



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ATIVIDADE ACARICIDA *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS DA
CAATINGA DO NORDESTE BRASILEIRO SOBRE TELEÓGINAS DE
RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS (CANESTRINI, 1887) (Acari:
Ixodidae)**

Giuliana Amélia Freire Pereira Duarte

Patos-PB

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ATIVIDADE ACARICIDA *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS DA
CAATINGA DO NORDESTE BRASILEIRO SOBRE TELEÓGINAS DE
RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS (CANESTRINI, 1887) (Acari:
Ixodidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como uma das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Doutor.

Doutoranda: Giuliana Amélia Freire Pereira Duarte

Orientadora: Profa. Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde

Patos-PB
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

D812a Duarte, Giuliana Amélia Freire Pereira

Atividade acaricida *in vitro* de plantas medicinais da caatinga do nordeste brasileiro sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) / Giuliana Amélia Freire Pereira Duarte. – Patos, 2016. 66f.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

“Orientação: Profa. Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde”

Referências.

1. Extratos. 2. Carrapaticidas. 3. Parâmetros biológicos. 4. Fêmeas ingurgitadas. 5. Carrapato. I. Título.

..... CDU 576.8:619

Dedico

A *Deus*, por me permitir a vida.

A minha mãe, *Lourdes*, minha guerreira, pelo apoio e amor incondicionais.

Agradeço

A minha amada mãe, **Lourdes**, por não ter me deixado desistir, pelo apoio desde sempre, pelo grande exemplo de vida e perseverança. Te amo sempre e pra sempre.

Ao meu amado **esposo, Márcio**, meu melhor amigo. A todo apoio, paciência e amor, principalmente paciência. Meu bálsamo nos dias difíceis.

Ao meu **filho, Bernardo**, ainda no ventre, mas já muito amado. A benção de Deus em nossas vidas.

A toda minha **família, Freire e Duarte**, especialmente minhas irmãs, *Giovanna e Gioconda*, cunhados, *Jader, Artur e Laércia*, sobrinhos, *Júnior, Caroline, Jonas, Beatriz, Myllena, Bruno, Vinícius e Theo*, sogros, *Laércio e Célia* e meus compadres *Myllânia e Lucas*. A todos do **sítio Siqueira** pelo apoio e amor.

As **amigas/irmãs** Giovanna, Maíza, Gabriella, Tereza, Petrushka, Ivana, Kaline, Roseane, Valéria, Lizziane, Julia, Kelly pelo amor e amizade.

Aos meus **amigos/companheiros** inspetores na Vigilância Sanitária Municipal de Patos Aline, Fabrício, Luedja, Saula, Silvia e João Marcelo. O trabalho se torna muito mais leve por causa da nossa amizade e cumplicidade.

A **Universidade Federal de Campina grande**, Campus de Patos-PB, pelos longos anos de ensinamentos intelectual e pessoal, e oportunidade de me tornar uma profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**, da Universidade Federal de Campina Grande, pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

A orientadora, professora **Ana Célia Rodrigues Athayde**, pelo apoio, consideração, amizade e ensinamentos, os quais levarei para toda vida.

Aos membros da **banca examinadora**: Ana Célia Rodrigues Athayde, Wilson Wouflan Silva, Onaldo Guedes Rodrigues, Valéria Medeiros de Mendonça Costa e Amélia Lizziane Leite Duarte, por terem aceitado o convite e pelas valiosas sugestões.

Aos **amigos** colaboradores para a realização deste trabalho, Micheline, Maria do Carmo, Ana Raquel, Vinícius Longo e professor Sérgio Santos. Obrigada pela ajuda e apoio sempre que precisei.

Aos colegas **de doutorado** pela força, amizade e incentivo e aos **colegas de mestrado em zootecnia**, pelos momentos vividos, amizade, apoio e carinho.

A **minha turma graduação** em Medicina Veterinária (formandos 2008.2), por tudo que vivemos juntos, companheirismo, amizade até nos dias atuais.

A todos os **professores** da Universidade de Campina Grande/Campus de Patos-PB, em especial a Ana Célia, Wouflan, Onaldo, Olaf, Ivonete, Moraes, Marcílio, Aderbal, Rosângela, Almir, Albério, Graça Xavier, Pedro Isidro, Patricia, Jucelin, Bonifácio, Norma, Márcia Melo, e Nara, por tudo o que me ensinaram, com qualidade e competência.

Ao **Secretário da Pós-graduação em Zootecnia** (Ari Cruz), o **Secretário da Pós-graduação em Medicina Veterinária** (Jonas) por todo apoio e informações.

Aos **Funcionários da UFCG Campus de Patos-PB** por tudo que fizeram por mim.

Enfim, a **TODOS** que participaram direto ou indiretamente da realização de um grande sonho. Agradeço o apoio, a paciência e o desprendimento que todos tiveram comigo para a conclusão deste trabalho. Sem cada um de vocês isto não teria sido possível.

Muito obrigada!

DUARTE, Giuliana Amélia Freire Pereira. “**Atividade acaricida *in vitro* de plantas medicinais da caatinga do Nordeste brasileiro sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae)**”. Patos, PB: UFCG, 2016. 66p. (Tese – Doutorado em Medicina Veterinária)

RESUMO GERAL

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito *in vitro* dos extratos etanólicos do *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro), *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo) e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (alfazema brava) comparando-os com carrapaticidas comerciais mais usados sobre parâmetros biológicos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). Fêmeas ingurgitadas deste carrapato foram coletadas diretamente do corpo de bovinos naturalmente infestados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos. Estes animais não receberam tratamento por acaricidas por pelo menos 50 dias antes da coleta dos carrapatos. As fêmeas de *R. (B.) microplus* foram colocadas em recipientes plásticos e imediatamente levadas para o Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais (LAMPA) onde se seguiu para a experimentação *in vitro* que consistiu na realização de testes de imersão de fêmeas ingurgitadas. Foram preparadas por planta três diluições para se obter as concentrações de 5%, 10% e 25%. Seis grupos controles foram preparados, um contendo água destilada (controle negativo), outro contendo etanol 96% e mais quatro grupos utilizando acaricidas comerciais diluídos em água destilada na forma proposta pelo fabricante, sendo estes, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% e associação de ethion 60% e cipermetrina 8% (controles positivos). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Foram avaliados o percentual de redução de oviposição (RO), a redução de taxa de eclosão (RE) e o percentual de controle (PC). Os extratos de todas as plantas na concentração 25% demonstraram eficácia acaricida *in vitro*, semelhante ao grupo amitraz, melhor resultado dentre os grupos de carrapaticida químico. Os grupos controle com água destilada e etanol não diferiram entre si, pressupondo que a ação acaricida deve-se, possivelmente, aos compostos presentes nas plantas avaliadas.

Palavras-chave: extratos, carrapaticidas, parâmetros biológicos, fêmeas ingurgitadas, carrapato

DUARTE, Giuliana Amélia Freire Pereira. “**Acaricide in vitro activity of medicinal plants of the Brazilian Northeast Caatinga on engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae)**”. Patos, PB: UFCG, 2016. 66p. (Thesis - Doctor of Veterinary Medicine)

GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* acaricide efficiency of ethanolic extracts from *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro), *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo) and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (alfazema brava) comparing them with some used commercial acaricides on biological parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). Engorged ticks were collected from naturally infested cattle attended in Veterinary Hospital from Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos. These animals received no treatment for acaricide for at least 50 days prior to collection of ticks. Females of *R. (B.) microplus* were placed in plastic containers and immediately taken to the Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais (LAMPA) where it went to *in vitro* experimentation consisting on the immersion tests of engorged females. It were prepared from each plant three solutions to give concentrations of 5%, 10% and 25%. Six control groups were prepared, one containing distilled water (negative control), the other containing 96% ethanol and four groups using commercial acaricides diluted in distilled water in the manner proposed by the manufacturer, the latter being, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% and an association of ethion 60% and cipermetrina 8% (positive controls). All treatments were made at triplicate. Were evaluated the percentage of oviposition reduction (RO), the hatching rate reduction (RE) and the percentage of control (PC). The extracts of all the plants in the 25% concentration showed acaricidal efficacy *in vitro*, similar to amitraz group, the best result between the chemical insecticide groups. The control groups with distilled water and ethanol did not differ, assuming that the acaricide action is due, probably, to the compounds present in plants evaluated.

Keywords: extracts, acaracides, biological parameters, Engorged ticks, ticks

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
GENERAL ABSTRACT	7
LISTA DE TABELAS	10
INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 1	17
Efeito acaricida <i>in vitro</i> do extrato etanólico das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> Baill. sobre teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	18
Resumo	18
Abstract	18
Introdução	19
Material e métodos	20
Resultados e discussão	23
Conclusões	27
Referências	27
CAPÍTULO 2	30
Eficácia do extrato etanólico do caule de <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill. sobre teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	31
Abstract	31
Resumo	32
Introdução	33
Material e métodos	33
Resultados e discussão	36
Conclusões	38
Referências	38
CAPÍTULO 3	43
Efeito do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. sobre teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	44
Resumo	44
Abstract	45
Introdução	45
Material e métodos	46

Resultados e discussão	49
Conclusões	52
Referências	53
CONCLUSÕES GERAIS	56
ANEXOS	57
Normas e site da revista onde foram submetidos os capítulos	57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da oviposição (RO) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Croton blanchetianus* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 23
- Tabela 2. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Croton blanchetianus* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 24
- Tabela 3. Mediana e desvio interquartílico do percentual de controle (PC) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Croton blanchetianus* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 24
- Tabela 4. Mediana e desvio interquartílico do índice nutricional (IN), índice de produção de ovos (IPO) e eficiência reprodutiva (ER) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Croton blanchetianus* Baill, carrapaticidas comerciais e grupos controles

CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *J. mollissima* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 41
- Tabela 2. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *J. mollissima* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 41
- Tabela 3. Mediana e desvio interquartílico do percentual de controle (PC) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *J. mollissima* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 42
- Tabela 4. Mediana e desvio interquartílico do índice nutricional (IN), índice de produção de ovos (IPO) e eficiência reprodutiva (ER) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *J. mollissima* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 42

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da oviposição (RO) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 49

Tabela 2. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 50

Tabela 3. Mediana e desvio interquartílico do percentual de controle (PC) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles 51

Tabela 4. Mediana e desvio interquartílico do índice nutricional (IN), índice de produção de ovos (IPO) e eficiência reprodutiva (ER) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes concentrações de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., quatro carrapaticidas comerciais e grupos controles 52

INTRODUÇÃO GERAL

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, e é o principal ectoparasita de bovinos no Brasil e em todos os países tropicais e subtropicais (LEMPEREUR et al., 2010).

Há décadas os carrapatos vêm causando danos à pecuária. No Brasil, Horn (1983) estimou que os prejuízos causados pelo carrapato *R. (B.) microplus* chegavam a 968 milhões de dólares. Posteriormente, este valor aumentou para dois bilhões de dólares anualmente (GRISI et al., 2002). Atualmente este valor aumentou para 3,24 bilhões de dólares anual (GRISI et al., 2014).

