

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

POTENCIALIDADE ACARICIDA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper aduncum* L. (Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)

Wilson Castro Silva

Caxias do Sul, 2008

Wilson Castro Silva

POTENCIALIDADE ACARICIDA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper aduncum* L. (Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª Dra. Neiva Monteiro de Barros
Co-orientador: Prof. Dr. Horácio Heinzen

Caxias do Sul, 2008

Wilson Castro Silva

POTENCIALIDADE ACARICIDA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper aduncum* L. (Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Neiva Monteiro de Barros
Co-orientador: Dr. Horácio Heinzen

Tese aprovada em 15 de dezembro de 2008.

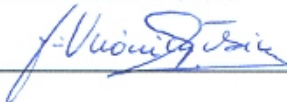
Orientadora:

Dra. Neiva Monteiro de Barros



Membros da Banca

Dra. Maria Veronica Cesio

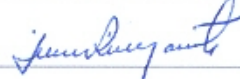


Co-orientador:

Dr. Horácio Heinzen



Dr. João Ricardo de Souza Martins



Dr. Aldo José Pinheiro Dillon



Dedico

Ao meu Deus, meu criador, todo poderoso e em quem eu deposito minha fé e esperança, que, por meio da sua misericórdia, deu-me forças e iluminou-me com sabedoria para superar todos os obstáculos e concluir esta Tese, concedendo-me mais uma vitória em minha vida.

Aos meus pais Geraldo Silva e Maria Hilda Castro Silva que, com muita dificuldade, mas com muito amor me criaram e todos os dias estão ao meu lado, tanto na minha presença como na ausência, cobrindo-me com suas orações ao nosso Deus.

Aos meus filhos Wilson Júnior e Ana Paula, meus filhos amados, que pelas suas presenças em minha vida, mesmo distantes de mim, nos momentos difíceis em que chegava o desânimo, eram o motivo para eu levantar minha cabeça, renovar minhas forças e caminhar rumo à vitória.

A minha família que sempre esteve ao meu lado e foi meu suporte durante essa caminhada.

A todas as pessoas que me ajudaram e me incentivaram a alcançar mais um objetivo em minha vida.

Agradecimentos

A profa. Dra. Neiva Monteiro de Barros, pesquisadora da Universidade de Caxias do Sul, minha orientadora, pela acolhida e oportunidade que me concedeu de desenvolver esta Tese sob sua orientação; pelos ensinamentos e, principalmente, pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Horácio Heinzen pela co-orientação e contribuição nas análises químicas desse trabalho.

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo pelos ensinamentos, confiança e amizade.

À Dra. Joana D'Arc Ribeiro (*in memoriam*), minha orientadora no mestrado, a qual ficaria muito orgulhosa deste momento.

À Dra. Hellen Emília Menezes de Souza, pessoa fundamental e de grande importância na minha vida, pelo incentivo, confiança e por sempre acreditar no meu potencial.

Aos pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia Dr. Carlos Cleomir e MSc José Maria Rodrigues pelos ensinamentos durante o mestrado, os quais foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. João Ricardo Martins, pesquisador do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), pelos valiosos ensinamentos e contribuição na cessão dos ácaros para os testes biológicos;

Ao Dr. Marcos Vinícius Bastos Garcia, pesquisador da EMBRAPA – Amazônia Ocidental – Manaus-Amazonas, pelo apoio e contribuição nesse trabalho com a elaboração dos gráficos de toxicidade.

À Dra. Maria Verônica Cesio e ao químico Maurício Mato pelos ensinamentos e colaboração na parte química deste trabalho.

A Dra. Luciana Atti Serafini pelos ensinamentos e por ser sempre prestativa nos momentos que precisei utilizar o Laboratório de Óleos Essenciais.

Ao Dr. Aldo Dillon pelas correções e sugestões realizadas na Tese.

Às colegas de curso de Doutorado Ana Carolina, Luciana Bavaresco e Fabiana Agostini pelo companheirismo e amizade.

Às colegas de laboratório, em especial à Lúcia Vargas e Francine Albrecht pelo apoio e amizade.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) pela elaboração dos extratos vegetais.

Ao Partido Comunista do Brasil (PC do B) que me apoiou nos momentos mais difíceis, ajudando-me na minha formação acadêmica e profissional, contribuindo, dessa forma, com a formação de mais um Doutor para a região amazônica e com o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

À Brigada Militar do Estado do Rio Grande do Sul, especialmente ao Corpo de Bombeiros Militar de Caxias do Sul, pelo apoio, amizade e companheirismo dos oficiais e praças.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

A Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade que me concedeu de cursar o Doutorado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Importância parasitária e econômica do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
2.2 Ciclo de vida do carrapato.....	6
2.3 Estratégias de controle e resistência do carrapato aos acaricidas.....	7
2.4 Aspectos biológicos de <i>Piper aduncum</i> , <i>Palicourea marcgravii</i> e <i>Derris negrensis</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Seleção e coleta do material botânico.....	31
3.2 Identificação do material botânico.....	31
3.3 Secagem e processamento do material botânico.....	31
3.4 Obtenção dos extratos.....	32
3.5 Extração de óleo essencial.....	32
3.6 Coleta dos carrapatos.....	32
3.7 Identificação do carrapato.....	32
3.8 Avaliação acaricida dos extratos de <i>P. aduncum</i> , <i>P. marcgravii</i> e <i>D. negrensis</i>	33
3.8.1 Avaliação acaricida sobre fêmeas ingurgitadas.....	33
3.8.2 Avaliação acaricida sobre larvas.....	34
3.8.3 Avaliação acaricida de óleo essencial de <i>P. aduncum</i> sobre larvas.....	35
3.9 Estudo Fitoquímico de <i>P. aduncum</i> e <i>P. marcgravii</i>	35
3.9.1 Análise química qualitativa e quantitativa dos extratos.....	36
3.9.2 Análise espectrométrica em ultravioleta (UV).....	37

3.10 Análise dos dados.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Atividade acaricida do extrato hexânico de <i>P. aduncum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	39
4.2 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de <i>P. aduncum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	43
4.3 Atividade acaricida do extrato etanólico de <i>P. aduncum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	46
4.4 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. aduncum</i>	49
4.5 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. aduncum</i>	50
4.6 Atividade acaricida do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> sobre larvas de <i>R. microplus</i>	50
4.7 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com extratos de <i>P. aduncum</i>	51
4.8 Análise fitoquímica do extrato hexânico de <i>P. aduncum</i>	53
4.9 Atividade acaricida do extrato hexânico de <i>P. marcgravii</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	66
4.10 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de <i>P. marcgravii</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	70
4.11 Atividade acaricida do extrato etanólico de <i>P. marcgravii</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	77
4.12 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. marcgravii</i>	84
4.13 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. marcgravii</i>	85
4.14 Toxicidade de extratos acetato de etila e etanólico de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	85
4.15 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com extratos de <i>P. marcgravii</i>	87
4.16 Análise fitoquímica dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de <i>P. marcgravii</i>	88

4.17 Toxicidade de extratos de <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aduncum</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	97
4.18 Atividade acaricida do extrato hexânico de <i>D. negrensis</i> . sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	99
4.19 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de <i>D. negrensis</i> . sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	102
4.20 Atividade acaricida do extrato etanólico de <i>D. negrensis</i> . sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	105
4.21 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>D. negrensis</i>	108
4.22 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>D. negrensis</i>	109
4.23 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com extratos de <i>D. negrensis</i>	109
5 CONCLUSÕES	114
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. aduncum</i>	49
Tabela 2 – Percentual de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. aduncum</i>	49
Tabela 3 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. aduncum</i>	50
Tabela 4 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de <i>P. aduncum</i>	52
Tabela 5 – Mortalidade de fêmeas ingurgitadas, larvas e controle de reprodução de <i>R. microplus</i> reportados na literatura.....	63
Tabela 6 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. marcgravii</i>	84
Tabela 7 – Percentual de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. marcgravii</i>	84
Tabela 8 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. marcgravii</i>	85
Tabela 9 – Toxicidade de extratos vegetais para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> (concentração letal mediana – CL ₅₀).....	85
Tabela 10 – Toxicidade de extratos vegetais para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> (tempo letal mediano – TL ₅₀).....	86
Tabela 11 – Toxicidade de extratos vegetais para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> (concentração Inibitória mediana – CI ₅₀).....	86
Tabela 12 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de <i>P. marcgravii</i>	87

Tabela 13 – Toxicidade de extratos vegetais para larvas de <i>R. microplus</i> (concentração letal mediana – CL ₅₀).....	97
Tabela 14 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de <i>D. negrensis</i>	108
Tabela 15 – Percentual de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de <i>D. negrensis</i>	108
Tabela 16 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de <i>D. negrensis</i>	109
Tabela 17 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de <i>D. negrensis</i>	110

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Compostos químicos encontrados em <i>P. aduncum</i> reportados por diversos autores.....	22
Quadro 2 - Compostos químicos encontrados em <i>P. aduncum</i> e seus respectivos grupos.....	23
Quadro 3 - Compostos químicos presentes na espécie vegetal <i>P. marcgravii</i> , reportados por diversos autores.....	26
Quadro 4 - Compostos químicos identificados em <i>P. marcgravii</i> e seus respectivos grupos.	26

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> ovipositando. Foto: Silva, W.C., 2007.....	4
Figura 2 – Ciclo de vida simplificado do <i>R. microplus</i> . 1- larva infestante realizando a fixação no bovino; 2- ninfa; 3- teleógina em estágio final de ingurgitamento (Fase parasitária); 4- teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5- ovos, no solo, em período de incubação; 6- larva, no solo, em período de incubação (Fase da vida livre) (Andreotti, 2002).....	6
Figura 3 – Ramos e folhas de <i>P. aduncum</i> . Foto: Silva, W.C., 2007.....	16
Figura 4 - Ramo de <i>P. marcgravii</i> com inflorescência. Foto: Silva, W.C., 2004.....	24
Figura 5 – Caule de <i>D. negrensis</i> . Foto: Silva, W.C., 2006.....	27
Figura 6 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	39
Figura 7 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	40
Figura 8 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	41
Figura 9 – Determinação da CL ₅₀ do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	42
Figura 10 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. aduncum</i>	43
Figura 11 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. aduncum</i>	44
Figura 12 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. aduncum</i>	45
Figura 13 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. aduncum</i>	46
Figura 14 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. aduncum</i>	47
Figura 15 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. aduncum</i>	48

