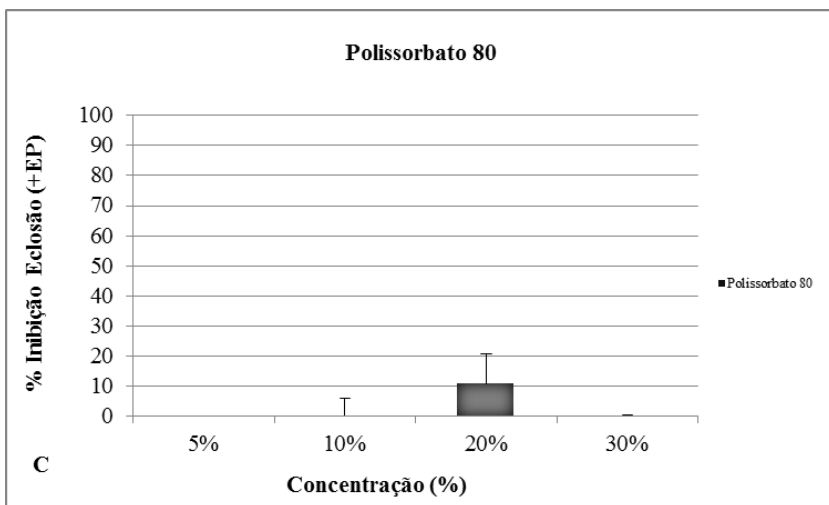


Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)

APÊNDICE II - Testes Preliminares



Fonte: Pesquisa Própria Autora (2014)



Fonte: Pesquisa da Própria Autora (2014)

ANEXOS

ANEXO I – Autorização IBAMA



M. SNE N.º 717/13

Brasília, 02 de agosto de 2013.

Dr. Alessandro Pelegrine Minho
Pesquisador da Embrapa Pecuária Sul

Senhor Pesquisador,

De ordem da Dra. Rosa Míriam de Vasconcelos, encaminhado, em anexo, para seu arquivo, cópia do pedido de Autorização de Acesso e de Remessa para fins de pesquisa científica referente ao Projeto “Prospecção de compostos bioativos do bioma pampa: efeito antiparasitário e mitigação de metano” encaminhada ao IBAMA.

Assim que recebermos a confirmação da inclusão do projeto sob a sua responsabilidade no Portfólio de Projetos da Embrapa junto ao IBAMA encaminharemos cópia para V.Sa.

Atenciosamente,

Priscila Castro de Almeida
Priscila Castro de Almeida
Coordenadora de Assuntos Regulatórios
Secretaria de Negócios

ANEXO I – Autorização IBAMA

DICAD/COAPS/CGEAD

Em 01/08/2013

Às 15:51 horas

Uhlenko

Assinatura
C. CAR. SNE nº 381/13

Embrapa

21148.020327/2013-26.
01/08/2013
Brasília, 30 de julho de 2013.

Ilma. Sra.
Cláudia Maria Corroia de Melo
Coordenação de Acesso aos Recursos Florestais e Recuperação de Áreas Degradadas - Corad
Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Floresta – Dbflo
IBAMA

Assunto: **Solicitação de inclusão de novo projeto no portfólio da Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético para fins de Pesquisa Científica da Embrapa (nº 002/2008)**

Senhora Coordenadora,

Atendendo às exigências estabelecidas pela Medida Provisória nº. 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, encaminhamos a presente solicitação de inclusão do projeto "**Prospecção de compostos bioativos do bioma pampa: efeito antiparasitário e mitigação de metano**" no portfólio da Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético para fins de Pesquisa Científica da Embrapa (nº 002/2008). O projeto será conduzido sob a coordenação do Dr. Alessandro Pelegrine Minho, lotado na Embrapa Pecuária Sul.

Informamos que as coletas serão realizadas nos Campos Sul Brasileiros (Bagé-RS e região).

Atenciosamente,


FÁBIO SILVA MACÊDO
Coordenadoria de Assuntos Regulatórios - CAR
Secretaria de Negócios - SNE

Em anexo:

1. Formulário para solicitação de autorização especial de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético para pesquisa científica;
2. Projeto de pesquisa para acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa científica.