Estas perdas são devidas aos prejuízos nos desempenhos produtivo e econômico dos sistemas de produção de leite e de carne, podendo refletir na cadeia produtiva desses dois produtos, além de custos com o controle envolvendo carrapaticidas, instalação e mão-de-obra, e daqueles detectados durante o processo de industrialização das peles, cuja qualidade é prejudicada pela ação do carrapato (AGNOLIN et al., 2014). Além disso, os carrapatos estão associados às doenças bacterianas, virais ou parasitárias como anaplasmoses e babesioses, as quais podem causar redução na produção e até induzir a morte do animal (OLIVO et al., 2013).

Os compostos arsenicais foram os primeiros acaricidas utilizados e, desde a década de 30, registram-se casos de resistência a esse princípio ativo. Na década de 50 os organoclorados e organofosforados começaram a ser usados. Mais tarde iniciou-se o uso das formamidinas e, logo após, o uso dos piretróides sintéticos, devido à existência de populações de carrapatos resistentes aos princípios ativos (PEREIRA, 1982).

Os carrapaticidas tem sido o principal meio de controle de *R. (B.) microplus*, porém a dependência dos produtos químicos, aliado ao mal uso destes produtos, levou a um aumento na pressão de seleção de populações de carrapatos resistentes às formulações comerciais de carrapaticidas presentes no mercado (DANTAS et al., 2016). Segundo critérios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), produtos para o controle do carrapato devem apresentar pelo menos 95% de eficácia (BRITO et al., 2011; KRAWCZAK et al., 2011).

A resistência de carrapatos aos grupos químicos já foi descrita em vários Estados brasileiros: no Rio Grande do Sul, aos organofosforados, ao amitraz e às lactonas macrocíclicas (MARTINS e FURLONG, 2001; VARGAS et al., 2003). Em São Paulo e

Rio de Janeiro, aos piretróides sintéticos, por Pereira e Lucas (1987). Silva et al., (2005) na Paraíba e Faustino et al., (1997) em Pernambuco também verificaram resistência à cipermetrina.

Além do aparecimento da resistência aos carrapaticidas há uma crescente preocupação mundial por alimentos sem resíduos químicos para consumo humano e diminuição da aplicação e de resíduos deixados no ambiente. De acordo com Uilenberg (1996), inseticidas e acaricidas provocam certo grau de contaminação ambiental, sendo prejudiciais à vida aquática.

Diante deste quadro de preocupação com a resistência, prejuízo econômico e com o comprometimento da saúde humana e conservação ambiental, novas alternativas de controle vêm sendo estudadas (SAMISH et al., 2000; KOSCHORRECK et al., 2002).

Os óleos essenciais de plantas, sobretudo nas regiões tropicais, apresentam atividade inseticida, podendo ser repelente, ovicida, larvicida, além de inibirem a alimentação, o crescimento e a oviposição. Muitos dos ingredientes ativos presentes nos óleos são metabólitos secundários secretados pelas plantas na defesa química contra artrópodes, patógenos e microrganismos (SILVA FILHO et al., 2013).

O *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro) e *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo) pertencentes à família Euphorbiaceae e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (alfazema brava) pertencente à família Lamiaceae tem em seus óleos essenciais constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcaloides, com atividades biológicas comprovadas (HARLEY et al., 2004; DEVAPPA et al., 2011; MWINE e VAN DAMME, 2011).

Diante deste quadro o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito *in vitro* dos extratos etanólicos do *C. blanchetianus* (marmeleiro), *J. mollissima* (pinhão bravo) e *H. suaveolens* (alfazema brava) comparando-os com carrapaticidas comerciais comumente usados sobre parâmetros biológicos do *R. (B.) microplus*.

REFERÊNCIAS

AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J.; PARRA, C. L. C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogonflexuosus*Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. Rev. Bras. Pl. Med., v.16, n.1, p.77-82, 2014.

BRITO, L.G.; BARBIERI, F.S.; ROCHA, R.B. et al. Evaluation of the Efficacy of Acaricides Used to Control the Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*, in Dairy Herds Raised in the Brazilian Southwestern Amazon. Vet. Med. Int., v.2011, p.1-6, 2011.

DANTAS, A.C.S., ARAUJO, A.C., PACHECO, A.G.M. et al. Acaricidal activity of *Amburanacearensis* on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cienc. Rural v.46, p.536-541, 2016.

DEVAPPA, R.K., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. Jatropha Diterpenes: a Review. Journal Am Oil Chem Soc. v.88, p. 301-322, 2011.

FAUSTINO, M.A.; SANTANA, V.L.A.; LIMA, M.M.; ALVES, L.C. Avaliação “in vitro” da sensibilidade de cepas de *Boophilus microplus* do Estado de Pernambuco a produtos carrapaticidas através de testes de imersão de fêmeas ingurgitadas. Rev. Bras. Parasitol. Vet. v. 6, n. 2, p. 485, 1997.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. Hora Vet. v. 21, n.125, p.8-10, 2002.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol., v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HARLEY, R. M. et al. Labiatae. In: KUBITZKI, K.; KADEREIT, J. W. Flowering Plants, dicotyledones: Lamiales except Acanthaceae including Avicenniaceae. The families and genera of vascular plants; 7. Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004, 484p.

HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil. Boletim de Defesa Sanitária Animal, n. 01, p. 15, 1983.

KOSCHORRECK, J.; KOCH, C. & RONNEHRT, I. Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU – a regulatory perspective. *Toxicol. Lett.*, v. 131, p. 117-124, 2002.

KRAWCZAK, F.S.; BUZATTI, A.; PIVOTO, F.L. et al. Atividade acaricida de extratos de folhas de *Sambucus australis* Schlttdl (Caprifoliaceae) a 2% sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Cienc. Rural*, v.41, p.2159-2163, 2011.

LEMPEREUR, L.; GEYSEN, D.; MADDER, M. Development and validation of a PCR–RFLP test to identify African *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Act Trop.*, v.114, p.55-58, 2010.

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.*, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.

MWINE, T.J., and VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J. Med. Plants Res.*, v. 5, p. 652- 662, 2011.

OLIVO, C.J.; AGNOLIN, C.A.; PARRA, C.L.C. et al. Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbiacitriodora*) no controle do carrapato bovino. *Cienc. Rural*, v.43, p.331-337, 2013.

PEREIRA, M.C. *Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica. Rio de Janeiro: Químio Divisão Veterinária. p. 167, 1982.

PEREIRA, M.C.; LUCAS, R. Estudos *in vitro* da eficiência de carrapaticidas em linhagem de *Boophilus microplus* proveniente de Jacareí, SP, Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. USP*, v. 24, n.1, p. 7-11, 1987.

SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Mortality rate of adult ticks due to infection by entomopathogenic nematodes. *J. of Parasitol.*, v. 4 p. 679-684, 2000.

SILVA FILHO, M.L.; SILVA, L.B.; FERNANDES, R.M.; LOPES, G.S. Efeito do extrato aquoso e etanólico do angico preto sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.65, n.3, p.637-644, 2013.

SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R.; ARAÚJO, G.M.B.; SANTOS, V.D.; NETO, A.B.S. Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. Agropecu. Cient. Semi-árido, v. 01, p.59-62, 2005.

UILENBERG, G. Integrated control of tropical animal parasitoses. Trop. Anim. Health Product., v.28, p.257-265, 1996.

VARGAS, M.S.; CÉSPEDES, N.S.; SÁNCHEZ, H.F. et al. Avaliação *in vitro* de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente a amitraz. Ciênc. Rural, v.33, n. 4, p.737-742, 2003.

CAPÍTULO 1

EFEITO ACARICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
CROTON BLANCHETIANUS BAILL. SOBRE TELEÓGINAS DE *RHIPICEPHALUS*
(*BOOPHILUS*) *MICROPLUS*

(Manuscrito submetido para avaliação na Revista Arquivo Brasileiro de Medicina
Veterinária e Zootecnia)

**Efeito acaricida *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus*
Baill. sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

***In vitro* acaricidal activity of ethanol extract of the leaves of *Croton blanchetianus*
Baill. against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Giuliana Amélia Freire Pereira Duarte^{1*}; Michelline Nicolle Damião Lacet de Barros¹;
Maria do Carmo de Medeiros²; Ana Raquel Carneiro Ribeiro³; Ana Célia Rodrigues
Athayde¹; Sérgio Santos Azevedo¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos, PB, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Centro de saúde e Tecnologia Rural- CSTR- Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos, PB, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFRN, Natal, RN, Brasil

*Autor para correspondência: giuliana_medvet@hotmail.com

Resumo

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é responsável por grandes prejuízos na bovinocultura. O método mais comum para controle deste ectoparasita são os acaricidas que ao longo dos anos o uso errático destes produtos ocasionou o desenvolvimento de linhagens de carrapatos resistentes aos produtos químicos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de extratos etanólicos das folhas do *Croton blanchetianus* Baill comparando-os com carrapaticidas comerciais frequentemente usados sobre parâmetros biológicos do *R. (B.) microplus*. Para os percentuais de redução de oviposição (RO), redução de taxa de eclosão (RE) e de controle (PC) o extrato a 25% mostrou-se eficiente em torno de 100% assemelhando-se a alguns dos carrapaticidas testados, deltametrina e ao amitraz e superiores aos demais, cipermetrina e associação de ethion 60% e cipermetrina 8%. Portanto o extrato etanólico a 25% teve efeito carrapaticida podendo ser utilizado como alternativa no controle do *R. (B.) microplus*.

Palavras-chave: bioinseticida, carrapato, bovinos

Abstract

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is responsible for major losses in cattle breeding. The most common control measure against this ectoparasite are the acaricides that over the years the erratic use of these products led to the development of resistant strains of ticks to chemicals. In this sense, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect of ethanolic extracts from the leaves of *Croton blanchetianus* Baill comparing them with frequently used commercial acaricides on biological parameters of *R. (B.) microplus*. For the percentage of oviposition reduction (RO), hatching rate reduction (RE) and control (PC) the extract by 25% was efficient about 100% resembling some of tested acaricide, deltametrina and amitraz and superior to others, cipermetrina and an association of ethion 60% and cipermetrina 8%. Therefore the ethanolic extracts by 25% was effective insecticide and can be used as an alternative in the control of *R. (B.) microplus*.

Keywords: bioinsecticide, tick, cattle

Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) é o principal ectoparasita de bovinos no Brasil e em todos os países tropicais e subtropicais. No Brasil, Horn (1983) estimou que os prejuízos causados pelo carrapato *R. (B.) microplus* chegavam a 968 milhões de dólares. Em estudos posteriores realizados por Grisi (2002) esses valores atingiram a cifra de 2 bilhões de dólares anual. Atualmente este valor aumentou para 3,24 bilhões de dólares anual (Grisi et al., 2014). Além disso, os carrapatos são associados também à transmissão da *Babesia* spp e *Anaplasma marginale* para bovinos (FAO, 2004).