Figura 16 – Percentuais de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	51
Figura 17 – Cromatografia gasosa do óleo extraído do extrato hexânico bruto de <i>P. aduncum</i> . 1-nerodiol (0,74%); 2-globulol (0,65%); 3-Espatulenol (0,64%); 4-croweacin (1,91%); 5-dilapiol (94,84%); 6-apiol (0,38%).....	53
Figura 18 – Estruturas moleculares dos compostos presentes no óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	54
Figura 19 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	55
Figura 20 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> revelada em luz ultravioleta a 254 e 365nm.....	56
Figura 21 – Espectrometria UV da banda amarela de Rf = 0,65 do extrato hexânico de <i>P. aduncum</i> , isolada por Cromatografia em camada delgada preparativa.....	57
Figura 22 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> , revelada com H ₂ SO ₄	58
Figura 23 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> , revelada com FeCl ₃	59
Figura 24 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> , revelada com NPR.....	60
Figura 25 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	66
Figura 26 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	67
Figura 27 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	68
Figura 28 – Determinação da CL ₅₀ do extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para larvas de <i>R. microlus</i>	69
Figura 29 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i>	70
Figura 30 – Determinação da CL ₅₀ do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	71
Figura 31 – Determinação do TL ₅₀ do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	72

Figura 32 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i>	73
Figura 33 – Determinação da CI_{50} do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	74
Figura 34 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i>	75
Figura 35 – Determinação da CL_{50} do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	76
Figura 36 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	77
Figura 37 – Determinação da CL_{50} do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	78
Figura 38 – Determinação do TL_{50} do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	79
Figura 39 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> nas diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	80
Figura 40 – Determinação da CI_{50} do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	81
Figura 41 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	82
Figura 42 – Determinação da CL_{50} do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	83
Figura 43 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	88
Figura 44 - Espectrometria UV da banda amarela de $R_f = 0,45$, do extrato hexânico de <i>P. marcgravii</i> , isolada por CCDP.....	89
Figura 45 – CCD do extrato hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> revelada em luz ultravioleta a 254 e 365nm.....	90
Figura 46 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> , revelada com $FeCl_3$	91
Figura 47 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> , revelada com bromocresol green PH range 3,8-5,4.....	92
Figura 48 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> , revelada com Draggendorff.....	93

Figura 49 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato hexânico de caule de <i>D. negrensis</i>	99
Figura 50 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> nas diferentes concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>D. negrensis</i>	100
Figura 51 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato hexânico de caule de <i>D. negrensis</i>	101
Figura 52 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de caule de <i>D. negrensis</i>	102
Figura 53 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de caule de <i>D. negrensis</i>	103
Figura 54 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato acetato de etila de <i>D. negrensis</i>	104
Figura 55 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato etanólico de caule de <i>D. negrensis</i>	105
Figura 56 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de caule de <i>D. negrensis</i>	106
Figura 57 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato etanólico de <i>D. negrensis</i>	107

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**POTENCIALIDADE ACARICIDA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper aduncum* L.
(Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris*
negrensis Benth (Fabaceae)**

Wilson Castro Silva

Caxias do Sul, 2008

Wilson Castro Silva

**POTENCIALIDADE ACARICIDA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper aduncum* L.
(Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris*
negrensis Benth (Fabaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Dra. Neiva Monteiro de Barros
Co-orientador: Prof. Dr. Horácio Heinzen

Caxias do Sul, 2008

Wilson Castro Silva

**POTENCIALIDADE ACARICIDA SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper aduncum* L.
(Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris*
negrensis Benth (Fabaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientador: Prof. Dr. Horácio Heinzen

Tese aprovada em 15 de dezembro de 2008.

Orientadora:
Prof^ª Dra. Neiva Monteiro de Barros

Membros da Banca
Prof^ª Dra. Maria Veronica Cesio

Co-orientador:
Prof. Dr. Horacio Heinzen

Prof. Dr. João Ricardo de Souza Martins

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Dedico

Ao meu Deus, meu criador, todo poderoso e em quem eu deposito minha fé e esperança, que, por meio da sua misericórdia, deu-me forças e iluminou-me com sabedoria para superar todos os obstáculos e concluir esta Tese, concedendo-me mais uma vitória em minha vida.

Aos meus pais Geraldo Silva e Maria Hilda Castro Silva que, com muita dificuldade, mas com muito amor me criaram e todos os dias estão ao meu lado, tanto na minha presença como na ausência, cobrindo-me com suas orações ao nosso Deus.

Aos meus filhos Wilson Júnior e Ana Paula, meus filhos amados, que pelas suas presenças em minha vida, mesmo distantes de mim, nos momentos difíceis em que chegava o desânimo, eram o motivo para eu levantar minha cabeça, renovar minhas forças e caminhar rumo à vitória.

A minha família que sempre esteve ao meu lado e foi meu suporte durante essa caminhada.

A todas as pessoas que me ajudaram e me incentivaram a alcançar mais um objetivo em minha vida.

Agradecimentos

A profa. Dra. Neiva Monteiro de Barros, pesquisadora da Universidade de Caxias do Sul, minha orientadora, pela acolhida e oportunidade que me concedeu de desenvolver esta Tese sob sua orientação; pelos ensinamentos e, principalmente, pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Horácio Heinzen pela co-orientação e contribuição nas análises químicas desse trabalho.

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo pelos ensinamentos, confiança e amizade.

À Dra. Joana D'Arc Ribeiro (in memorian), minha orientadora no mestrado, a qual ficaria muito orgulhosa deste momento.

À Dra. Hellen Emília Menezes de Souza, pessoa fundamental e de grande importância na minha vida, pelo incentivo, confiança e por sempre acreditar no meu potencial.

Aos pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia Dr. Carlos Cleomir e MSc José Maria Rodrigues pelos ensinamentos durante o mestrado, os quais foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. João Ricardo Martins, pesquisador do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), pelos valiosos ensinamentos e contribuição na cessão dos ácaros para os testes biológicos;

Ao Dr. Marcos Vinícius Bastos Garcia, pesquisador da EMBRAPA – Amazônia Ocidental – Manaus-Amazonas, pelo apoio e contribuição nesse trabalho com a elaboração dos gráficos de toxicidade.

À Dra. Maria Verônica Cesio e ao químico Maurício Mato pelos ensinamentos e colaboração na parte química deste trabalho.

A Dra. Luciana Atti Serafini pelos ensinamentos e por ser sempre prestativa nos momentos que precisei utilizar o Laboratório de Óleos Essenciais.

Ao Dr. Aldo Dillon pelas correções e sugestões realizadas na Tese.

Às colegas de curso de Doutorado Ana Carolina, Luciana Bavaresco e Fabiana Agostini pelo companheirismo e amizade.

Às colegas de laboratório, em especial à Lúcia Vargas e Francine Albrecht pelo apoio e amizade.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) pela elaboração dos extratos vegetais.

Ao Partido Comunista do Brasil (PC do B) que me apoiou nos momentos mais difíceis, ajudando-me na minha formação acadêmica e profissional, contribuindo, dessa forma, com a formação de mais um Doutor para a região amazônica e com o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

À Brigada Militar do Estado do Rio Grande do Sul, especialmente ao Corpo de Bombeiros Militar de Caxias do Sul, pelo apoio, amizade e companheirismo dos oficiais e praças.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

A Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade que me concedeu de cursar o Doutorado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Importância parasitária e econômica do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
2.2 Ciclo de vida do carrapato.....	6
2.3 Estratégias de controle e resistência do carrapato aos acaricidas.....	7
2.4 Aspectos biológicos de <i>Piper aduncum</i> , <i>Palicourea marcgravii</i> e <i>Derris negrensis</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Seleção e coleta do material botânico.....	31
3.2 Identificação do material botânico.....	31
3.3 Secagem e processamento do material botânico.....	31
3.4 Obtenção dos extratos.....	32
3.5 Extração de óleo essencial.....	32
3.6 Coleta dos carrapatos.....	32
3.7 Identificação do carrapato.....	32
3.8 Avaliação acaricida dos extratos de <i>P. aduncum</i> , <i>P. marcgravii</i> e <i>D. negrensis</i>	33
3.8.1 Avaliação acaricida sobre fêmeas ingurgitadas.....	33
3.8.2 Avaliação acaricida sobre larvas.....	34
3.8.3 Avaliação acaricida de óleo essencial de <i>P. aduncum</i> sobre larvas.....	35
3.9 Estudo Fitoquímico de <i>P. aduncum</i> e <i>P. marcgravii</i>	35

3.9.1 Análise química qualitativa e quantitativa dos extratos.....	36
3.9.2 Análise espectrométrica em ultravioleta (UV).....	37
3.10 Análise dos dados.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Atividade acaricida do extrato hexânico de <i>P. aduncum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	39
4.2 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de <i>P. aduncum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	43
4.3 Atividade acaricida do extrato etanólico de <i>P. aduncum</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	46
4.4 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. aduncum</i>	49
4.5 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. aduncum</i>	50
4.6 Atividade acaricida do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> sobre larvas de <i>R. microplus</i>	50
4.7 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com extratos de <i>P. aduncum</i>	51
4.8 Análise fitoquímica do extrato hexânico de <i>P. aduncum</i>	53
4.9 Atividade acaricida do extrato hexânico de <i>P. marcgravii</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	66
4.10 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de <i>P. marcgravii</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	70
4.11 Atividade acaricida do extrato etanólico de <i>P. marcgravii</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	77
4.12 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. marcgravii</i>	84
4.13 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>P. marcgravii</i>	85
4.14 Toxicidade de extratos acetato de etila e etanólico de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	85
4.15 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com extratos de <i>P. marcgravii</i>	87

4.16 Análise fitoquímica dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de <i>P. marcgravii</i>	88
4.17 Toxicidade de extratos de <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aduncum</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	97
4.18 Atividade acaricida do extrato hexânico de <i>D. negrensis</i> . sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	99
4.19 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de <i>D. negrensis</i> . sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	102
4.20 Atividade acaricida do extrato etanólico de <i>D. negrensis</i> . sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	105
4.21 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>D. negrensis</i>	108
4.22 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos de <i>D. negrensis</i>	109
4.23 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com extratos de <i>D. negrensis</i>	109
5 CONCLUSÕES	114
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. aduncum</i>	49
Tabela 2 – Percentual de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. aduncum</i>	49
Tabela 3 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. aduncum</i>	50
Tabela 4 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de <i>P. aduncum</i>	52
Tabela 5 – Mortalidade de fêmeas ingurgitadas, larvas e controle de reprodução de <i>R. microplus</i> reportados na literatura.....	63
Tabela 6 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. marcovii</i>	84
Tabela 7 – Percentual de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. marcovii</i>	84
Tabela 8 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de <i>P. marcovii</i>	85
Tabela 9 – Toxicidade de extratos vegetais para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> (concentração letal mediana – CL50).....	85
Tabela 10 – Toxicidade de extratos vegetais para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> (tempo letal mediano – TL50).....	86
Tabela 11 – Toxicidade de extratos vegetais para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> (concentração Inibitória mediana – CI50).....	86
Tabela 12 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de <i>P. marcovii</i>	87