ANEXO II – Carta de Aprovação – CETEA/UEDESC



CARTA DE APROVAÇÃO

O(s) projeto(s) abaixo relacionado(s):

Protocolo: 01.59.14

Título: Efeito acaricida *in vitro* de extratos de *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium buniifolium* sob larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

Coordenador/Pesquisador: Antonio Pereira de Souza

Foi(ram) analisado(s) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UDESC (CETEA/UEDESC) tendo sido **APROVADO(S)** em seus aspectos éticos e metodológicos, para utilização de animais em pesquisa, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa no Brasil.

Lages, 03 de junho de 2014.

Prof. Ubirajara Maciel da Costa
Coordenador do CETEA/UEDESC

ANEXO III – Laudo de Análise de Solo

Laudo de Análise de Solo

http://www.ufrgs.br/labsolos/labsolos.php



FACULDADE DE AGRONOMIA – DEPTO. SOLOS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES

40 anos
Serviço à Agricultura

Laudo de Análise de Solo

NOME: ALESSANDRO PELEGRINE MINHO/EMPRA DATA DO RECEBIMENTO: 27/08/2013
 MUNICÍPIO: BAGÉ DATA DA EXPEDIÇÃO:
 ESTADO: RS LOCALIDADE:

NUM	REGISTRO	ARGILA %	pH H ₂ O	Índice SMP	P mg/dm ³	K mg/dm ³	M.O. %	Al troc. cmol/dm ³	Ca troc. cmol/dm ³	Mg troc. cmol/dm ³
1	13355/24	16	4,7	5,0	3,9	31	2,7	1,7	3,0	0,8
2	13355/25	18	4,9	5,7	4,8	141	2,9	0,5	3,1	1,2
3	13355/26	14	5,3	5,8	2,3	31	2,1	0,8	3,1	1,3
4	13355/27	24	4,9	5,6	2,8	99	2,9	0,6	2,9	1,3
5	13355/28	14	5,2	6,0	36	57	2,1	0,2	5,0	1,3

Argila determinada pelo método do densímetro; pH em água 1:1; P e K determinadas pelo método Mehlich I; M.O. por digestão úmida; Ca, Mg, N, Mn e Na trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹; B-BO extraído com Ca-EDTA 500 mg L⁻¹ de P, Zn e Cu extraídos com HCl 0,1 mol L⁻¹; B extraído com água quente.

NUM	Al+H cmol/dm ³	CTC cmol/dm ³	%SAT da CTC		RELAÇÕES		
			BASES	Al	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
1	13,7	17,5	22	30,5	3,8	38	10
2	6,2	10,8	43	9,7	2,6	9	3,3
3	5,5	9,97	45	15,2	2,4	39	16
4	6,9	11,3	39	11,9	2,2	11	5
5	4,4	10,8	60	3	3,8	34	9

CTC a pH 7,0. Necessidade de cálcio para atingir pH 5,5 - calculada pelo método SMP e Al+H. Sugestão: adotar no caso de não ter sido feita calagem integrada nos últimos 3 anos e sob o sistema de cultivo convencional. No sistema plantio direto, consultar um agrônomo.

NUM	S mg/dm ³	Zn mg/dm ³	Cu mg/dm ³	B mg/dm ³	Mn mg/dm ³	Fe g/dm ³	Na mg/dm ³	OUTRAS DETERMINAÇÕES
1	0,0	0,0	0,0	0,0				
2	0,0	0,0	0,0	0,0				
3	0,0	0,0	0,0	0,0				
4	0,0	0,0	0,0	0,0				
5	0,0	0,0	0,0	0,0				

Consulte um agrônomo para obter as recomendações de adubação

NUM	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA
1	01 - ALECRIM DO CAMPO
2	02 - CARQUEJA
3	03 - ERVA LANCETA
4	04 - CHIRCA
5	05 - PICÃO PRETO

Clesio Gianello
Engº Agrº CREA 8º Reg 25.642
Chefe do Laboratório de Análises

Laboratório de Análises de Solo - Av. Bento Gonçalves, 7712 - Porto Alegre - RS - CEP 91540-000
Fones/Fax: (0xx51)3308-6023 - 3308-7457 - 3308-7459 - Email: labsolos@bol.com.br



FACULDADE DE AGRONOMIA – DEPTO. SOLOS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES

40 anos
Serviço à Agricultura