Os carrapaticidas químicos tem sido o principal meio de controle de *R.(B.) microplus*, porém a dependência dos produtos químicos, aliado ao mau uso destes produtos, levou a um aumento na pressão de seleção de populações de carrapatos resistentes às formulações comerciais de carrapaticidas presentes no mercado (Furlong et al., 2007; Labruna, 2008). Além do aparecimento da resistência parasitária aos carrapaticidas há uma crescente preocupação mundial por alimentos sem resíduos químicos para consumo humano. Essa inquietação também se estende a diminuição da aplicação e de resíduos deixados no ambiente por esses produtos. Diante deste quadro, inseticidas alternativos podem ser obtidos a partir de vários compostos isolados de plantas,

reduzindo o desenvolvimento dos parasitas, sua sobrevivência e reprodução (Giglioti et al., 2011), além de serem potencialmente menos tóxicos para os animais e mais seguros para o meio ambiente (Albuquerque et al., 2007).

De acordo com Mwine e Van Damme (2011), espécies da família Euphorbiaceae associadas a muitos compostos químicos demonstraram sua relevância como pesticidas naturais. Os óleos essenciais e muitos de seus constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides apresentam propriedades terapêuticas comprovadas (Randau et al., 2002). *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro) é rica em diterpenos com atividades biológicas incluindo anti-inflamatória e antimicrobiana (Marino et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do *C. blanchetianus* em diferentes concentrações comparando-os com carrapaticidas comerciais mais usados sobre parâmetros biológicos do *R.(B) microplus*.

Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande recebendo o número 107/2014.

Foi utilizada para coleta e herborização do material vegetal a metodologia segundo Cartaxo et al. (2010). As folhas do marmeleiro foram coletadas no município de Patos, as margens da BR 230, com latitude de 6°58'29"S e longitude 37°20'45"W. A exsiccata da planta encontra-se depositada no Herbário do CSTR da UFCG, Patos, sob o número 4023.

Para confecção do extrato etanólico, utilizou-se a folha de *C. blanchetianus* (marmeleiro), sendo empregada a metodologia descrita por Matos (2000). Utilizou-se etanol 96% como solvente orgânico e após 96h de extração a frio, foram realizadas filtrações simples e os extratos mantidos à temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) para evaporação total do solvente e obtenção do extrato líquido, em seguida procedeu-se a concentração do extrato em evaporador rotativo a temperatura de 45°C.

Três diluições foram preparadas para se obter as concentrações de 5% (M5), 10% (M10) e 25% (M25). Seis grupos controles foram preparados, um contendo água destilada (controle negativo), outro contendo etanol 96% e mais quatro grupos utilizando acaricidas comerciais diluídos em água destilada na forma proposta pelo fabricante,

sendo estes, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% e associação de ethion 60% e cipermetrina 8% (controles positivos).

Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram coletadas diretamente do corpo de bovinos naturalmente infestados como preconiza Gonzales (1993) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos. Estes animais não receberam tratamento por acaricidas por pelo menos 50 dias antes da coleta dos carrapatos.

Após a coleta, as fêmeas de *R. (B.) microplus* foram colocadas em recipientes plásticos com circulação de ar e imediatamente levadas para o Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais (LAMPA) onde foram higienizadas, com uma passagem em água deionizada autoclavada e outra em hipoclorito de sódio a 4% por três minutos e finalmente em água deionizada autoclavada. O excesso foi retirado com papel filtro e posteriormente observadas sob microscópio estereoscópico para confirmação da sua integridade biológica e morfológica.

As fêmeas foram pesadas individualmente em balança analítica, para haver separação homogênea dos grupos tratados e controles. Os bioensaios foram realizados no mesmo dia em que os carrapatos foram coletados.

As fêmeas foram separadas em grupos de 10 usando três repetições para cada tratamento. Os testes de imersão foram realizados de acordo com o descrito por Drummond et al. (1973) como se segue, as fêmeas ingurgitadas foram imersas por cinco minutos em quatro mL da solução de cada grupo, posteriormente foram fixadas individualmente com o auxílio de esparadrapo nas placas de Petri e identificadas com um número, sendo acondicionadas em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%).

As fêmeas foram observadas a cada 24 horas até a última morte, também foram feitas anotações da data de postura inicial e postura final, data da morte e aspecto pós-morte.

As posturas foram separadas diariamente para registro do último dia de postura de cada fêmea, com pesagem da quenógina após três dias do período de postura. A postura total de cada fêmea foi pesada, identificada, acondicionada em tubo de ensaio tampado com algodão e incubado em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%.

Depois de 15 dias de incubação as posturas foram revisadas diariamente, para avaliar a eclosão da primeira larva e o período de incubação dos ovos de cada fêmea. Para obter-se o percentual de eclosão foi feita a estimativa visual da eclosão de larvas de cada massa de ovos de acordo com o descrito por Amaral (1993) com uma modificação: os

tubos de ensaio contendo as larvas e/ou ovos foram colocados em câmara climatizada a 40°C por 24 horas no intuito de matar as larvas e facilitar a contagem.

Os dados obtidos foram usados para determinar o percentual da redução da oviposição (RO) e percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de acordo com as equações descritas por Gonzales et al. (1993). Para estimativa de reprodução (ER) e cálculo do percentual de controle (PC) foram utilizadas as equações descritas por Drummond et al. (1973). Os cálculos para o índice de produção de ovos (IPO) e índice nutricional (IN) foram realizados segundo a metodologia de Bennett (1974).

$$RO = \frac{\text{massa de ovos (g)} - \text{massa de ovos tratado (g)}}{\text{massa de ovos controle (g)}} \times 100$$

$$RE = \frac{\text{taxa de eclosão controle} - \text{taxa de eclosão tratado}}{\text{taxa de eclosão controle}} \times 100$$

$$ER = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)} \times \text{taxa de eclosão}}{\text{peso inicial da fêmea (g)}} \times 20.000 *$$

*Constante que indica o número de ovos presentes em 1g de postura

$$PC = \frac{ER \text{ grupo controle} - ER \text{ grupo tratado}}{ER \text{ grupo controle}} \times 100$$

$$IPO = \frac{\text{massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)}} \times 100$$

$$IN = \frac{\text{massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)} - \text{peso da quenógina (g)}} \times 100$$

Os valores de todos os parâmetros correspondem às médias obtidas através do valor de cada parâmetro, de cada unidade experimental, de cada grupo.

Como todos os grupos apresentaram distribuição não normal, na estatística descritiva foram calculadas a mediana e o desvio interquartilico para cada parâmetro biológico, e para a comparação dos grupos (tratamentos) com relação aos parâmetros biológicos analisados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações

múltiplas com o teste de Nemenyi. O nível de significância adotado foi de 5%, e as análises foram feitas com o programa estatístico BioEstat 5.03.

Resultados e Discussão

O percentual da redução da oviposição (RO) variou entre os diferentes tratamentos testados. O melhor resultado obtido foi observado na maior concentração do marmeleiro utilizada (M25) que foi de 100%. Este resultado foi superior inclusive aos dos carrapaticidas comerciais (Tab. 1).

Tabela 1. Mediana e desvio interquartilico do percentual da redução da oviposição (RO) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Croton blanchetianus* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	RO Álcool	RO Água
M 5	1,08 ± 27,26a	12,46 ± 18,69a
M 10	48,35 ± 89,00b	50,83 ± 77,34b
M25	100,00 ± 0,00bc	100,00 ± 0,00bc
Deltametrina	56,86 ± 73,09bd	55,94 ± 67,99bd
Cipermetrina	34,98 ± 79,54bde	28,59 ± 73,65bde
Amitraz	90,52 ± 64,54bf	90,77 ± 55,09bf
Ethion + Cipermetrina	38,30 ± 17,34bdeg	37,64 ± 30,14bdg

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. M5: diluição 5% marmeleiro; M10: diluição 10% marmeleiro; M25: diluição 25% marmeleiro.

Efeitos semelhantes foram observados por Silva et al. (2014) avaliando o efeito dos extratos hidroalcoólicos da casca do *C. blanchetianus* e da folha de *Nicotiana glauca* sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus* no estado de Pernambuco. Giglioti et al. (2011) estudando o *Azadirachta indica* (neem) sobre o *R. (B.) microplus* verificaram 82,67% de redução na oviposição utilizando o extrato da espécie citada numa concentração de 12,80%.

O percentual da redução da taxa de eclosão (RE) e percentual de controle (PC) demonstraram resultados estatisticamente semelhantes entre o tratamento M25 e os carrapaticidas comerciais deltametrina e amitraz que foi de 100%, se mostrando superiores aos demais tratamentos (Tab. 2 e 3).

Tabela 2. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Croton blanchetianus* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	RE Álcool	RE Água
M 5	0,00 ± 34,74a	0,00 ± 19,12a
M 10	64,70 ± 66,66b	66,66 ± 75,00b
M25	100,00 ± 0,00bc	100,00 ± 0,00bc
Deltametrina	100,00 ± 79,41b	100,00 ± 75,00bd
Cipermetrina	11,76 ± 33,92a	5,55 ± 31,01a
Amitraz	100,00 ± 89,47b	100,00 ± 97,36b
Ethion + Cipermetrina	29,41 ± 67,98ad	34,52 ± 74,45ae

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. M5: diluição 5% marmeleiro; M10: diluição 10% marmeleiro; M25: diluição 25% marmeleiro.

Resultados semelhantes foram observados por Giglioti et al. (2011) que obtiveram 88% na taxa de redução da taxa de eclosão na diluição a 10% do neem. Abdel-Shafy e Zayed (2002) utilizando extrato comercial de neem a 12,8% em fêmeas ingurgitadas de *Hyalomma anatolicum excavatum* observaram uma redução na taxa de eclosão de até 60%. Diferentemente do que foi encontrado por Almança et al. (2013) que não observaram interferência do extrato do *Chenopodium ambrosioides* sobre a eclosão dos ovos do *R. (B.) microplus*.

Os resultados do PC mostraram-se superiores aos encontrados por Silva et al. (2014) que obtiveram 31,87% de eficiência com o extrato *C. blanchetianus* numa concentração de 200 mg/ml e Giglioti et al. (2011) que relataram 94,67% com extrato do neem numa concentração a 10%.

Tabela 3. Mediana e desvio interquartílico do percentual de controle (PC) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Croton blanchetianus* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	PC Álcool	PC Água
M 5	16,70 ± 46,67a	19,24 ± 37,14a
M 10	73,74 ± 438,75a	45,01 ± 616,46a
M25	100,00 ± 0,00b	100,00 ± 0,00b
Deltametrina	100,00 ± 68,78b	100,00 ± 56,71bc
Cipermetrina	7,71 ± 196,97a	6,66 ± 141,35a
Amitraz	100,00 ± 86,58b	100,00 ± 89,53b
Ethion + Cipermetrina	47,72 ± 75,05a	48,84 ± 77,07a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. M5: diluição 5% marmeleiro; M10: diluição 10% marmeleiro; M25: diluição 25% marmeleiro.