Tabela 13 – Toxicidade de extratos vegetais para larvas de <i>R. microplus</i> (concentração letal mediana – CL50).....	97
Tabela 14 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de <i>D. negrensis</i>	108
Tabela 15 – Percentual de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de <i>D. negrensis</i>	108
Tabela 16 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de <i>D. negrensis</i>	109
Tabela 17 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de <i>D. negrensis</i>	110

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Compostos químicos encontrados em <i>P. aduncum</i> reportados por diversos autores.....	22
Quadro 2 - Compostos químicos encontrados em <i>P. aduncum</i> e seus respectivos grupos.....	23
Quadro 3 - Compostos químicos presentes na espécie vegetal <i>P. marcgravii</i> , reportados por diversos autores.....	26
Quadro 4 - Compostos químicos identificados em <i>P. marcgravii</i> e seus respectivos grupos.	26

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> ovipositando. Foto: Silva, W.C., 2007.....	4
Figura 2 – Ciclo de vida simplificado do <i>R. microplus</i> . 1- larva infestante realizando a fixação no bovino; 2- ninfa; 3- teleógina em estágio final de ingurgitamento (Fase parasitária); 4- teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5- ovos, no solo, em período de incubação; 6- larva, no solo, em período de incubação (Fase da vida livre) (Andreotti, 2002).....	6
Figura 3 – Ramos e folhas de <i>P. aduncum</i> . Foto: Silva, W.C., 2007.....	16
Figura 4 - Ramo de <i>P. marCGravii</i> com inflorescência. Foto: Silva, W.C., 2004.....	24
Figura 5 – Caule de <i>D. negrensis</i> . Foto: Silva, W.C., 2006.....	27
Figura 6 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	39
Figura 7 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	40
Figura 8 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	41
Figura 9 – Determinação da CL50 do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	42
Figura 10 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. aduncum</i>	43
Figura 11 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. aduncum</i>	44
Figura 12 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. aduncum</i>	45
Figura 13 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. aduncum</i>	46
Figura 14 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. aduncum</i>	47
Figura 15 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. aduncum</i>	48

Figura 16 – Percentuais de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	51
Figura 17 – Cromatografia gasosa do óleo extraído do extrato hexânico bruto de <i>P. aduncum</i> . 1-nerodiol (0,74%); 2-globulol (0,65%); 3-Espatuleno (0,64%); 4-croceína (1,91%); 5-dilapiol (94,84%); 6-apiol (0,38%).....	53
Figura 18 – Estruturas moleculares dos compostos presentes no óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	54
Figura 19 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i>	55
Figura 20 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> revelada em luz ultravioleta a 254 e 365nm.....	56
Figura 21 – Espectrometria UV da banda amarela de $R_f = 0,65$ do extrato hexânico de <i>P. aduncum</i> , isolada por Cromatografia em camada delgada preparativa.....	57
Figura 22 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> , revelada com H_2SO_4	58
Figura 23 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> , revelada com $FeCl_3$	59
Figura 24 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de <i>P. aduncum</i> , revelada com NPR.....	60
Figura 25 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	66
Figura 26 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> , submetidas às concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	67
Figura 27 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	68
Figura 28 – Determinação da CL_{50} do extrato hexânico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	69
Figura 29 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i>	70
Figura 30 – Determinação da CL_{50} do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	71
Figura 31 – Determinação do TL_{50} do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	72

	xv
Figura 32 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i>	73
Figura 33 – Determinação da CI50 do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	74
Figura 34 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i>	75
Figura 35 – Determinação da CL50 do extrato acetato de etila de folhas de <i>P. marcgravii</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	76
Figura 36 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	77
Figura 37 – Determinação da CL50 do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	78
Figura 38 – Determinação do TL50 do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	79
Figura 39 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> nas diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	80
Figura 40 – Determinação da CI50 do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	81
Figura 41 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	82
Figura 42 – Determinação da CL50 do extrato etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> para larvas de <i>R. microplus</i>	83
Figura 43 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i>	88
Figura 44 - Espectrometria UV da banda amarela de Rf = 0,45, do extrato hexânico de <i>P. marcgravii</i> , isolada por CCDP.....	89
Figura 45 – CCD do extrato hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> revelada em luz ultravioleta a 254 e 365nm.....	90
Figura 46 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> , revelada com FeCl3.....	91
Figura 47 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> , revelada com bromocresol green PH range 3,8-5,4.....	92
Figura 48 – CCD dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de <i>P. marcgravii</i> , revelada com Dragendorff.....	93

Figura 49 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato hexânico de caule de <i>D. negrensis</i>	99
Figura 50 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> nas diferentes concentrações de extrato hexânico de folhas de <i>D. negrensis</i>	100
Figura 51 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato hexânico de caule de <i>D. negrensis</i>	101
Figura 52 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de caule de <i>D. negrensis</i>	102
Figura 53 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato acetato de etila de caule de <i>D. negrensis</i>	103
Figura 54 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato acetato de etila de <i>D. negrensis</i>	104
Figura 55 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> submetidas a concentrações de extrato etanólico de caule de <i>D. negrensis</i>	105
Figura 56 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> em relação às concentrações de extrato etanólico de caule de <i>D. negrensis</i>	106
Figura 57 – Médias de mortalidade de larvas de <i>R. microplus</i> em relação às diferentes concentrações de extrato etanólico de <i>D. negrensis</i>	107

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S586p Silva, Wilson Castro
Potencialidade acaricida sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e estudo fitoquímico de *Piper aduncum* L. (*Piperaceae*), *Palicourea marcgravii* St. Hil (*Rubiaceae*) e *Derris negrensis* Benth (*Fabaceae*) / Wilson Castro Silva. -- 2008.
xvi, 128 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2008.
“Orientação: Prof^a. Dr^a. Neiva Monteiro de Barros”

1. Parasitologia animal – carrapato bovino. 2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 3. Plantas tóxicas. 4. Pragas – Controle biológico. 5. Extratos vegetais. I. Título.

CDU: 576.895.42

Índice para o catálogo sistemático:

1. Parasitologia animal – carrapato bovino	576.895.42
2. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	595.42
3. Plantas tóxicas	632.52
4. Pragas – Controle biológico	632.937
5. Extratos vegetais	547.913

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Servi Gonçalves – CRB 10/1500

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita que causa prejuízos econômicos à pecuária brasileira. Neste trabalho foi avaliada a potencialidade de extratos de *Palicourea marcgravii* e *Derris negrensis* e de extratos e óleo essencial de *Piper aduncum* para o controle de *R. microplus*. Extratos de folhas de *P. aduncum* e *P. marcgravii* e caules de *D. negrensis* foram preparados com os solventes hexano, acetato de etila e etanol. Avaliou-se a atividade dos extratos sobre carrapatos adultos nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100mg/ml, a fim de verificar a mortalidade e reprodução dos ácaros, observando-se que entre os extratos das três espécies avaliadas, o que apresentou maior potencial acaricida foi o extrato acetato de etila de *P. marcgravii*, o qual ocasionou taxas de mortalidade de fêmeas ingurgitadas entre 24 e 78%, estimando CL50 = 30,08 mg/ml; inibiu 100% da oviposição, estimando CI50 = 5,79 mg/ml. Avaliou-se, também, o efeito dos extratos das três plantas nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20mg/ml sobre larvas de *R. microplus*, verificando-se que o extrato acetato de etila de *P. marcgravii* foi o mais eficiente induzindo taxas de mortalidade que variaram de 30,32 a 95,11%, estimando CL50 = 2,46 mg/ml. A ação do óleo essencial de *P. aduncum* foi avaliada também em larvas, induzindo a mortalidade total das mesmas em todas as concentrações avaliadas. O óleo essencial foi analisado por Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massas (CG/EM) apresentando o dilapiol como composto majoritário(94,84%). Os extratos de *D. negrensis* não estimaram CL50 para fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus*. Estes resultados indicam a potencialidade acaricida dos extratos de *P. marcgravii* e do óleo essencial de *P. aduncum*, podendo ser uma alternativa de controle contra essa espécie de carrapato.

Palavras-chave: Plantas tóxicas, controle de pragas, extratos vegetais, carrapato bovino, *Piper aduncum*, *Palicourea marcgravii*, *Derris negrensis*, *Rhipicephalus microplus*.

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an ectoparasite that cause economic losses to brazilian livestock. In this work, it was evaluated the toxicity of *Palicourea marcgravii* and *Derris negrensis* extracts and *Piper aduncum* extracts and essential oil for *R. microplus*. Extract of leaves of *P. aduncum* and *P. marcgravii* and stems of *D. negrensis* were prepared with hexane, ethyl acetate and ethanol solvents. The extracts activity was evaluated on adult ticks at concentrations of 5, 25, 50, 75 and 100 mg/ml, in order to verify mortality and reproduction of the acarids, being observed that among the extracts of three species evaluated, one that showed higher acaricidal potential was the ethyl acetate extract of *P. marcgravii*, which caused mortality rates of engorged female between 24 and 78%, estimating CL50 = 30,08 mg/ml; it have inhibited 100% of the oviposition, estimating CI50 = 5,79 mg/ml. It was evaluated too the extracts effect of the three plants at concentrations of 1, 5, 10, 15 and 20 mg/ml on *R. microplus* larvae, verifying that the *P. marcgravii* ethyl extract was more efficient inducing mortality rates that ranged from 30,32 to 95,11%, estimating CL50 = 2,46 mg/ml. The action of *P. aduncum* essential oil was evaluated on larvae too, inducing the total mortality of the same ones in all concentrations evaluated. The essential oil was analyzed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled Mass Spectrum (GC/MS) showing dilapiol as the major compound (94,84%). The *D. negrensis* extracts didn't estimate CL50 for engorged female and larvae of *R. microplus*. These results indicate the acaricidal potential of the *P. marcgravii* extracts and *P. aduncum* essential oil, and could be an alternative of control against that tick species.

Keywords: Toxic plants, control of plagues, vegetable extract, cattle tick, *Piper aduncum*, *Palicourea marcgravii*, *Derris negrensis*, *Rhipicephalus microplus*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, totalizando 205,9 milhões de cabeças no ano de 2006, perdendo apenas para a Índia que não comercializa devido a questões religiosas. Esse rebanho teve uma redução de 0,6% em comparação com o efetivo do ano anterior que totalizou 207,1 milhões. Entretanto, em 2007, as exportações de carne bovina brasileira apresentaram aumento de 37%, mas, em 2008, atingiram 920,6 mil toneladas em volume, representando uma queda de 20,2% em relação aos cinco primeiros meses de 2007. Com estes resultados o Brasil mantém-se como o maior exportador mundial de carne bovina, superando a Austrália. Porém esse potencial de crescimento e exportação vem sendo ameaçado por diversos fatores prejudiciais à pecuária e um dos principais é o parasitismo dos bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Esse carrapato causa grandes prejuízos econômicos para a pecuária brasileira devido a diminuição da produção de carne e leite, baixa eficiência reprodutiva, transmissão de doenças e pelos gastos com medicamentos, prejudicando, assim, o agronegócio. Estima-se que, no Brasil, o carrapato *R. microplus* causa perda econômica em torno de dois bilhões de dólares ao ano.

O controle de carrapatos no Brasil tem sido um antigo problema dos produtores rurais. O principal instrumento utilizado ainda são os acaricidas sintéticos, aplicados geralmente por imersão e aspersão, em banhos periódicos. Esses banhos, muitas vezes de forma indiscriminada, têm ocasionado o aumento de cepas resistentes, levando ao desequilíbrio ecológico e contaminação do meio ambiente.

Os ingredientes ativos químicos à base de organofosforados, piretróides, amidina entre outros, aplicados nos bovinos sob a forma de pulverização, imersão, tratamentos “pour-on”, têm sido o principal meio de controle do *R. microplus*, demonstrando-se, porém, a crescente

resistência apresentada pelos carrapatos às moléculas químicas presentes nesses carrapaticidas. Quando ocorre a resistência por parte do parasita, o produtor frequentemente aumenta a dose do carrapaticida ou a frequência das aplicações. A resistência do *R. microplus* aos acaricidas disponíveis no mercado brasileiro é uma das principais preocupações dos produtores e técnicos.

Nas últimas décadas, os inseticidas químicos têm sido usados em grande escala na indústria, na agricultura e na pecuária, provocando poluição prejudicial ao ambiente. Por outro lado, resíduos de acaricidas no leite e na carne constituem um problema universal e de grande importância na saúde pública.

O controle biológico, utilizando linhagens de fungos, principalmente dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, é uma forma de controle do carrapato bovino que tem sido pesquisada como alternativa ao controle químico.

Outro método alternativo de controle desse ácaro é através da utilização de fitoterápicos. Diversas plantas de importância medicinal e toxicológica têm se destacado no Estado do Amazonas, tais como *Piper aducum*, *Palicourea marcgravii* e *Derris negrensis*. Pesquisas realizadas reportam que essas plantas apresentam atividade inseticida, bactericida e fungicida. Entretanto, não existem trabalhos na literatura demonstrando seus efeitos tóxicos sobre carrapatos.

A utilização de plantas tóxicas e medicinais no controle de pragas é de grande importância para a agricultura familiar e para o desenvolvimento sustentável. A grande diversidade de plantas da Amazônia possibilita a pesquisa de novos produtos que poderão vir a substituir ou diminuir o uso de defensivos químicos. Assim, o uso de extratos de *Piper aducum*, *Palicourea marcgravii* e *Derris negrensis* poderá ser uma alternativa para controlar o carrapato bovino *R. microplus* e minimizar os impactos ambientais causados pelos acaricidas sintéticos.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a potencialidade acaricida dos extratos de *P. aduncum*, *P. marcgravii* e *D. negrensis* sobre carrapato bovino (*R. microplus*) e realizar um estudo fitoquímico dessas espécies.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância parasitária e econômica do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *R. microplus* (Canestrini, 1887), originário da Ásia, é um aracnídeo pertencente à subclasse Acarina da classe Aracnida, família Ixodidae. É a única espécie deste gênero identificada no Brasil sendo o mais importante ectoparasita do rebanho bovino, sob o ponto de vista econômico (Gonzáles, 1975).

Figura 1 – Fêmea de *R. microplus* ovipositando. Foto: Silva, W.C., 2007.

Esse ectoparasita encontra-se distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Willadsen & Jongejan, 1999). Segundo Gonzáles (1974) encontra-se distribuído por todos os estados do Brasil, parasitando, principalmente, bovinos. Entretanto outras espécies podem comportar-se como hospedeiros, tais como: búfalos, equinos, jumentos, ovinos, caprinos, cães, gatos, porcos, veados, onças, preguiças, cangurus e coelhos (Arthur, 1960).

Os carrapatos são artrópodes hematófagos e importantes vetores de arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozoários para o homem e animais domésticos (Kaufman, 1989).

No Brasil, *R. microplus* é responsável pela transmissão da "Tristeza Parasitária Bovina", sendo que os agentes etiológicos dessa enfermidade são *Anaplasma marginale* (Theiler, 1912), *Babesia bovis* (Babes, 1888) e *B. bigemina* (Smith & Kilbourne, 1893).

Em relação aos prejuízos econômicos causados por esse carrapato no Brasil, Horn (1987), na década de 80, estimou ser da ordem de um bilhão de dólares por ano, sendo 40% por perdas na produção de leite, 27% pela mortalidade, 11% sobre o desempenho reprodutivo, 9% em gastos com acaricidas, 5% pela redução no ganho de peso, 5% em juros bancários, 3% pela má qualidade do couro e despesas no controle e prevenção das hemoparasitoses. Amaral et al. (2004) reportou que essas perdas seriam em torno de 2 bilhões de dólares ao ano. Atualmente acredita-se que os prejuízos causados por esse ácaro já ultrapassaram esse valor.

2.2 Ciclo de vida do carrapato

R. microplus é um parasita que depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida. Apresenta uma fase de vida livre, onde se encontra na pastagem, e outra fase de vida parasitária, que se encontra no animal (Figura 2).

A fase de vida livre inicia com a queda das fêmeas ingurgitadas e culmina quando as larvas eclodidas encontram um hospedeiro. Em condições ideais de temperatura e umidade, a teleógina inicia a postura três dias após sua queda ao solo, com período de postura em torno de 15 dias, depois do qual morre. Seis dias após a eclosão, a larva está pronta para subir nas pastagens por geotropismo negativo, localizando o hospedeiro pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, pelo estímulo visual e pelo gradiente de concentração de CO₂ (Sonenshime, 1993).

Figura 2: Ciclo de vida simplificado do *R. microplus*. 1- larva infestante realizando a fixação no bovino; 2- ninfa; 3- teleógina em estágio final de ingurgitamento (Fase parasitária); 4- teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5- ovos, no solo, em período de incubação; 6- larva, no solo, em período de incubação (Fase de vida livre) (Andreotti, 2002).

Em condições favoráveis de temperatura entre 21,1°C e 36,6°C e umidade acima de 80%, a fase de vida livre dura em torno de 32 dias (González, 1995), durante os quais o carrapato

não se alimenta e sobrevive exclusivamente das suas reservas (Farias, 1995).

A larva infestante, ao entrar em contato com o animal, fixa-se em regiões do corpo do hospedeiro que favorecem seu desenvolvimento, tais como: úbere, mamas, regiões perineal, barbela e entrepernas, dando início a fase parasitária. Essas regiões preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso às lambidas do hospedeiro (Wagland, 1978). Após a fixação, as larvas se desenvolvem até a fecundação e ingurgitamento total das teleóginas. Nesta fase, o carrapato é pouco afetado pelas condições climáticas ambientais (Riek, 1965). Seis a oito dias após fixação, a

larva evolui para ninfa e posteriormente, em mais seis a oito dias, evolui para adulto atingindo maturidade. Após o acasalamento, que ocorre, geralmente, em torno do 21° ao 22° dias após a fixação, as fêmeas se alimentam e ingurgitam até caírem no solo. O macho continua no animal a procura de outras fêmeas (Londt & Arthur, 1975).

As condições ambientais e o grau de resistência do hospedeiro podem influenciar no tempo de duração do ciclo de vida parasitário do carrapato (Roberts, 1968) e no peso das teleóginas (Hewetson, 1972).

2.3 Estratégias de controle e resistência do carrapato aos acaricidas

A principal estratégia utilizada para o controle do carrapato é o uso de acaricidas, aplicados principalmente por meio de aspersão ou banho de solução aquosa. Nos últimos anos, outras formas de administração foram sendo desenvolvidas para facilitar o manejo e aumentar a

eficiências tais como: aplicações dorsais (“pour-on”), onde o produto pode ter ação sistêmica ou

por contato e aplicação injetável, onde o produto atua por ação sistêmica (Andreotti, 2002).

Os Estados Unidos, na década de 40, conseguiram erradicar *R. microplus* utilizando

técnicas de manejo e uso sistemático de produtos químicos. Na década de 50, Porto Rico também

conseguiu a erradicação a partir do uso de acaricida e controle de cervídeos. O mesmo sucesso de

controle não foi obtido em alguns países da América do Sul (Graham & Hourrigan, 1977).

Atribuiu-se o insucesso destes países às linhagens de carrapatos resistentes aos acaricidas empregados e ao fato de que essa espécie parasita outros hospedeiros (Amaral et al., 1974).

No Brasil, o uso de acaricidas químicos é a medida de controle profilático e

terapêutico mais comum contra esses ectoparasitos. De acordo com Bullman et al. (1996), os

principais problemas relacionados com essa prática devem-se ao desenvolvimento de linhagens resistentes de carrapatos, aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal (leite e carne) e poluição ambiental proveniente do uso de acaricidas.

O uso abusivo de acaricidas leva a um número elevado de sérios problemas: custo do

manejo, custo da dose e período de proteção. Além disso, o uso sistemático de acaricidas pode promover a seleção de linhagens de carrapatos acaricida-resistentes, diminuindo o período de proteção dos produtos e aumentando o custo de tratamento (Andreotti, 2002).

O controle químico utilizando acaricidas começou no século XX com os compostos

arsenicais, sendo que desde a década de 30, registram-se casos de resistência a este princípio ativo. Os produtos organoclorados, DDT, BHC e toxafeno, sanaram o problema da resistência aos

arsênicos durante a década de 40. No início da década de 50, os organofosforados e carbamatos começaram a ser usados. Vinte anos mais tarde (década de 70) iniciou-se o uso das formamidinas

(Wharton, 1976) e, logo após, o uso dos piretróides sintéticos (Pereira, 1982).

As drogas mais utilizadas nas propriedades brasileiras têm sido os derivados de piretróides, amitraz, organofosforados, fipronil, ivermectinas e benzoil fenil uréia (Da Silva Vaz Jr, 1997). Resistência às formamidinas e aos piretróides vem sendo observada desde a década de 80 (Hewtson, 1972; Alves Branco et al., 1992).