A legislação pertinente para a comercialização de carrapaticidas no país preconiza o valor mínimo de 95% para que um tratamento seja considerado eficaz (BRASIL, 1990), portanto, apenas os grupos M25, deltametrina e amitraz seriam considerados eficazes.

Com relação ao índice nutricional (IN) o grupo M25 diferiu estatisticamente dos demais grupos, exceto com os grupos deltametrina e amitraz. A eficiência reprodutiva (ER) também demonstrou resultado estatisticamente semelhante entre os grupos M25, deltametrina e amitraz, diferindo dos demais grupos.

No índice de produção de ovos (IPO) o tratamento M25 mostrou o menor resultado em relação a todos os outros tratamentos (Tab. 4).

Tabela 4. Mediana e desvio interquartilico do índice nutricional (IN), índice de produção de ovos (IPO) e eficiência reprodutiva (ER) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Croton blanchetianus* Baill, quatro carrapaticidas comerciais e grupos controles

Tratamento	IN	IPO	ER
M 5	340,12 ± 77,81a	49,48 ± 13,72a	819268 ± 309961a
M 10	217,87 ± 403,58a	28,11 ± 51,63a	1139000 ± 4014000a
M25	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b
Deltametrina	156,00 ± 267,25b	32,84 ± 53,22bd	0,00 ± 579970b
Cipermetrina	279,00 ± 459,50a	51,01 ± 49,62ac	827705 ± 999412a
Amitraz	11,84 ± 201,87b	6,28 ± 53,00bd	0,00 ± 907666bc

Ethion + Cipermetrina	317,66 ± 252,84a	48,68 ± 12,95a	548274 ± 607542abd
Água destilada	337,80 ± 161,36ac	59,09 ± 6,77bdef	978240 ± 232194ae
Álcool	347,50 ± 42,18ac	56,09 ± 5,84bdef	954597 ± 274845af

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. M5: diluição 5% marmeleiro; M10: diluição 10% marmeleiro; M25: diluição 25% marmeleiro.

Ndumu et al. (1999) estudando o carrapato *Amblyomma variegatum* observaram que dois fatores influenciaram a eficácia de extrato do neem em seu estudo: tempo de exposição ao extrato e a sua concentração, ou seja, de acordo com estes autores quanto mais tempo exposto e mais alta a concentração do extrato mais eficaz este será. Silva Filho et al. (2013) também observaram um aumento na mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* em função da concentração e do tempo de exposição aos resíduos dos extratos etanólico e aquoso de *Anadenanthera macrocarpa* (angico vermelho). No presente estudo o tempo de exposição das fêmeas aos tratamentos foi o mesmo, portanto, só observaram-se os efeitos das diferentes concentrações do extrato.

Com estes resultados pode-se supor que o efeito acaricida seja dependente da concentração do extrato e que o M25 teve efeito tóxico e inibiu a reprodução do parasita assemelhando-se com os carrapaticidas amitraz e deltametrina. Righi et al. (2013) usando extrato da folha de *Croton sphaerogynus* observaram a presença de diterpenos demonstrando uma alta atividade acaricida desta espécie em larvas de *R. (B.) microplus*. Seigler (1994) em seu estudo afirma que as espécies pertencentes à família Euphorbiaceae apresentam propriedades antiparasitárias.

Não houve diferença significativa entre os grupos controle com água destilada e álcool para os parâmetros ER, IPO, IN, peso da massa de ovos, taxa de eclosão e alteração do peso da fêmea. O que pressupõe que a ação sobre os parâmetros biológicos dos carrapatos foi devido aos componentes da planta. Buzatti et al. (2011) ao avaliar a atividade acaricida *in vitro* de extratos vegetais de *Glechon spathulata* (manjeroninha do campo) sobre teleóginas de *R. (B.) microplus* observaram que o controle etanol a 70% não interferiu no peso da massa de ovos das teleóginas, mas reduziu a eclodibilidade quando comparado ao controle água destilada. Ao avaliar a sensibilidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus* a solventes Chagas et al. (2003) observaram que apenas o etanol 100% causou mortalidade. Segundo esses autores, o

etanol é considerado de baixa toxicidade, corroborando com esta pesquisa onde não foi observada interferência do álcool na biologia das fêmeas.

Conclusão

O extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* Baill na concentração de 25% foi 100% eficiente no controle *in vitro* do carrapato bovino, portanto, podendo ser uma ferramenta viável no controle de *R. (B.) microplus*. A eficiência do extrato da planta foi semelhante ao de alguns dos carrapaticidas testados (amitraz e deltametrina), o que faria de seu uso um fator importante para redução do uso de compostos químicos no controle de ectoparasitas.

Referências

- ABDEL-SHAFY, S. and ZAYED, A.A. In vitro acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). Vet. Parasitol., v.106, p.89–96, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P., MEDEIROS, P.M., ALMEIDA, A.L.S. et al. Medicinal plants of the caatinga (Semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. J. Ethnopharmacol., v. 114, p.325–354, 2007.
- ALMANÇA, C.C.J.; POZZATTI, P.N.; CASAGRANDE, F.P. et al. Eficácia *in vitro* de extratos de *Chenopodium ambrosioides* sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Arq. Inst. Biol., v.80, n.1, p.43-49, 2013.
- AMARAL, N.K. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Rev. Bras. Parasitol. Vet. v. 2, p.144–151, 1993.
- BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. Acar., v.16, p.52-61, 1974.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 90, de 04 dezembro 1989. Normas para produção e utilização de produtos antiparasitários. Diário Oficial da União, 22 jan., seção 1, coluna 2, 1990.
- BUZATTI, A.; KRAWCZAK, F.S.; PIVOTO, F.L. et al. Atividade acaricida *in vitro* de *Glechon spathulata* Benth. sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ciênc. Rural, v.41, n.10, p.1813-1817, 2011.

- CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* v.131, p.326-342, 2010.
- CHAGAS, A.C.S.; LEITE, R.C.; FURLONG, J. et al. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciênc. Rural*, v.33, n.1, p.109-114, 2003.
- DRUMMOND, R.O.; ERNST, S.E.; TREVINO, J.L. et al. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. *J Econ Entomol.*, v. 66, p.130- 133, 1973.
- FAO. Ticks: acaricide resistance: diagnosis management and prevention. In: Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants. FAO Animal Production and Health Division. Rome, 2004.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. & PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?, *Controle estratégico do carrapato dos bovinos. Hora Vet.*, v. 27, p.1-7, 2007.
- GIGLIOTI, R.; FORIM, M.R.; OLIVEIRA, H.N. et al. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.*, v.181, p.309-315, 2011.
- GONZALES, J.C., MUNIZ, R.A., FARIAS, A. et al. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. *Vet. Parasitol.*, v.49, p.107–119, 1993.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.*, v. 21, p.8-10, 2002.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil. *Boletim de Defesa Sanitária Animal*, 1983. 15p.
- LABRUNA, M. B. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p. 15-56. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET, 169p, 2008.

- MARINO M, BERSANI C, COMI G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int J Food Microbiol.*, v.67, p.187-195, 2001.
- MATOS F.J.A. Plantas medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil, 2 edição: Imprensa universitária da UFC, Fortaleza. 2000.
- MWINE, T.J., and VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J. Med. Plants Res.*, v. 5, p. 652- 662, 2011.
- NDUMU, P.A., GEORGE, J.B., CHOUDHURY, M.K. Short communication: toxicity of neem seed oil (*Azadiracta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three host tick in cattle. *Phytother. Res.* v. 13, p.532–534, 1999.
- RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; DIMECH, G.S.; WNDERLEY, A.G. Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulceratogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm (Euphorbiaceae). *Revista Lecta*, v.21, n.1, p.61-68, 2002.
- RIGHI, A.A; MOTTA, L.B.; KLAFKE, G.M. et al. Chemical composition and efficacy of dichloromethane extract of *Croton sphaerogynus* Baill (Euphorbiaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, v.192, p.292-295, 2013.
- SEIGLER, D.S. Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* v.2, n.81, p.380-401, 1994.
- SILVA FILHO, M.L.; SILVA, L.B.; FERNANDES, R.M.; LOPES, G.S.. Efeito do extrato aquoso e etanólico do angico preto sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.3, p.637-644, 2013.
- SILVA, F. S.; ALBUQUERQUE, U.P.; JÚNIOR, L.M.C. et al. An ethnopharmacological assessment of the use of plants against parasitic diseases in humans and animals. *J. Ethnopharmacol.*, v. 155, p.1332-1341, 2014.

CAPÍTULO 2

EFICÁCIA DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE DE *JATROPHA MOLLISSIMA*
(POHL) BAILL. SOBRE TELEÓGINAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS)*
MICROPLUS

(Manuscrito submetido para avaliação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

EFICÁCIA DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE DE *JATROPHA MOLLISSIMA* (POHL) BAILL. SOBRE TELEÓGINAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

Giuliana A.F.P. Duarte^{2*}, Michelline N.D.L. de Barros², Maria do C. de Medeiros³, Ana R. C. Ribeiro⁴, Ana C.R. Athayde² e Sérgio S. Azevedo²

ABSTRACT.- Duarte G.A.F.P., Barros M.N.D.L., Medeiros M.C., Ribeiro A.R.C., Athayde A.C.R. & Azevedo S.S. 2016[**Efficiency of ethanolic extracts from the stalk of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.***] Eficácia do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* . Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Rodovia Patos-Teixeira, Km Zero, Jatobá, Patos PB 58700-970, Brazil. E-mail: giuliana_medvet@hotmail.com

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* acaricide efficiency of ethanolic extracts from the stalk of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo) on *R. (B.) microplus* comparing them with some used commercial acaricides. Engorged ticks were collected from naturally infested cattle in Hospital Universitário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos. *In vitro* experiments consisted on the immersion tests of engorged females. Three solutions were prepared to give concentrations of 5% (P5), 10% (P10) and 25% (P25). Six control groups were prepared, one containing distilled water (negative control), the other containing 96% ethanol and four groups using commercial acaricides diluted in distilled water in the manner proposed by the manufacturer, the latter being, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% and an association of ethion 60% and cipermetrina 8% (positive controls). All treatments were made at triplicate. The percentage of oviposition reduction (RO) in P10 and P25 groups were higher than the commercial acaricide, the hatching rate reduction (RE) for P10 and P25 groups resembled themselves to amitraz and deltametrina groups and the percentage of control (PC) in the P10 and P25 groups was 100%, similar to amitraz group. The results of this study showed that the ethanol extract from 10% by *J. mollissima* shows acaricide activity *in vitro*.