Novas alternativas de controle do carrapato vêm sendo estimuladas apesar de suas respostas ainda serem pouco expressivas. Os métodos são os mais variados: seleção e introdução de bovinos resistentes aos carrapatos, cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas, descanso de pastagens e rotação com agriculturas (Sutherst et al., 1982; Martins, 2004); rotação de pastagens (Elder et al., 1980); manejo de predadores naturais, como a Egretta íbis e garça vaqueira (Alves Branco et al., 1983) e formigas (Gonzáles, 1995); uso de microrganismos como fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* (Bittencourt et al., 1999; Kaaya & Hassan, 2000; Onofre et al., 2001; Fernandes et al., 2002; Campos et al., 2005; Bahiense et al., 2006); bactérias como a *Cedecea lapagei* (Brum, 1988); e o uso de extratos vegetais (Borges et al., 2005; Pereira & Famadas, 2006; Novelino et al., 2007; Fernandes & Freitas, 2007; Ribeiro et al., 2008a).

O uso de extratos vegetais também tem sido uma alternativa pesquisada e uma das principais vantagens da sua utilização em relação aos produtos químicos sintéticos se refere ao fato de que os produtos de origem vegetal, ao contrário dos produtos sintéticos, podem ter mais de um princípio ativo agindo sinergicamente, potencializando a atividade inseticida da planta e ainda dificultando a capacidade dos carrapatos tornarem-se resistentes aos seus efeitos (Mgbojikwe & Okoye, 2001); a sua vantagem em relação aos fungos se deve ao fato de sua ação sobre o ácaro ser em menor período de tempo, devido o processo infectivo desses microrganismos ser mais lento sobre o hospedeiro, além de necessitar de condições ambientais favoráveis para desenvolver o ciclo completo da relação fungo-hospedeiro (Alves, 1998).

O Ministério da Agricultura do Brasil (1990) instituiu normas de produção, controle e utilização de produtos antiparasitários, estabelecendo que, para obtenção de registro de acaricidas

em espécies animais, o produto deve controlar no mínimo 95% dos ácaros.

A ação larvicida de 33 produtos sintetizados, através da técnica de clorossulfonação

da (+)-cânfora e da (+)-isopinocanfona, em larvas de *R. microplus*, foi avaliada por Chagas et al.

(2002b). Verificou-se que 10mg desses produtos, solubilizados em acetona e acetato de etila, não

induziram a mortalidade significativa das larvas e a sobrevivência variou entre 95,1 a 100%.

A sensibilidade de *R. microplus* a solventes, como álcool metílico, álcool etílico,

acetona, acetato de etila, triton e xilol foi analisada em estudos realizados por Chagas et al.

(2003), verificando que as fêmeas ingurgitadas foram mais sensíveis do que as larvas.

Na avaliação *in vitro* realizada para verificar a eficácia do clorfenvinfós e cialotrina

sobre a reprodução de *R. microplus*, coletados de bovinos, de 22 propriedades rurais, localizadas

em 13 municípios que compõem a bacia leiteira da microrregião de Goiânia, Silva, et al. (2000)

observaram que o clorfenvinfós, na concentração de 500 ppm, inibiu em 100% a reprodução,

enquanto a cialotrina, na concentração de 45 ppm, inibiu 77%.

O organofosforado coumafós foi avaliado em várias concentrações por Davey et al.

(2003) em larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, os quais verificaram que esse acaricida

químico induziu a mortalidade acima de 98% de larvas; para as teleóginas, os percentuais de

mortalidade variaram de 4,3 a 73,5% e o controle de reprodução variou de 52,9 a 89,7%.

Em estudos realizados “*in vitro*” com uma cepa de campo de *R. microplus* resistente

ao produto químico amitraz, Vargas et al. (2003) observaram que o cymiazol e amitraz, nas

concentrações comerciais recomendadas, causaram um percentual de controle de 58,69 e 58,41%

respectivamente.

Foi observada por Campos Júnior & Oliveira (2005) a eficiência do amitraz (12,5%); deltametrina (50%); associação de cipermetrina (5,0%) e diclorvos (45%); e associação química de triclorfon (77,6%), coumafós (1,0%) e cyfluthrin (1,0%) sobre *R. microplus*, colhidos em fazendas na região do município de Ilhéus-Bahia, no período de abril a setembro de 2000. A maior eficiência foi obtida pela associação cipermetrina e diclorvos que conseguiu inibir a reprodução em 75,73% e a menor foi pelo amitraz que inibiu 30,95%.

Na avaliação “in vitro” da eficácia de formulações comerciais de carrapaticidas em teleóginas de *R. microplus* coletadas de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, verificou-se, por meio do teste de imersão, baixa eficácia de produtos dos grupos químicos

piretróides sintéticos, os quais controlaram 28,24% da reprodução (Pereira, 2006b).

Analisando a susceptibilidade do *R. microplus* a cipermetrina e amitraz em 19 propriedades do planalto catarinense, com o objetivo de verificar o percentual de propriedades onde esse ácaro é resistente aos dois acaricidas, Souza et al. (2006a) observaram que a cipermetrina inibiu a reprodução de 95 a 100% em apenas duas propriedades; o amitraz atingiu o

mesmo percentual de inibição em dezoito.

A ação de cipermetrina sobre larvas de *R. microplus* foi analisada por Souza et al. (2006b) nas concentrações de 1,17 a 150 ppm, registrando-se uma CL50 de 2,99 ppm, enquanto que para o amitraz, nas concentrações de 1,95 a 250 ppm, uma CL50 de 17,22 ppm foi registrada.

Na avaliação da sensibilidade de populações de carrapatos *R. microplus* a acaricidas químicos, no período de 1997 a 2006, na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, observou-se resistência dos carrapatos à maioria dos acaricidas. Entretanto a associação do piretróide cipermetrina e do organofosforado clorpirifós apresentou eficiência média de 98,6% (Furlong et al., 2007).

A patogenicidade do fungo *Metarhizium flavoviride* sobre *R. microplus* foi avaliada por Onofre et al. (2001), os quais observaram que esse microrganismo foi efetivo como agente de

controle biológico inibindo 60,02% da reprodução de fêmeas ingurgitadas.

Utilizando fungo *Metarhizium anisopliae*, isolado E9, Basso et al. (2005) avaliaram a eficiência do controle exercido por esse microrganismo na população de *R. microplus* em pastagens, e observaram que nas avaliações realizadas entre o 35° e o 48° dias de infestação, houve um controle médio de 90,5% de larvas.

A linhagem B 95 do fungo *Beauveria amorpha* foi analisada sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, induzindo a mortalidade de 32,40% e efetuando um controle de reprodução de 86,54%. A linhagem CG 478 do fungo *B. bassiana* induziu a mortalidade de 29,20% e controlou 83,42% da reprodução (Campos et al., 2005).

Na avaliação do potencial acaricida do fungo *M. anisopliae* e do produto químico deltametrina realizada por Bahiense et al. (2006), os investigadores observaram que, dez dias após os tratamentos, as taxas de mortalidade de larvas de *R. microplus* variaram de 10 a 96,9%, com a aplicação do fungo, e de 7 a 36,5% quando submetidas à deltametrina nas diferentes concentrações estabelecidas.

Nas pesquisas realizadas por Alonso-Diaz et al. (2007) para avaliar a eficiência do fungo *M. anisopliae*, linhagem Ma34, no controle de *R. microplus* em bovinos infestados naturalmente no México, verificou-se que, durante sessenta dias, após quatro tratamentos com aplicação do fungo realizado a cada quinze dias, os resultados foram eficientes, apresentando taxas de mortalidade que variaram de 40 a 91,2%.

A atividade acaricida de d(+)-limoneno, um monoterpene presente no óleo de *Citrus* spp, sobre *R. microplus* foi avaliada por Chungsamarnyart & Jansawan (1996). Os autores

verificaram que o d(+)-limoneno, diluído em etanol 95%, induziu a mortalidade de 17% de fêmeas ingurgitadas em sete dias.

Nas pesquisas realizadas para avaliar o efeito acaricida dos óleos essenciais de três espécies de eucalipto (*E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana*) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, observou-se que *E. citriodora*, nas concentrações de 5% e 10% de óleo puro, respectivamente, induziu a mortalidade de 47% e 100% de larvas e 45% e 73% de fêmeas ingurgitadas. *E. globulus*, nas mesmas concentrações, causou a mortalidade de 0,7% e 48% de larvas e 98,5% e 100% de fêmeas ingurgitadas. Com *E. staigeriana*, nas mesmas concentrações, a mortalidade de larvas foi de 96% e 100% e de fêmeas ingurgitadas 91% e 94% (Chagas et al., 2002a).

Em estudos realizados por Farias et al. (2007), a fim de analisar a toxicidade do óleo essencial da planta *Carapa guianensis* para *R. microplus*, verificou-se que esse óleo foi altamente tóxico para fêmeas ingurgitadas, induzindo a mortalidade de 100% e inibindo 100% da reprodução.

Ao avaliarem a atividade acaricida de óleo essencial de *Copaifera reticulata* sobre larvas de *R. microplus*, Fernandes & Freitas (2007) constataram concentração letal mediana de 1570 ppm em 24 horas.

Testes biológicos utilizando óleo essencial de *Drimys brasiliensis* foram realizados por Ribeiro et al. (2008b) em carrapato bovino *R. microplus*, verificando-se um grande potencial acaricida desse óleo, induzindo 100% de mortalidade de larvas.

Nos resultados obtidos em estudos realizados por Novelino et al. (2007), os quais avaliaram o efeito acaricida do timol, mentol, ácido salicílico e metil salicilato sobre larvas de *R.*

microplus, constatou-se que, após 24 horas, dos quatro produtos testados somente o timol causou

100% de mortalidade de larvas e os percentuais de mortalidade obtidos pelos demais produtos variaram de 0,52 a 9,76%.

Em estudos realizados para analisar o efeito do extrato etanólico das folhas de

Azadirachta indica sobre larvas do carrapato bovino *R. microplus*, Chungsamarnyart et al. (1991)

realizaram testes biológicos com duração de 24 e 48 horas e observaram que, nesses períodos de tempo, a mortalidade foi de aproximadamente 10%.

O efeito do extrato etanólico de *Artocarpus altilis* e *Azadirachta indica* sobre a

reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foi avaliado por Williams (1993), obtendo-se

controle de 50% da reprodução nas concentrações de 46 e 54 mg/ml.

O potencial acaricida do extrato aquoso de *Adenium obesum*, planta que apresenta na

sua composição química glicosídeos cardiotônicos, foi avaliado sobre *R. microplus* por

Mgbojikwe & Okoye (2001), verificando-se 89,5% de mortalidade de larvas e 75,1% de inibição

da reprodução de fêmeas ingurgitadas.

A atividade larvicida dos extratos de *Sesbania virgata*, *Tabebuia ochraceae*, *Tecoma*

stans e do produto químico amitraz foi analisada sobre larvas de *R. microplus*, observando que o

extrato etanólico de *T. stans* demonstrou maior eficiência em relação aos outros extratos vegetais,

com CL50 de 73,82 mg/ml, entretanto, foi menos eficiente em relação ao produto químico amitraz

cuja CL50 foi de 26 mg/ml (Mendes et al., 2002).