INDEX TERMS: acaricide, tick, ethanolic extracts.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Rodovia Patos-Teixeira, Km Zero, Jatobá, 58700-970, Patos, PB, Brasil. *Autor para correspondência: giuliana_medvet@hotmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Centro de saúde e Tecnologia Rural- CSTR- Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Rodovia Patos-Teixeira, Km Zero, Jatobá, 58700-970, Patos, PB, Brasil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Avenida Senador Salgado Filho 3000 - Campus Universitário 59078-970, Natal, RN, Brasil

RESUMO. - O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade acaricida *in vitro* de extratos etanólicos do caule de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo) sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, comparando-os com alguns carrapaticidas comerciais. Fêmeas ingurgitadas dessa espécie foram coletadas diretamente do corpo de animais naturalmente infestados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos. A experimentação *in vitro* consistiu na realização de testes de imersão de fêmeas ingurgitadas. Três diluições foram preparadas para se obter as concentrações de 5% (P5), 10% (P10) e 25% (P25). Seis grupos controles foram preparados, um contendo água destilada (controle negativo), outro contendo etanol 96% e mais quatro grupos utilizando acaricidas comerciais diluídos em água destilada na forma proposta pelo fabricante, sendo estes, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% e associação de ethion 60% e cipermetrina 8% (controles positivos). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. O percentual de redução de oviposição (RO) nos grupos P10 e P25 foram superiores aos carrapaticidas comerciais, a redução de taxa de eclosão (RE) para os grupos P10 e P25 assemelharam-se aos grupos amitraz e deltametrina e o percentual de controle (PC) nos grupos P10 e P25 foi de 100%, semelhante ao grupo amitraz. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o extrato etanólico a partir de 10% de *J. mollissima* apresenta eficácia acaricida *in vitro*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: acaricida, carrapato, extrato etanólico.

INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) é considerado o principal ectoparasita de bovinos no Brasil, causando prejuízos em torno de 3,24 bilhões de dólares anual (Grisi et al. 2014). Estes prejuízos são acentuados não apenas devido à sua ação espoliativa ou tóxica, mas também pela transmissão da *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale* aos bovinos (FAO 2004).

O uso incorreto e exarcebado dos acaricidas têm levado a um aumento na pressão de seleção de populações de carrapatos resistentes às formulações comerciais de carrapaticidas presentes no mercado (Furlong et al. 2007, Labruna 2008).

Inseticidas alternativos têm sido desenvolvidos a partir de alguns compostos isolados de plantas por serem potencialmente menos tóxico para os animais e mais seguros para o meio ambiente (Albuquerque et al. 2007). Estes compostos podem agir sobre os parasitas reduzindo seu desenvolvimento, sobrevivência e taxa de reprodução (Giglioti et al. 2011).

A espécie *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo) pertence à família Euphorbiaceae e é endêmica da Caatinga (Queiroz et al. 2013). Espécies do gênero *Jatropha* são uma das mais ricas fontes de fitoquímicos tais como alcalóides, flavonóides e terpenos (Webster 1994, Devappa 2010). Os terpenos e diterpenos presentes nesta planta possuem diversas atividades biológicas como antitumoral, citotóxica, anti-inflamatório, moluscicida, inseticida, propriedades fungicida, etc (Devappa et al. 2011). Além de ter demonstrado potencial fitoterápico para fins de controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos (Ribeiro et al. 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do extrato etanólico do caule de *J. mollissima* em diferentes concentrações comparando-os com carrapaticidas comerciais mais usados sobre parâmetros biológicos do *R.(B) microplus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande e aprovado recebendo o número 138/2014.

Coleta do material botânico. Os procedimentos de coleta e herborização do material vegetal foram realizados baseando-se nas metodologias de Cartaxo et al. (2010). A planta foi coletada na microrregião dos Inhamuns (Tauá-Ceará), (040°18'05,4" W; 06°01'03,6" S), identificada e depositada no Herbário Carirense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri-URCA, com exsicata nº6675.

Obtenção do extrato orgânico. Para confecção do extrato etanólico, utilizou-se o caule de *J. mollissima*, sendo empregada a metodologia descrita por Matos (2000). Utilizou-se etanol 96% como solvente orgânico e após 96 horas de extração a frio, foram realizadas filtrações simples e os extratos mantidos à temperatura ambiente (30±2°C) para evaporação total do solvente e obtenção do extrato líquido, em seguida procedeu-se a concentração do extrato em evaporador rotativo a temperatura de 45°C.

Experimento *in vitro*. Três diluições foram preparadas para se obter as concentrações de 5% (P5), 10% (P10) e 25% (P25). Seis grupos controles foram preparados, um contendo água destilada (controle negativo), outro contendo etanol 96% e mais quatro grupos utilizando acaricidas comerciais diluídos em água destilada na forma proposta pelo fabricante, sendo estes, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% e associação de ethion 60% e cipermetrina 8% (controles positivos).

Obtenção das teleóginas. Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram coletadas como preconiza Gonzales (1993) de bovinos naturalmente infestados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos. Estes bovinos não receberam tratamento por acaricidas por pelo menos 50 dias antes da coleta dos carrapatos.

Ação biológica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Após a coleta, as fêmeas de *R. (B.) microplus* foram colocadas em recipientes plásticos com circulação de ar e imediatamente levadas para o Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais (LAMPA) onde foram higienizadas, com uma passagem em água deionizada autoclavada e outra em hipoclorito de sódio a 4% por três minutos e finalmente em água deionizada autoclavada. O excesso foi retirado com papel filtro e posteriormente observadas sob microscópio estereoscópico para confirmação da sua integridade biológica e morfológica.

As fêmeas foram pesadas individualmente em balança analítica, para haver separação homogênea dos grupos tratados e controles. Os bioensaios foram realizados no mesmo dia em que os carrapatos foram coletados.

As fêmeas foram separadas em grupos de 10 usando três repetições para cada tratamento. Os testes de imersão foram realizados de acordo com o descrito por Drummond et al. (1973) como se segue, as fêmeas ingurgitadas foram imersas por 5 minutos em 4 ml da solução de cada grupo, posteriormente foram fixadas individualmente com o auxílio de esparadrapo nas placas de Petri e identificadas com um número, sendo acondicionadas em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%).

As fêmeas foram observadas a cada 24 horas até a última morte, também foram feitas anotações da data de postura inicial e postura final, data da morte e aspecto pós-morte. As posturas foram separadas diariamente para registro do último dia de postura de cada fêmea, com pesagem da quenógina após três dias do período de postura. A postura total de cada fêmea foi pesada, identificada, acondicionada em tubo de ensaio tampado com algodão e incubado em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%.

Após 15 dias de incubação as posturas foram revisadas diariamente, para avaliar a eclosão da primeira larva e o período de incubação dos ovos de cada fêmea. Para obter-se o percentual de eclosão foi feita a estimativa visual da eclosão de larvas de cada massa de ovos de acordo com o descrito por Amaral (1993) com uma modificação: os tubos de ensaio contendo as larvas e/ou ovos foram colocados em câmara climatizada a 40°C por 24 horas no intuito de matar as larvas e facilitar a contagem.

Os dados obtidos foram usados para determinar o percentual da redução da oviposição (RO) e percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de acordo com as equações descritas por Gonzales et al. (1993). Para estimativa de reprodução (ER) e cálculo do percentual de controle (PC) foram utilizadas as equações descritas por Drummond et al. (1973). Os cálculos para o índice de produção de ovos (IPO) e índice nutricional (IN) foram realizados segundo a metodologia de Bennett (1974).

$$RO = \frac{\text{massa de ovos (g)} - \text{massa de ovos tratado (g)}}{\text{massa de ovos controle (g)}} \times 100$$

$$RE = \frac{\text{taxa de eclosão controle} - \text{taxa de eclosão tratado}}{\text{taxa de eclosão controle}} \times 100$$

$$ER = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)} \times \text{taxa de eclosão}}{\text{peso inicial da fêmea (g)}} \times 20.000 *$$

*Constante que indica o número de ovos presentes em 1g de postura

$$PC = \frac{ER \text{ grupo controle} - ER \text{ grupo tratado}}{ER \text{ grupo controle}} \times 100$$

$$IPO = \frac{\text{massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)}} \times 100$$

$$IN = \frac{\text{massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)} - \text{peso da quenógina (g)}} \times 100$$

Os valores de todos os parâmetros correspondem às médias obtidas através do valor de cada parâmetro, de cada unidade experimental e de cada grupo.

Cálculo estatístico. Como todos os grupos apresentaram distribuição não normal, na estatística descritiva foram calculadas a mediana e o desvio interquartilico para cada parâmetro biológico, e para a comparação dos grupos (tratamentos) com relação aos parâmetros biológicos analisados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas com o teste de Nemenyi. O nível de significância adotado foi de 5%, e as análises foram feitas com o programa estatístico BioEstat 5.03.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento *in vitro*

Com relação ao percentual da redução da oviposição (RO) foi observado que a partir da concentração de 10% do extrato da planta (P10) obteve-se aproximadamente 100%, resultado observado no grupo P25. Estes dados foram superiores aos dos carrapaticidas comerciais onde o grupo amitraz alcançou uma taxa de redução de no máximo 90,77% (Quadro 1). Dantas et al. (2016) avaliando o extrato etanólico das folhas de *Amburana cearensis* na concentração de 25mg ml⁻¹ da fração hexânica sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* no estado de Pernambuco observaram uma inibição da oviposição de 52,7%.

Os resultados obtidos na redução da taxa de eclosão (RE) e percentual de controle (PC) demonstraram que os grupos P10 e P25 foram iguais aos grupos de carrapaticidas comerciais amitraz e deltametrina que foi de 100%. (Quadros 2 e 3).

Olivo et al. (2013) fazendo uso do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) sobre o carrapato bovino *R.(B.) microplus* observaram um efeito descendente para eclodibilidade. Estes autores demonstraram que a partir da concentração de 5% do óleo a eficácia foi de 100%. Broglio-Micheletti et al. (2009) obtiveram 0% de eclosão larval de ovos após tratarem fêmeas ingurgitadas do mesmo carrapato com extrato alcoólico a 2% de sementes de *Annona muricata* L. (graviola). Buzatti et al. (2011) utilizando extrato bruto seco (EBS) de *Glechon spathulata* a 2% em etanol a 70% observaram uma taxa de eclosão de apenas 10%. Estes valores demonstram que os extratos tiveram influência significativa sobre a embriogênese de *R. (B.) microplus*, diferentemente do que foi encontrado por Almança et al.(2013) que obtiveram percentagem média de eclosão larval dos ovos postos por fêmeas imersas nas soluções dos extratos hidroetanólicos de *Chenopodium ambrosioides* a 5%, 10% e 25% sendo de 98%, 99% e 98%, respectivamente.

Broglio-Micheletti et al. (2009), testando a eficácia de diversos extratos vegetais alcoólicos a 2%, demonstraram eficácia muito baixa (2,38%) para folha de Nim (*Azadirachta indica*), 18,35% para folha de capim-santo (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae), 38,49% para semente de nim, 59,24% para flor de jambo (*Syzygium malaccensis* L., Myrtaceae) e eficácia de 100% para semente de graviola (*A. muricata*).

Estes resultados que variam na eficiência de cada planta estudada demonstra a possibilidade de que o efeito acaricida seja dependente da concentração do extrato, da concentração de metabólitos secundários em cada parte da planta e também do sinergismo entre eles.

Lapa (1999) afirma que a síntese química das substâncias, ainda que orientada pelas características genéticas da planta, é controlada por fatores do ecossistema como iluminação, calor, constituição do solo, umidade.

A legislação pertinente para a comercialização de carrapaticidas no país preconiza o valor mínimo de 95% para que um tratamento seja considerado eficaz (BRASIL 1990), portanto, os grupos P10 e P25 e os carrapaticidas comerciais amitraz e deltametrina seriam considerados eficazes. Como já citado por alguns autores o gênero *Jatropha* é uma das mais ricas fontes de fitoquímicos tais como alcalóides, flavonóides e terpenos com ação inseticida comprovada (Webster 1994, Devappa 2010, Devappa et al. 2011), o que justifica o resultado obtido nesta pesquisa.

Com relação ao índice nutricional (IN), eficiência reprodutiva (ER) e índice de produção de ovos (IPO) o grupo P25 apresentou resultado negativo (0%) seguido pelo grupo P10. O que era esperado para ação do extrato, que este interferisse na biologia da fêmea do *R. (B.) microplus*. Dentre os carrapaticidas químicos o menor resultado foi do grupo amitraz (Quadro 4). Não houve diferença significativa entre os grupos controle com água destilada e álcool o que pressupõe que a ação sobre os parâmetros biológicos dos carrapatos foi devido aos componentes da planta. Segundo Chagas et al. (2003) o etanol é considerado de baixa toxicidade, corroborando com esta pesquisa onde não foi observada interferência do álcool na biologia das fêmeas.

CONCLUSÕES

O extrato etanólico do caule de *J. mollissima* numa concentração a partir de 10% demonstrou ação inibitória dos parâmetros biológicos da fêmea do *R. (B.) microplus*. Sugerindo que poderá ser uma ferramenta eficaz para o desenvolvimento de um agente acaricida.

Estudos adicionais devem ser conduzidos para identificar compostos ativos específicos e seus efeitos nos demais estágios de vida do carrapato além de uma avaliação *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Lins- Neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (Semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 114: 325–354.
- Almança, C.C.J., Pozzatti, P.N., Casagrande, F.P., Silva Filho, J.P., Bissi, B., Barbosa, B.C., Porfírio, L.C. 2013. Eficácia *in vitro* de extratos de *Chenopodium ambrosioides* sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Arq. Inst. Biol.* 80:43-49.
- Amaral, N.K. 1993. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2:144–151.
- Bennett, G.F. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acar.* 16:52-61.

- Brasil. 1990. Ministério da Agricultura. Portaria nº 90, de 04 dezembro 1989. Normas para produção e utilização de produtos antiparasitários. Diário Oficial da União, 22 jan., seção 1, coluna 2.
- Broglio-Micheletti, S.M.F., Valente, E.C.N., Souza, L.A., Dias, N.S., Araújo, A.M.N. 2009. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18:44-48.
- Buzatti, A., Krawczak, F.S., Pivoto, F.L., Vogel, F.S.F., Botton, S.A., Zanetti, G.D., Manfron, M.P., Sangioni, L.A. 2011. Atividade acaricida in vitro de *Glechon spathulata* Benth. sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Cienc. Rural 41:1813-1817.
- Cartaxo, S.L., Souza, M.M.A., Albuquerque, U.P. 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. J. Ethnopharmacol. 131:326-342.
- Chagas, A.C.S., Leite, R.C., Furlong, J., Prates, H.T., Passos, W.M. 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. Cienc. Rural 33:109-114.
- Dantas, A.C.S., Araújo, A.C., Pacheco, A.G.M., Branco, A., Sangioni, L.A., Almeida, J.R.G.S., Horta, M.C. 2016. Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cienc. Rural 46:536-541.
- Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2010. Jatropha Toxicity – A Review. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 13: 476-507.
- Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2011. Jatropha Diterpenes: a Review. Journal Am Oil Chem Soc. 88: 301-322.
- Drummond, R.O.; Ernst, S.E.; Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. J Econ Entomol. 66:130- 133.
- FAO, 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, 53 p.
- Furlong, J., Martins, J.R.S. & Prata, M.C.A. 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?, Controle estratégico do carrapato dos bovinos. A Hora Vet., 27 (159): 1-7.

- Giglioti, R.; Forim, M.R.; Oliveira, H.N.; Chagas, A.C.S., Ferrezini, J., Brito, L.G., Falcoski, T.O.R.S., Albuquerque, L.G., Oliveira, M.C.S. 2011. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. Vet. Parasitol. 181: 309-315.
- Gonzales, J.C., Muniz, R.A., Farias, A., Gonçalves, L.C.B., Rew, R.S. 1993. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. Vet. Parasitol. 49:107-119.
- Grisi, L.; Leite, R.C.; Martins, J.R.S. ; Barros, A.T.M., et al. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol. 23:150-156.
- Labruna. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. P. 15-56. 2008. In: Pereira, M.C., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Klafke, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : Biologia, Controle e Resistência. MEDVET, 169p.
- Lapa, A.J. 1999. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C.M.O. (Ed). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina. 181-196.
- Matos, F.J.A. 2000. Plantas medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil, 2 edição: Imprensa universitária da UFC, Fortaleza.
- Olivo, C.J., Agnolin, C.A., Parra, C.L.C., Vogel, F. S. F., Richards, N.S.P.S., Pellegrini, L.G., Webe, A., Pivoto, F., Araujo, L. 2013. Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) no controle do carrapato bovino. Cienc. Rural 43:331-337.
- Queiroz M.F., Fernandes P.D., Dantas Neto J., Arriel N.H.C., Francisco J.L., Marinho F.J.L. & Leite S.F. 2013. Crescimento e fenologia de espécies de *Jatropha* durante a estação chuvosa. Revta Bras. Eng. Agríc. Ambient. 17:405-411.
- Ribeiro, A.R.C., Andrade, F. D., Medeiros, M. C., Camboim A. S., Pereira Júnior, F.A., Athayde A.C.R, Rodrigues, O.G., Silva, W.W. 2014. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. Pesq. Vet. Bras. 34(11):1051-1055.
- Webster, G.L. 1994. Euphorbiaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 81:1-144.

Quadro 1. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da oviposição (RO) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *J. mollissima* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	RO Álcool	RO Água
P5	49,63 ± 19,84a	52,48 ± 21,37a
P10	98,57 ± 10,89be	98,81 ± 11,12be
P25	100,00 ± 0,00ce	100,00 ± 0,00ce
Deltametrina	56,86 ± 73,09ag	55,94 ± 67,99ag
Cipermetrina	34,98 ± 79,54af	28,59 ± 73,65af
Amitraz	90,52 ± 64,54deg	90,77 ± 55,09deg
Ethion + Cipermetrina	38,30 ± 17,34a	37,64 ± 30,14a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. P5: diluição 5% pinhão bravo; P10: diluição 10% pinhão bravo; P25: diluição 25% pinhão bravo.

Quadro 2. Mediana e desvio interquartílico do percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *J. mollissima* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	RE Álcool	RE Água
P5	5,71 ± 26,91a	0,00 ± 30,36a
P10	100,00 ± 6,66bf	100,00 ± 5,55bf
P25	100,00 ± 0,00cf	100,00 ± 0,00cf
Deltametrina	100,00 ± 79,41df	100,00 ± 75,00df
Cipermetrina	11,76 ± 33,92a	5,55 ± 31,01a
Amitraz	100,00 ± 89,47ef	100,00 ± 97,36ef
Ethion + Cipermetrina	29,41 ± 67,98ag	34,52 ± 74,45a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. P5: diluição 5% pinhão bravo; P10: diluição 10% pinhão bravo; P25: diluição 25% pinhão bravo.

Quadro 3. Mediana e desvio interquartilico do percentual de controle (PC) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *J. mollissima* Baill e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	PC Álcool	PC Água
P5	25,09 ± 32,91a	25,07 ± 38,60a
P10	100,00 ± 0,30bf	100,00 ± 0,21bf
P25	100,00 ± 0,00cfgh	100,00 ± 0,00cf
Deltametrina	100,00 ± 68,78df	100,00 ± 56,71dg
Cipermetrina	7,71 ± 196,97agi	6,66 ± 141,35a
Amitraz	100,00 ± 86,5efij	100,00 ± 89,53efg
Ethion + Cipermetrina	47,72 ± 75,05ahj	48,84 ± 77,07a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. P5: diluição 5% pinhão bravo; P10: diluição 10% pinhão bravo; P25: diluição 25% pinhão bravo.

Quadro 4. Mediana e desvio interquartilico do índice nutricional (IN), índice de produção de ovos (IPO) e eficiência reprodutiva (ER) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *J. mollissima* Baill, quatro carrapaticidas comerciais e grupos controles

Tratamento	IN	IPO	ER
P5	166,13 ± 140,03a	39,88 ± 13,57a	721716 ± 317153a
P10	1,73 ± 14,96bh	1,04 ± 7,80bf	0,00 ± 2463bh
P25	0,00 ± 0,00ch	0,00 ± 0,00cf	0,00 ± 0,00ch
Deltametrina	156,00 ± 267,25a	32,84 ± 53,22ag	0,00 ± 579970dhi
Cipermetrina	279,75 ± 459,50di	51,01 ± 49,62ag	827705 ± 999412aj
Amitraz	11,84 ± 201,87ah	6,28 ± 53,00a	0,00 ± 907666eih
Ethion + Cipermetrina	317,66 ± 252,84ei	48,68 ± 12,95ah	548274 ± 607542ah
Álcool	347,50 ± 42,18fi	59,09 ± 6,77di	978240 ± 232194fj

Água 337,80 ± 161,36gi 56,09 ± 5,84ei 954597 ± 274845gj

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. P5: diluição 5% pinhão bravo; P10: diluição 10% pinhão bravo; P25: diluição 25% pinhão bravo.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *HYPTIS SUAVEOLENS* (L.) POIT. SOBRE TELEÓGINAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

(Manuscrito submetido para avaliação na Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

Efeito do extrato etanólico das partes aéreas de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Effect of ethanol extract from the aerial parts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Giuliana Amélia Freire Pereira Duarte^{1*}; Michelline Nicolle Damião Lacet de Barros¹; Maria do Carmo de Medeiros²; Ana Raquel Carneiro Ribeiro³; Ana Célia Rodrigues Athayde¹; Sérgio Santos Azevedo¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos, PB, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Centro de saúde e Tecnologia Rural- CSTR- Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos, PB, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFRN, Natal, RN, Brasil

*Autor para correspondência: giuliana_medvet@hotmail.com

Resumo

O aparecimento de linhagens de carrapatos resistentes aos produtos químicos devido ao uso abusivo e errático destes produtos levou a busca de métodos alternativos de controle. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade acaricida *in vitro* de extratos etanólicos das partes aéreas da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (alfazema brava) comparando-os com carrapaticidas comerciais comumente usados sobre parâmetros biológicos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A experimentação *in vitro* consistiu na realização de testes de imersão de fêmeas ingurgitadas. Três diluições foram preparadas para se obter as concentrações de 5% (A5), 10% (A10) e 25% (A25). Seis grupos controles foram preparados, um contendo água destilada (controle negativo), outro contendo etanol 96% e mais quatro grupos utilizando acaricidas comerciais diluídos em água destilada na forma proposta pelo fabricante, sendo estes, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% e associação de ethion 60% e cipermetrina 8% (controles positivos). Os resultados mostraram que o percentual de redução de oviposição (RO) no grupo A25 foi de 100%, superior aos carrapaticidas comerciais. A redução de taxa de eclosão (RE) e o percentual de controle (PC) para o grupo A25 foi

semelhante aos grupos amitraz e deltametrina, também de 100%. Considerando este resultado pode-se concluir que o extrato etanólico a 25% de *H. suaveolens* apresenta eficácia acaricida *in vitro*.