A eficácia dos extratos de *Melia azedarach* foi testada “in vitro” em *R. microplus* por

Borges et al. (2003), os quais observaram que o extrato etanólico induziu 50% de mortalidade de

larvas, no período de 168 horas, apresentando eficiência de 46% no controle de reprodução.

Avaliando o efeito do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, Borges et al. (2005) verificaram que, durante 21 dias, o percentual de controle de reprodução foi em média 27,3%.

A atividade acaricida do extrato hexânico de *Calea serrata* (Asteraceae) sobre *R. microplus* foi avaliada por Ribeiro et al. (2008a), os quais observaram que esse extrato, rico em cromenos na sua composição, apresentou toxicidade para larvas, induzindo a mortalidade de 100% das mesmas após 48 horas de contato.

2.4 Aspectos biológicos de *Piper aduncum*, *Palicourea marcgravii* e *Derris negrensis*

P. aduncum é um arbusto com caule nitidamente nodoso, com folhas membranáceas ou cartáceas, elíptico-ovadas ou elíptico-lanceoladas, o ápice curtamente acuminado e a base assimétrica, arredondada ou cordiforme, opaca em ambas as faces, sendo a inferior finamente pubescente; nervação com pêlos quase adpressos; inflorescência em espigas alongadas, com flores minúsculas, aclamídeas ou nuas, e frutos drupas obpiramidais amareladas, com minúscula semente marrom; com altura variando entre 2 a 7 metros (Albuquerque, 1980).

É uma planta conhecida popularmente, como: pimenta-longa, pimenta-de-macaco, aperta-ruão, tapa-buraco, pimenta-de-fruto-ganchoso (Maia et al., 2001) e, também, como jaguarandi (Yuncker, 1975).

Essa espécie tem ocorrência em áreas abertas do tipo savana e floresta secundária, em solo argiloso e areno-argiloso. É considerada uma planta invasora que emerge nas rodovias recém-abertas em áreas de floresta de terra firme e apresenta ampla distribuição no norte e nordeste do Brasil (Maia et al., 2001). De acordo com Yuncker (1975), essa planta se distribui através da América do Sul, podendo ser encontrada em toda a Amazônia brasileira, no Peru e na Bolívia.

A partir dos ramos e folhas de *P. aduncum* pode ser extraído óleo essencial, que tem como componente majoritário o fenilpropanóide dilapiol, o qual, de acordo com Maia et al. (1998), apresenta atividade inseticida e também é uma substância que atua sinergicamente com diversos inseticidas naturais.

Figura 3 – Ramos e folhas de *P. aduncum*. Foto: Silva, W.C., 2007.

P. aduncum possui grande potencial de exploração econômica em função da comprovada utilidade do seu óleo essencial na agricultura e saúde humana (Gaia et al., 2004).
As

espécies desse gênero são amplamente aplicadas na medicina popular em função das propriedades microbianas exibidas por seus constituintes (Bastos & Albuquerque, 2004).

O óleo essencial de *P. aduncum* no controle de adultos de *Callosobruchus maculatus* foi avaliado por Pereira (2006a), verificando-se mortalidade de 100% dos insetos

Em estudos toxicológicos realizados por Fazolin et al. (2007), a fim de verificar a atividade inseticida do óleo essencial de *P. aduncum* sobre larvas de *Tenebrio molitor*, os autores

verificaram que o óleo essencial dessa Piperaceae, nas concentrações de 7,5% (v.v-1) e 10,0% (v.v-1), causou a mortalidade de 100% de larvas.

Nas pesquisas realizadas com extrato de folhas de *P. aduncum*, extraído com éter de petróleo bruto, sobre *Biomphalaria glabrata*, conhecido como vetor de esquistossomíase, verificou-se que houve forte atividade moluscicida (Maia et al., 1998).

Na avaliação da atividade inseticida do extrato aquoso de folhas de *P. aduncum* sobre adultos de *Aethion* sp., praga de importância econômica no Estado do Amazonas, Silva et al. (2007) verificaram que a concentração letal mediana foi de 20,9 mg/ml.

O efeito sinérgico do dilapiol com diversos inseticidas botânicos e extratos de plantas foram avaliados por Bhuiyan et al. (2001) em larvas de quarto ínstar de *Spodoptera litura*, observando-se mortalidade significativa das larvas. Esse efeito sinérgico do dilapiol foi reportado

também por Fazolin et al. (2005).

De oito amostras de *P. aduncum*, coletadas em diferentes localidades da região amazônica, o dilapiol foi o componente majoritário encontrado no óleo essencial extraído de folhas e ramos finos. Dos diversos locais onde a planta foi coletada, a que apresentou maior

rendimento de óleo e concentração do composto foi a coletada em Manaus-Amazonas, com 3,4%

e 91,1%, respectivamente (Maia et al., 2001).

Os principais constituintes dos óleos essenciais de algumas espécies da Amazônia pertencentes à família Piperaceae, coletadas em Benfica no Estado do Pará, foram investigados por Gottlieb et al. (1981), os quais verificaram, nas folhas de *P. aduncum*, a presença de dilapiol (74,5%), monoterpenos (14,1%) e sesquiterpenos (11,4%).

Cinco novos derivados do ácido p-hidroxibenzoico prenilado, com atividade antimicrobiana e moluscicida de folhas de *P. aduncum* foram isolados por Orjala et al. (1993): Me 3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-4-metoxibenzoato; 1-(1-metiletil)-4-metil-3-ciclohexenil-3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-hidroxibenzoato; 1-(1-metiletil)-4-metil-3-ciclohexenil-3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-metoxibenzoato; Me 3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-metoxibenzoato e 4-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico ácido. Esses autores verificaram também a presença de dilapiol, miristicina e três sesquiterpenos (humuleno, cariofileno epóxido e humuleno epóxido).

Espécies de Piperaceas foram analisadas por Santos et al. (2001), os quais reportaram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides (apiol, dilapiol, miristicina, safrol, sarisan), apresentando interessantes propriedades biológicas.

Ao analisarem os compostos químicos presentes no extrato diclorometano de folhas de *P. aduncum*, Orjala et al. (1994) encontraram três novas diidrochalconas: piperaducinas A(3),

B(4) e C(5), as quais apresentaram atividade citotóxica e antibacteriana.

Estudos químicos com *P. aduncum* revelaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, cromenos (B-pireno, mirceno, cineol, copaeno, cariofileno, eupatoriocromeno),

ácido benzóico, flavonóides e diidrochalcona (Burke & Nair, 1986; Orjala et al., 1993; Moreira et

al., 1998). Algumas destas substâncias apresentaram atividade antifúngica, antibactericida e citotóxica (Orjala et al., 1994; Okunade et al., 1997).

Os compostos químicos ácidos 2,2-dimetil-2H-1cromeno-6-carboxílico e 3-(3',7'-dimetil-1-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzóico de folhas de *P. aduncum* foram isolados por análise espectrométrica de dados incluindo ES-MS, sendo testados contra mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, observando-se danos ao DNA (Baldoqui et al., 1999).

O componente químico 2',6'-Dihidroxi-4'-metoxichalcona foi purificado de extrato diclorometano de inflorescência de *P. aduncum*. Esse componente apresentou significativa atividade intracelular "in vitro" contra promastigotos e amastigotos de *Leishmania amazonensis* (Torres-Santos et al., 1999).

Em pesquisas realizadas para verificar o constituinte majoritário presente nas folhas de *P. aduncum* proveniente de Cuba, Pino et al. (2004) constataram que essa espécie contém dilapiol (82,2%) como o componente majoritário.

No estudo fitoquímico de sete espécies do gênero *Piper* realizados por Mesquita et al. (2005), os autores relataram que o composto químico E-nerolidol foi o principal constituinte encontrado em *P. aduncum*, seguido do linalol e piperitona.

Os componentes majoritários dos óleos voláteis podem variar de acordo com o ambiente e as condições edafoclimáticas, porém Simões e Spitzer (2003) relataram que a maioria dos óleos essenciais apresenta na sua composição química fenilpropanóides e terpenóides e, nesses, predominam os monoterpenos e sesquiterpenos.

Os óleos das plantas apresentam na sua composição uma concentração maior de substâncias voláteis e a sua atividade biológica pode ser atribuída, principalmente, à presença de terpenóides e esteróides (Fernandes et al., 2002).

Os extratos apolares contêm compostos com características lipofílicas em sua composição química, como terpenóides (Falkenberg et al., 1999). Estes são um grupo de metabólitos secundários voláteis com atividade inseticida (Viegas Júnior, 2003) que causa distúrbios fisiológicos, alterando o desenvolvimento e a funcionalidade de várias espécies de insetos, principalmente devido à ação de repelência alimentar, inibição do crescimento e da reprodução, podendo também causar a morte (Schmutterer, 1990).

A ação de alguns terpenos e fenilpropanóides sobre o receptor octapaminas que age como neurotransmissor, neurohormonal e neuromodulador nos invertebrados foi observada por Price & Berry (2006).

Aduncumeno (8) foi isolado e caracterizado como o maior metabólito secundário derivado do ácido benzóico proveniente de *P. aduncum*. Esse composto foi testado contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. Sphaerospermum*, apresentando atividade antifúngica (Lago et al., 2004).

Em análises por cromatografia líquida de alta performance do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *P. aduncum*, identificou-se como compostos majoritários o fenilpropanóide dilapiol e o derivado de ácido benzóico prenilado, metil 4-hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil) benzoato (Oliveira et al., 2005).

Na avaliação da composição química de óleos essenciais de folhas de *P. aduncum*, proveniente do Panamá e Bolívia, verificou-se que as amostras coletadas no Panamá foram caracterizadas pelo alto percentual de sesquiterpenos hidrocarbonetos (38,9%), sendo os principais β -cariofileno (17,4%) e aromadendreno (13,4%); as amostras coletadas na Bolívia apresentaram alto percentual de monoterpenos (76%), sendo o constituinte majoritário 1,8-cineol que apresentou 40,5% (Vila et al., 2005).

Os constituintes voláteis do óleo essencial de seis amostras de *P. aduncum* proveniente de diferentes regiões do Estado de Pernambuco foram analisados por de Oliveira et al. (2006), os quais identificaram a presença de sesquiterpenos e monoterpenos e, dos vinte compostos identificados, o (E)-nerolidol foi o principal em todas as amostras.

Na análise química do óleo essencial de *P. aduncum* realizada por cromatografia gasosa, constatou-se a presença de dilapiol (73,97), safrol (3,92) e sarisan (2,84) como componentes majoritários (Estrela et al., 2006).