Palavras-chave: acaricida, carrapato, extrato etanólico, *in vitro*

Abstract

The appearance of resistant strains of ticks to chemicals due to abusive and erratic use of these products led the search for alternative control methods. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* acaricide efficiency of ethanolic extracts from the aerial parts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. comparing them with some used commercial acaricides on biological parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *In vitro* experiments consisted on the immersion tests of engorged females. Three solutions were prepared to give concentrations of 5% (A5), 10% (A10) and 25% (A25). Six control groups were prepared, one containing distilled water (negative control), the other containing 96% ethanol and four groups using commercial acaricides diluted in distilled water in the manner proposed by the manufacturer, the latter being, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% and an association of ethion 60% and cipermetrina 8% (positive controls). *The results showed that the percentage of oviposition reduction (RO) in A25 group was 100%, higher than the commercial acaricide. The hatching rate reduction (RE) and the percentage of control (PC) for A25 group resembled to amitraz and deltametrina groups, 100% too. Considering this result it can be concluded that the ethanolic extracts from 25% by H. suaveolens shows acaricide activity in vitro.*

Keywords: acaricide, tick, ethanolic extracts, *in vitro*

Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) é considerado o principal ectoparasita de bovinos no Brasil, causando prejuízos em torno de 3,24 bilhões de dólares anual (Grisi et al., 2014). Para reduzir as perdas econômicas tornou-se necessário o uso de métodos de controle de ectoparasitas e, atualmente, os carrapaticidas químicos tem sido o principal meio de controle de *R.(B.) microplus* (Labruna, 2008). O aumento do número de cepas de carrapatos resistentes aos acaricidas químicos tornou necessária a busca por métodos alternativos de controle do carrapato e os compostos isolados de plantas são uma alternativa promissora para esse controle pois

interferem no desenvolvimento do parasita, em sua sobrevivência e reprodução (Giglioti et al., 2011).

Hyptis suaveolens (L.) Poit. (alfazema brava) pertence à família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae. São aromáticas devido à presença de terpenoides. As espécies de Lamiaceae produzem grande variedade de compostos secundários. Diterpenoides abietanos são característicos da subfamília Nepetoideae e muitos destes diterpenoides têm atividade biológica antibacteriana, antifúngica e inseticida (Harley et al., 2004). As saponinas, que também fazem parte de sua constituição, alteram a permeabilidade de todas as membranas biológicas (Osbourn, 1996).

De acordo com Silva et al. (2003) a epiderme de todos os órgãos aéreos da *H. suaveolens* apresenta alta densidade de tricomas glandulares, os quais armazenam terpenóides no interior de uma cápsula situada no ápice da estrutura. Esta mistura perfaz o óleo essencial, cuja constituição vem sendo extensivamente investigada (Martins et al., 2006). Este óleo essencial tem sido avaliado quanto a sua ação antisséptica (Rojas et al., 1992), antibacteriana (Asekun et al., 1999), antifúngica (Malele et al., 2003), larvicida contra *Aedes aegypti* (Amusan, et al., 2005), anti-helmíntica (Nayak et al., 2010), propriedades inseticidas e larvicidas (Peerzada, 1997) e ação repelente aos carrapatos (Soares et al., 2010).

Diante do potencial farmacológico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Hyptis* o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* do extrato etanólico das partes aéreas da *H. suaveolens* em diferentes concentrações comparando-os com carrapaticidas comerciais comumente usados sobre parâmetros biológicos do *R.(B) microplus*.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande e aprovado com número 23/2015.

Foi utilizada para coleta e herborização do material vegetal a metodologia segundo Cartaxo et al. (2010). As partes aéreas de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (alfazema brava) foram coletadas próximo ao Serrote Quinamuiú, Tauá-CE (06°01'03,6"S ; 040°18'05,4"H). A identificação botânica do material foi realizada através da amostra depositada no Herbário Carirense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri-URCA – CE, com exsicata número 6344.

Para confecção do extrato etanólico, utilizou-se as partes aéreas de *H. suaveolens* sendo empregada a metodologia descrita por Matos (2000). Utilizou-se etanol 96% como solvente orgânico e após 96 horas de extração a frio, foram realizadas filtrações simples e os extratos mantidos à temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) para evaporação total do solvente e obtenção do extrato líquido, em seguida procedeu-se a concentração do extrato em evaporador rotativo a temperatura de 45°C .

Três diluições foram preparadas para se obter as concentrações de 5% (A5), 10% (A10) e 25% (A25). Seis grupos controles foram preparados, um contendo água destilada (controle negativo), outro contendo etanol 96% e mais quatro grupos utilizando acaricidas comerciais diluídos em água destilada na forma proposta pelo fabricante, sendo estes, deltametrina 25%, cipermetrina 15%, amitraz 12,5% e associação de ethion 60% e cipermetrina 8% (controles positivos).

Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram coletadas como preconiza Gonzales (1993) diretamente do corpo de animais naturalmente infestados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos. Estes bovinos não receberam tratamento por acaricidas por pelo menos 50 dias antes da coleta dos carrapatos.

Após a coleta, as fêmeas de *R. (B.) microplus* foram colocadas em recipientes plásticos com circulação de ar e imediatamente levadas para o Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais (LAMPA) onde foram higienizadas, com uma passagem em água deionizada autoclavada e outra em hipoclorito de sódio a 4% por três minutos e finalmente em água deionizada autoclavada. O excesso foi retirado com papel filtro e posteriormente observadas sob microscópio estereoscópico para confirmação da sua integridade biológica e morfológica.

As fêmeas foram pesadas individualmente em balança analítica, para haver separação homogênea dos grupos tratados e controles. Os bioensaios foram realizados no mesmo dia em que os carrapatos foram coletados.

As fêmeas foram separadas em grupos de 10 usando três repetições para cada tratamento. Os testes de imersão foram realizados de acordo com o descrito por Drummond et al. (1973) como se segue, as fêmeas ingurgitadas foram imersas por 5 minutos em 4 ml da solução de cada grupo, posteriormente foram fixadas individualmente com o auxílio de esparadrapo nas placas de Petri e identificadas com um número, sendo acondicionadas em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%).

As fêmeas foram observadas a cada 24 horas até a última morte, também foram feitas anotações da data de postura inicial e postura final, data da morte e aspecto pós-morte.

As posturas foram separadas diariamente para registro do último dia de postura de cada fêmea, com pesagem da quenógina após três dias do período de postura. A postura total de cada fêmea foi pesada, identificada, acondicionada em tubo de ensaio tampado com algodão e incubado em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%.

Depois de 15 dias de incubação as posturas foram revisadas todos os dias, para avaliar a eclosão da primeira larva e o período de incubação dos ovos de cada fêmea. Para obter-se o percentual de eclosão foi feita a estimativa visual da eclosão de larvas de cada massa de ovos de acordo com o descrito por Amaral (1993) com uma modificação: os tubos de ensaio contendo as larvas e/ou ovos foram colocados em câmara climatizada a 40°C por 24 horas no intuito de matar as larvas e facilitar a contagem.

Os dados obtidos foram usados para determinar o percentual da redução da oviposição (RO) e percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de acordo com as equações descritas por Gonzales et al. (1993). Para estimativa de reprodução (ER) e cálculo do percentual de controle (PC) foram utilizadas as equações descritas por Drummond et al. (1973). Os cálculos para o índice de produção de ovos (IPO) e índice nutricional (IN) foram realizados segundo a metodologia de Bennett (1974).

$$RO = \frac{\text{massa de ovos (g)} - \text{massa de ovos tratado (g)}}{\text{massa de ovos controle (g)}} \times 100$$

$$RE = \frac{\text{taxa de eclosão controle} - \text{taxa de eclosão tratado}}{\text{taxa de eclosão controle}} \times 100$$

$$ER = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)} \times \text{taxa de eclosão}}{\text{peso inicial da fêmea (g)}} \times 20.000 *$$

*Constante que indica o número de ovos presentes em 1g de postura

$$PC = \frac{ER \text{ grupo controle} - ER \text{ grupo tratado}}{ER \text{ grupo controle}} \times 100$$

$$IPO = \frac{\text{massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)}} \times 100$$

$$IN = \frac{\text{massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)} - \text{peso da quenógina (g)}} \times 100$$

Os valores de todos os parâmetros correspondem às médias obtidas através do valor de cada parâmetro, de cada unidade experimental, de cada grupo.

Como todos os grupos apresentaram distribuição não normal, na estatística descritiva foram calculadas a mediana e o desvio interquartilico para cada parâmetro biológico, e para a comparação dos grupos (tratamentos) com relação aos parâmetros biológicos analisados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas com o teste de Nemenyi. O nível de significância adotado foi de 5%, e as análises foram feitas com o programa estatístico BioEstat 5.03.

Resultados e Discussão

O resultado obtido para a redução de oviposição (RO) demonstrou que o grupo A25 interferiu em 100% da oviposição das fêmeas (Tab. 1). O melhor resultado entre os grupos químicos foi o amitraz que não interferiu além de 90,77%. No estado de Pernambuco, Dantas et al. (2016) observaram uma inibição da oviposição de 52,7% ao avaliar o extrato etanólico das folhas de *Amburana cearensis* na concentração de 25mg ml⁻¹ da fração hexânica sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Resultado inferior comparado ao resultado deste trabalho.

Tabela 1. Mediana e desvio interquartilico do percentual da redução da oviposição (RO) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	RO Álcool	RO Água
A5	46,18 ± 49,35a	47,23 ± 45,05a
A10	72,66 ± 31,84a	70,08 ± 23,81a
A25	100,00 ± 9,98b	100,00 ± 10,26b
Deltametrina	56,86 ± 73,09a	55,94 ± 67,99a
Cipermetrina	34,98 ± 79,54ac	28,59 ± 73,65ac
Amitraz	90,52 ± 64,54a	90,77 ± 55,09a
Ethion + Cipermetrina	38,30 ± 17,34ac	37,64 ± 30,14ac

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. A5: diluição 5% alfazema brava; A10: diluição 10% alfazema brava; A25: diluição 25% alfazema brava.