Em investigações realizadas por Rali et al. (2007), a fim de verificar os constituintes químicos voláteis de *P. aduncum*, proveniente da Papua-Nova Guiné, os autores constataram que

as análises realizadas indicaram a presença de β -cariofileno (8,2 %), piperitona (6,7 %), α -humuleno (5,1 %) e como componente majoritário o dilapiol (43,3%).

Em pesquisas realizadas, a fim de analisar a composição química do óleo essencial extraído de folhas de *P. aduncum* proveniente de Cuba, Abreu & Pino (2008) verificaram a presença de 83 compostos, sendo a cânfora (18,1%) e canfeno (15,6%) os compostos majoritários.

Os compostos químicos presentes em *P. aduncum* e seus respectivos grupos, reportados na literatura, encontram-se listados nos quadros 1 e 2 respectivamente.

Quadro 1 – Compostos químicos encontrados em *P. aduncum* reportados por diversos autores.

Espécie vegetal Composto químico Referência bibliográfica

Dilapiol. Monoterpenos e

sesquiterpenos

Gottlieb et al. (1981)

Dilapiol, ácido p-hidroxibenzóico

prenilado, miristicina e

Sesquiterpenos (humuleno,

cariofileno epóxido e humuleno

epóxido)

Orjala et al. (1993)

Diidrochalconas [piperaducinas

A(3), B(4) e C(5)]

Orjala et al. (1994)

Monoterpenos, sesquiterpenos,

cromenos (β -pireno, mirceno,

cineol, copaeno e cariofileno),

ácido benzóico, flavonóide e

diidrochalcona.

(Burke & Nair, 1986; Orjala et al.,

1993; Moreira et al., 1998)

Ácidos 2,2-dimetil-2H-1cromeno-

6-carboxílico e 3-(3',7'-dimetil-1-

2',6'-octadienil)-4-

metoxibenzóico

Baldoqui et al. (1999)

2',6'-Dihidroxi-4'-

metoxichalcona

Torres-Santos et al. (1999)

Dilapiol

(Maia et al., 2001; Pino et al.,

2004)

Derivado do ácido benzóico

aduncumeno (8)

Lago et al. (2004)

Dilapiol e o derivado de ácido

benzóico prenilado metil 4-

hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil)

benzoato.

Oliveira et al. (2005)

Sesquiterpenos hidrocarbonetos

(β -cariofileno, aromadendreno) e

monoterpeno (1,8-cineol)

Vila et al. (2005)

Sesquiterpenos, monoterpenos e

(E)-nerolidol.

Oliveira et al. (2006)

Dilapiol, safrol e sarisan Estrela et al. (2006)

Sesquiterpenos (β -cariofileno, α -

humuleno) monoterpeno

(piperitona) e dilapiol

Rali et al. (2007)

P. aduncum

Cânfora e canfeno Abreu & Pino (2008)

Quadro 2 – Compostos químicos encontrados em *P. aduncum* e seus respectivos grupos.

Espécie vegetal	Grupo químico	Composto químico
	Fenilpropanóide	Dilapiol, safrol, miristicina, sarisan
	Monoterpeno	1,8-cineol, piperitona, cânfora, canfeno, β -pireno, mirceno, copaeno
	Sesquiterpeno	humuleno, cariofileno epóxido, humuleno epóxido, β -cariofileno, aromadendreno, Enerolidol, α -humuleno
	Benzoato prenilado	ácido p-hidroxibenzóico prenilado; 3-(3',7'-dimetil-1-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzóico; metil 4-hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil) benzoato; aduncumeno (8)
	Cromeno	ácidos 2,2-dimetil-2H-1cromeno-6-carboxílico

P. aduncum

Flavonóide 2',6'-Dihidroxi-4'-metoxichalcona;

Diidrochalconas [piperaducinas A(3), B(4),

C(5)];

A espécie *P. marcgravii*, pertencente à família Rubiaceae, é uma planta conhecida pelos nomes populares de cafezinho, café-bravo, erva-do-café, erva-de-rato, roxa, roxona e vick (Hoehne, 1932; Tokarnia et al., 1979).

É um arbusto lenhoso, nodoso e quebradiço, que pode atingir até quatro metros de altura. As folhas são opostas, oblongo-lanceoladas, cartáceas; nervação penínérvea; possui o dorso arroxeado quando jovem. O caule e as folhas exalam, quando esmagados, nítido odor de salicilato de metila, cheiro característico do Balsamo de Bengué. Os frutos são pequenas drupas arredondadas costadas, biloculares, inicialmente avermelhadas passando a roxo-escuras, quase pretas na maturação (Saint-Hilaire, 1824 apud Tokarnia et al., 1979).

É uma planta com ampla distribuição geográfica no Brasil, exceto no extremo sul e sertão do nordeste. Ocorre somente na terra firme e, devido à necessidade de sombreamento, cresce apenas e, principalmente, nas bordas de floresta, em capoeiras e ainda em pastos recém formados (Hoehne, 1932; Tokarnia et al., 1979).

Quanto ao princípio ativo de *P. marcgravii*, verificou-se a presença do ácido monofluoroacético, substância que interfere no metabolismo energético das células, isto é, no ciclo de Krebs (Tokarnia et al., 1979).

A atividade inseticida do extrato aquoso de *P. marcgravii* sobre adultos de *Aetalion* sp., foi avaliada por Silva (2005), observando-se concentração letal mediana de 39,9 mg/ml.

Foi analisada a toxidez de três concentrações de extrato aquoso de *P. marcgravii* para pulgão verde dos citros (*Aphis spiraecola*) em casa de vegetação, constatando-se mortalidade de

Figura 4 - Ramo de *P. marcgravii* com inflorescência. Foto: Silva, W.C., 2004.

50% dos insetos em todas as concentrações nas primeiras 12 horas de observação, estimando $CL_{50} = 47,02$ mg/ml (Gonzaga et al., 2007).

Verificou-se a presença de ácido salicílico, o-metoxi-ácido benzóico e N-metil tiramina em análises químicas realizadas com as folhas de *P. marcgravii* (Cascon & Moraes, 1962).

Análises químicas de folhas de *P. marcgravii*, coletadas no Estado da Bahia, realizadas por Gorniak et al. (1986), mostraram a presença de alcalóide xantinico e cafeína.

Com a finalidade de investigar componentes químicos presentes nas folhas de *P. marcgravii*, coletadas no Estado de São Paulo, Morita et al. (1989) realizaram estudos fitoquímicos dessa espécie e isolaram o alcalóide glicosídico denominado palicosido.

A presença de monofluoracetato em *P. marcgravii* foi relatada por De-MoraesMoreau et al. (1995), que realizaram fracionamento do extrato cru de folhas dessa Piperaceae

utilizando solvente de diferentes polaridades. Este ácido também foi identificado nas folhas dessa

planta por Oliveira (1963).

Investigação química em folhas de *P. marcgravii*, coletadas no Estado do Pará, realizada por Kemmerling (1996), possibilitou o isolamento de dois componentes: a Nmetiltiramina e 2-metiltetrahydro- β -carbonila.

Os compostos químicos encontrados em *P. marcgravii* e seus grupos químicos, reportados na literatura, estão decritos nos quadros 3 e 4 respectivamente.

Quadro 3 – Compostos químicos presentes na espécie vegetal *P. marcgravii*, reportados por diversos autores.

Espécie vegetal Composto químico Referência bibliográfica

o-metoxi-ácido benzóico e Nmetil tiramina

Cascon & Moraes (1962)

Ácido monofluoracético (Tokarnia et al., 1979)

alcalóide xantinico e cafeína Gorniak et al. (1986)

alcalóide glicosídico

(palicosido)

Morita et al. (1989)

monofluoracetato De-Moraes-Moreau et al.

(1995)

P. marcgravii

N-metiltiramina e 2-

metiltetrahydro- β -carbonila

Kemmerling (1996)

Quadro 4 – Compostos químicos identificados em *P. marcgravii* e seus respectivos grupos.

Espécie vegetal Grupo químico Composto químico

Alcalóide Cafeína; palicosido; o-metoxi-ácido benzóico;

P. marcgravii N-metil tiramina; 2-metiltetrahydro- β -carbonila

Ácido orgânico Ácido monofluoracético, monofluoracetato

A espécie *D. negrensis* pertence à família Leguminosae (Fabaceae), subfamília

Papilionaceae (Flora Brasiliensis, 1862). É conhecida popularmente como timbó e é um cipó

encontrado nas áreas de terra firme, do qual se extrai um veneno usado para matar peixes nos rios

de correnteza (Almeida Neto, 2004).

Estudos fitoquímicos de diversas espécies de *Derris* (Leguminosae), realizados no laboratório de produtos naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), permitiram selecionar *D. negrensis* como a espécie que contém a maior concentração de rotenona (Maia, 1976).

A rotenona é um composto inseticida presente em plantas leguminosas do gênero *Lonchocarpus* na América do Sul, onde são popularmente conhecidas como timbó ou cube; em plantas do gênero *Derris* na Ásia, tais como *D. elliptica* (Wallich) Benth e *D. malaccensis* (Benth), originárias da Malásia e sul da Índia, onde o produto seco é conhecido por derris ou tuba; também está presente em outras leguminosas tropicais, como as do gênero *Tephrosia* (Caminha Filho, 1940; Kathrina & Antonio, 2004; Cloyd, 2004).

É um isoflavonóide cristalino, inodoro e insípido que aparece sempre acompanhado de outros compostos flavonóidicos rotenóides como deguelina e tefrosina, os quais também

Figura 5 – Caule de *D. negrensis*. Foto: Silva, W.C., 2006.

apresentam atividade inseticida (Corbett, 1940; Cravero et al., 1976; Lima, 1987; Silva et al., 2001). Entretanto a deguelina e tefrosina apresentam três e sete vezes, respectivamente, menor toxicidade para insetos do que a rotenona (Lima, 1987).

Entre as plantas conhecidas como timbó, as que possuem os maiores teores de rotenona são as pertencentes aos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus*. A maior concentração desse metabólito secundário se encontra nas raízes e, dependendo da espécie, seu teor pode variar de 5 a 13% (Costa et al., 1999)

O princípio ativo do timbó, a rotenona, é especialmente eficaz no controle dos besouros e lagartas mastigadoras de folhas. De acordo com a espécie de inseto, a rotenona pode ser mais ou menos ativa e sua ação ter um tempo prolongado para se manifestar (Saito & Luchini, 1998).

A rotenona apresenta amplo espectro de ação por contato e ingestão, causando rápida parada da alimentação, perda das funções locomotoras, paralisia e morte em pouco tempo.

Apresenta atividade acaricida e também inseticida sobre lagartas, tripes, piolhos, mosquitos, pulgões, pulgas, moscas e formigas lava-pé (Maklouf, 1986; Buss & Park-Brown, 2002; Kathrina & Antonio, 2004; Cloyd, 2004).