O extrato de *H. suaveolens* numa concentração de 25% (Grupo A25) reduziu a eclodibilidade em 100%. Resultado também observado nos grupos químicos deltametrina e amitraz (Tab. 2). Agnolin et al. (2014) ao avaliar o efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos confirmaram que não houve eclodibilidade com níveis de concentração a partir de 5%. Olivo et al. (2013) fazendo uso do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) sobre o carrapato bovino *R. (B.) microplus* também observaram um efeito descendente para eclodibilidade a partir da concentração a 5%.

Tabela 2. Mediana e desvio interquartilico do percentual da redução da taxa de eclosão (RE) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	RE Álcool	RE Água
A5	9,21 ± 100,00a	16,66 ± 100,00a
A10	65,68 ± 86,19ae	69,85 ± 71,82ae
A25	100,00 ± 3,94bf	100,00 ± 3,94bf
Deltametrina	100,00 ± 79,41af	100,00 ± 75,00af
Cipermetrina	11,76 ± 33,92c	5,55 ± 31,01c
Amitraz	100,00 ± 89,47def	100,00 ± 97,36def
Ethion + Cipermetrina	29,41 ± 67,98a	34,52 ± 74,45a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. A5: diluição 5% alfazema brava; A10: diluição 10% alfazema brava; A25: diluição 25% alfazema brava.

A legislação pertinente para a comercialização de carrapaticidas no país preconiza o valor mínimo de 95% para que um tratamento seja considerado eficaz (BRASIL 1990). Para a eficácia entre os grupos dos extratos apenas o grupo A25 seria considerado eficaz, dado que foi de 100%, assemelhando-se ao amitraz e a deltametrina (Tab. 3).

Agnolin et al. (2014) obtiveram eficácia de 100% a partir de 5% de óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf). Broglio-Micheletti et al. (2009), avaliando o extrato etanólico de folhas secas de capim santo (*Cymbopogon citratus*) a 2%, verificaram eficácia de 18,35% no controle do carrapato. Silva et al. (2007) obteve com o capim santo uma eficiência de 20,32%, a partir do extrato puro de folhas frescas. Estes autores observaram também que a ação foi maior quando utilizado o extrato diluído com 50% de água e outro diluído com 50% de álcool, verificando controle de 35,7% e 47%, respectivamente. Neste trabalho os autores apontam para um possível efeito potencializador do álcool, corroborando com o trabalho feito por Chagas et al. (2002), quando comparou diferentes tipos de solventes. Também Heimerdinger et al. (2009) verificaram eficácia do capim cidreira no controle de teleóginas, usando macerado da planta inteira, com extração alcoólica, correspondendo a 23,08% e 37,5% de matéria natural, com controle de 87,6% e 92,6%, respectivamente.

Essa possível potencialização do álcool na eficácia do extrato não foi observada neste trabalho visto que os grupos controle com água destilada e álcool não diferiram entre si, pressupondo que a ação acaricida deve-se, provavelmente, aos compostos presentes na planta.

A mortalidade dos ácaros depende da concentração do óleo essencial utilizado, sendo que, quanto maior a concentração melhor será esta ação acaricida (Meza & Taborda, 2010).

Tabela 3. Mediana e desvio interquartílico do percentual de controle (PC) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e quatro carrapaticidas comerciais em relação aos grupos controles

Tratamento	PC Álcool	PC Água
A5	47,49 ± 80,55a	43,10 ± 75,76a
A10	86,46 ± 62,72a	84,68 ± 44,58a
A25	100,00 ± 0,36bd	100,00 ± 0,57be
Deltametrina	100,00 ± 68,78a	100,00 ± 56,71a
Cipermetrina	7,71 ± 196,97cf	6,66 ± 141,35cf
Amitraz	100,00 ± 86,58ad	100,00 ± 89,53ae
Ethion + Cipermetrina	47,72 ± 75,05aef	48,84 ± 77,07adf

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. A5: diluição 5% alfazema brava; A10: diluição 10% alfazema brava; A25: diluição 25% alfazema brava.

Os resultados obtidos com relação ao índice nutricional (IN), eficiência reprodutiva (ER) e índice de produção de ovos (IPO) apenas o grupo A25 apresentou resultado negativo (0%). Dentre os carrapaticidas químicos o menor resultado foi do grupo amitraz (Tab. 4). Pode-se dizer que o extrato na concentração a 25% interferiu em toda a capacidade de desenvolvimento e reprodução do *R. (B.) microplus*.

Tabela 4. Mediana e desvio interquartilico do índice nutricional (IN), índice de produção de ovos (IPO) e eficiência reprodutiva (ER) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* expostas a diferentes diluições de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., quatro carrapaticidas comerciais e grupos controles

Tratamento	IN	IPO	ER
A5	143,94 ± 205,71a	36,78 ± 35,01a	521446 ± 778504a
A10	84,05 ± 100,00a	26,19 ± 19,98a	139831 ± 393599a
A25	0,00 ± 17,59b	0,00 ± 10,71b	0,00 ± 4326b
Deltametrina	156,00 ± 267,25a	32,84 ± 53,22a	0,00 ± 579970a
Cipermetrina	279,75 ± 459,50cg	51,01 ± 49,62cg	827705 ± 999412cg
Amitraz	11,84 ± 201,87a	6,28 ± 53,00a	0,00 ± 907666a
Ethion + Cipermetrina	317,66 ± 252,84dgh	48,68 ± 68afg	548274 ± 607542afg
Álcool	347,50 ± 42,18egi	56,09 ± 5,84dh	954597 ± 274845dg
Água	337,80 ± 161,36fhi	59,09 ± 6,77eh	978240 ± 232194eg

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. A5: diluição 5% alfazema brava; A10: diluição 10% alfazema brava; A25: diluição 25% alfazema brava.

Conclusão

O extrato etanólico das partes aéreas do *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. mostrou-se eficaz no controle *in vitro* do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, interferindo em sua biologia e desenvolvimento. São necessários mais estudos para comprovar sua eficácia *in vivo* diante de interferências ambientais como temperatura e umidade.

Referências

- AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J.; PARRA, C. L. C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.16, n.1, p.77-82, 2014.
- AMARAL, N.K. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.2, p.144–151, 1993.
- AMUSAN, A.A.S.; IDOWU, A.B. & AROWOLO, F.S. Comparative toxicity effect of bush tea leaves (*Hyptis suaveolens*) and orange peel (*Citrus sinensis*) oil extract on larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Tanzania Health Research Bulletin* 7, p. 174-178, 2005.
- ASEKUN, O.T.; EKUNDAYO, O. & ADENIYI, B.A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia*, v. 70, p. 440-442, 1999.
- BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acar.*, v.16, p.52-61, 1974.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 90, de 04 dezembro 1989. Normas para produção e utilização de produtos antiparasitários. *Diário Oficial da União*, 22 jan., seção 1, coluna 2. 1990.
- BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F., VALENTE, E.C.N., SOUZA, L.A. et al. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.18, p.44- 48, 2009.
- CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* v.131, p.326-342, 2010.
- CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Na. Sci.*, v.39, n.5, p.247-253, 2002.
- DANTAS, A.C.S., ARAUJO, A.C., PACHECO, A.G.M. et al.. Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Cienc. Rural* v.46, p.536-541, 2016.
- DRUMMOND, R.O.; ERNST, S.E.; TREVINO, J.L. et al. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. *J Econ Entomol.*, v.66, p.130-133, 1973.

- GIGLIOTI, R.; FORIM, M.R.; OLIVEIRA, H.N. et al. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. Vet. Parasitol., v.181, p.309-315, 2011.
- GONZALES, J.C., MUNIZ, R.A., FARIAS, A., et al. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. Vet. Parasitol., v.49, p.107–119, 1993.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol., v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- HARLEY, R. M. et al. Labiatae. In: KUBITZKI, K.; KADEREIT, J. W. Flowering Plants, dicotyledones: Lamiales except Acanthaceae including Avicenniaceae. The families and genera of vascular plants; 7. Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004, 484p.
- HEIMERDINGER, A.; MOLENTO, M.B.; OLIVO, C.J. et al. Extratos de capim-cidreira e amitraz em teste *in vitro* sobre o carrapato bovino. Livestock Res Rural Dev, v.21, n.1, artigo 5, 2009.
- LABRUNA, M. B. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p. 15-56. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET, 169p, 2008.
- MALELE, R.S.; MUTAYABARWA, C.K.; MWANGI, J.W. at al. Essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: Composition and antifungal activity. J. Essent. Oil Res., v. 15, p. 438-440, 2003.
- MARTINS, F.T.; POLO, M.; DOS SANTOS, M.H. & BARBOSA, L.C.A. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. Quím. Nova, v. 29, p. 1203-1209, 2006.
- MATOS F.J.A. Plantas medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil, 2 edição: Imprensa universitária da UFC, Fortaleza. 2000.
- MEZA, D.L.M. & TABORDA, M. Composición química y activida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el acaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae). Biosalud, v.9, n.2, p.21-31, 2010.

- NAYAK, P.S.; NAYAK, S.; KAR, DM.; DAS, P. In vitro anthelmintic activity of whole plant extracts os *Hyptis suaveolens* Poit. International Journal of Current Pharmaceutical Research, v. 2, p. 50-51, 2010.
- OLIVO, C.J.; AGNOLIN, C.A.; PARRA, C.L.C. et al. Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) no controle do carrapato bovino. Cienc. Rural, v.43, p.331-337, 2013.
- OSBOURN, A. E. Saponins and plant defense – a soap story, Trends Plant Sci. v.1, p.4–9, 1996.
- PEERZADA, N. Chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Molecule 2, p. 165-168, 1997.
- PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET, 169p, 2008.
- SILVA, A.F.; BARBOSA, L.C.A.; SILVA, E.A.M., et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). Rev. Bras. Plantas Med. p. 6-17, 2003.
- SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R.; RODRIGUES, O.G. et al. Efeitos do neem (*Azadirachta indica* A. Juss) e do capim santo [*Cymbopogon citratus*(DC) Stapf] sobre os parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no semiárido paraibano. Rev. Bras. Pl. Med., v.9, n.3, p.1-5, 2007.
- SOARES, S.F.; BORGES, L.M.F.; BRAGA, R.S. et al Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. Vet. Parasitol., v. 167, p. 67-73, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

Os extratos etanólicos do *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro), *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo) e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (alfazema brava) demonstraram eficácia acaricida sobre os parâmetros biológicos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no estudo *in vitro*. Ressaltando que os resultados dos extratos demonstraram eficácia igual ou até mesmo superior quando comparados aos carrapaticidas comerciais testados.

Portanto, diante destes resultados, pode-se dizer que os extratos estudados podem se tornar ferramentas viáveis no controle do carrapato bovino, porém são necessários estudos *in vivo* para avaliar a eficácia dos extratos diante de interferências ambientais, tais como temperatura e umidade.

Anexo



ISSN 0102-0935 *versão impressa*

ISSN 1678-4162 *versão online*

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins. Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.

- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto **não** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Figura: Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **sem** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando

indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, adaptadas para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já **citada por** outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.



ISSN 0100-736X *versión impresa*

ISSN 1678-5150 *versión online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) **sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter

seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão**

adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas.** Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.