Além da rotenona, Mariconi (1988) reporta que nas raízes de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp., são encontradas cinco substâncias: eliptona, sumatrol, malacol, 1-alfatoxicarol e deguelina. Corbett (1940) afirma que o extrato de timbó não contém somente rotenona, mas também outros metabólitos secundários como deguelina, tefrosina, toxicarol e α -amisina.

O composto químico cumestrol, cujo gênero se caracteriza por conter na sua composição química flavonóides e isoflavonóides, foi isolado de uma espécie de *Derris* por Zoghbi et al. (1988). O cumestrol é um estrógeno não esteroideal que deve agir nos seres humanos

da mesma maneira como o estradiol e deve exercer efeitos profundos em nível celular (Martin et al., 1978; Verdeal et al., 1980).

Em estudos toxicológicos realizados por Hebling-Beraldo et al. (1983), a rotenona causou um efeito depressor no consumo de oxigênio de duas espécies de saúva. Harvey & Brown

(1951) e Lord (1949) obtiveram resultados semelhantes para *B. germânica* e *Oryzaephilus surinamensis* L.

O efeito tóxico de *Derris elliptica* sobre caracóis e lesmas foi analisado por Maini & Morallo (1993), os quais verificaram que o extrato aquoso da raiz foi tóxico na concentração de 2000 ppm, induzindo a mortalidade de 30%, enquanto que o extrato aquoso do caule proporcionou o mesmo percentual de mortalidade na concentração de 10000 ppm.

A atividade inseticida de extratos aquosos e alcoólicos de várias partes de plantas de treze espécies vegetais da Amazônia Brasileira em adultos de *Ceratomyia tingomarianus* foi avaliada por Fazolin et al. (2002). O extrato alcoólico de *Derris* spp. (timbó), contendo rotenona,

foi o que induziu a maior porcentagem de mortalidade de *C. Tingomarianus*, com valores variando de 15,1 a 26,8%.

Rotenóides extraídos da raiz de timbó (*Derris urucu*) foram avaliados “in vitro” por Costa-Junior et al. (2002) em teleóginas do carrapato *R. microplus*, observando-se que a maior concentração utilizada no experimento (10,0 mg/ml) obteve uma eficiência média de 97,85% no controle da reprodução.

A eficiência do extrato etanólico da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) foi avaliada por Pereira & Famadas (2004) em *R. microplus*, verificando-se mortalidade de 93,92 e 34% de larvas e fêmeas ingurgitadas, respectivamente, e um percentual de 79,73% no controle de reprodução desse ácaro. Fazendo nova avaliação da atividade desse extrato sobre esse ixodídeo,

Pereira & Famadas (2006) observaram inibição de 76,10% na reprodução de fêmeas ingurgitadas.

Diversos produtos naturais para controle de adultos de *Bemisia tabaci* na cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L.) foram testados por Azevedo et al. (2005), os quais verificaram que o

extrato de timbó foi o mais eficiente.

Na avaliação, por aplicação tópica, da toxicidade de extrato aquoso e alcoólico de *Lonchocarpus floribundus* para *Toxoptera citricidus* (pulgão preto dos citros), Correa (2006) constatou que os dois extratos causaram percentual de mortalidade de insetos acima de 50%.

Em pesquisas realizadas para avaliar a toxicidade de extrato de *Derris amazonica* sobre adultos de *Cerotoma arcuatus*, verificou-se que esse extrato, contendo 3,7% de rotenona, induziu a mortalidade de insetos superior a 80% (Alécio, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle de Pragas da Universidade de Caxias do Sul - UCS e no Laboratório de Química da Universidad de la Republica de Montevideo – Uruguay.

3.1 Seleção e coleta do material botânico

As amostras das espécies vegetais foram coletadas no Estado do Amazonas no mês de fevereiro de 2006. *P. aduncum* e *P. marcgravii* (folhas) foram coletadas na fazenda experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), km 40 da BR-174, (s 02° 39.236; w 60° 03.432); *D. negrensis* (caule) foi coletada na Reserva Ducke, km 27 da estrada AM-010, (s 02° 54.778; w 59° 58.802).

3.2 Identificação do material botânico

Uma parte do material de cada espécie foi colocada em uma prensa (exsicata) e enviada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram identificadas e incorporadas ao acervo com os números, 218219 (*Piper aduncum* L.) 218220 (*Palicourea marcgravii* St. Hil) e 218217 (*Derris negrensis* Benth).

3.3 Secagem e processamento do material botânico

As folhas de *P. aduncum*, *P. marcgravii* e caules de *D. negrensis* foram colocados em uma estufa, a temperatura de 37° C, durante cinco dias. Após esse período, foram triturados e acondicionados em sacos de papel de três litros e armazenados em uma sala com temperatura de 20 a 25° C e umidade relativa de $80 \pm 5\%$, segundo metodologia descrita por Prista et al. (1981).

3.4 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos no laboratório de fitoquímica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). As extrações foram realizadas utilizando o método de extração à quente em aparelho tipo soxhlet (Soxhlet, 1879), com o tempo de 24 horas para cada extração. Foi utilizada uma seqüência de solventes de polaridade crescente na seguinte ordem: hexano, acetato de etila e etanol. Após as extrações, os solventes foram evaporados através de um evaporador rotativo e os extratos brutos obtidos foram mantidos sob refrigeração à temperatura de 4° C.

3.5 Extração de óleo essencial

A extração do óleo essencial do extrato hexânico de *P. aduncum* foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger (World Health Organization, 1998), utilizando-se 3,68 mg de extrato bruto.

3.6 Coleta dos carrapatos

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas em bovinos no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, no município de Eldorado do Sul - Estado do Rio Grande do Sul.

As larvas foram obtidas através da postura de ovos das teleóginas do terceiro ao décimo dia.

3.7 Identificação do carrapato

A identificação da espécie de ixodídeo foi realizada pelo Dr. João Ricardo de Souza Martins, do laboratório de parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor.

3.8 Avaliação acaricida de *P. aduncum*, *P. marcgravii* e *D. negrensis*

3.8.1 Avaliação acaricida sobre fêmeas ingurgitadas

Para avaliar a eficiência de *P. aduncum*, *P. marcgravii* e *D. negrensis* como acaricidas, foram utilizados extratos hexânico, acetato de etila e etanólico dessas espécies, solubilizados em solução 5% (v/v) de Tween-80, nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 mg/ml.

Trezentas e cinqüenta teleóginas foram separadas em grupos de 10 (dez), pesadas e imersas separadamente nos três extratos, nas diferentes concentrações, durante cinco minutos. Foram utilizados dois grupos controles, onde um foi imerso em solução 5% (v/v) de Tween-80 e o outro em água destilada, conforme metodologia descrita por Drummond et al. (1973).

Após o tratamento, cada grupo foi colocado em placa de Petri e levado à estufa incubadora tipo B.O.D. a 27 ± 1 °C e umidade relativa de 80 ± 5 %.

As taxas de mortalidade foram avaliadas diariamente, durante seis dias. As taxas de oviposição foram avaliadas em quinze dias após o tratamento. A eficiência reprodutiva (ER) e o percentual de controle de reprodução (%C) foram avaliados em 15 dias após a pesagem dos ovos, conforme metodologia de Stendel (1980).

$$ER = \frac{PO}{PIF} \times (\% E)$$

$$PIF$$

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

$$ER(\text{controle})$$

$$IO = \frac{PO}{PIF}$$

$$PIF$$

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

$$IO(\text{controle})$$

PIF = Peso inicial da fêmea

PO = Peso de ovos

%E = Percentual de eclosão dos ovos

ER = Eficiência reprodutiva

%CR = Percentual de controle de reprodução

IO = Índice de oviposição

3.8.2 Avaliação acaricida sobre larvas

Para avaliar a eficiência de *P. aduncum*, *P. marcgravii* e *D.negrensis* como larvicida, foram utilizados extratos hexânico, acetato de etila e etanólico dessas espécies, solubilizados em 5% (v/v) de Tween-80 nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 mg/ml, utilizando-se técnicas desenvolvidas por Shaw (1966) e Souza et al. (2006b), com algumas modificações, que consistem em colocar aproximadamente 100 larvas, com 14 a 21 dias de idade, em seringa de 5 ml, previamente preparada. A seringa foi cortada próxima a região da agulha e feito um orifício de aproximadamente 0,1 mm de diâmetro na metade dela e, posteriormente, foi imersa por cinco minutos nos extratos. Foram utilizados dois grupos controle, onde um foi imerso em solução 5% (v/v) de Tween-80 e o outro em água destilada. A parte cortada foi previamente fechada com tecido de trama fina, fixado com elástico ortodôntico. A seringa foi mantida em estufa incubadora tipo B.O.D. a 27 ± 1 °C e umidade relativa de 80 ± 5 %. O registro de larvas vivas e mortas foi realizado em 24 horas e o percentual de mortalidade foi calculado pela seguinte fórmula, conforme metodologia descrita pela FAO Plant Protection Bulletin (1971).

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{larvas mortas}}{\text{total de larvas}} \times 100$$

3.8.3 Avaliação acaricida de óleo essencial de *P. aduncum* sobre larvas

Avaliou-se a toxicidade do óleo essencial, extraído do extrato hexânico bruto de *P. aduncum*, diluído em etanol 95% (Chagas et al., 2003; Gonçalves et al., 2007) nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1mg/ml, utilizando a metodologia descrita no item 4.8.2.

3.9 Estudo Fitoquímico de *P. aduncum* e *P. marcgravii*

Devido essas plantas conterem um grande número de compostos metabólicos nos seus extratos, decidiu-se realizar um estudo fitoquímico. Em relação à *P. aduncum*, em particular se focalizou a atenção no extrato hexânico devido ter apresentado maior atividade em comparação com os extratos acetato de etila e etanólico.

Realizou-se uma hidrodestilação em aparelho Clevenger (World Health Organization, 1998). A composição química da fração volátil do extrato hexânico foi analisada em cromatógrafo gasoso-Shimadzu 17-A equipado com uma coluna capilar SE-52 (60°C 8min-3°C/min-180°C-20°C/min-250°-25min a 250°C), usando He como gás de arraste e FID detector (320°C). As análises em cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG/EM) foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a detector seletivo de massas Shimadzu GC-17 SE 52 coluna capilar (25m, 0.25 i.d., 0.25 mm densidades), usando He como gás de arraste, acoplado a uma Quadrupole MS Shimadzu QP5050 com detector.

A parte não volátil do extrato hexânico foi analisada mediante um estudo fitoquímico em cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrometria ultravioleta (UV).

Quanto à *P. marcgravii*, realizou-se um estudo fitoquímico em CCD e espectrometria ultravioleta dos três extratos, sendo que a atenção maior foi destinada ao extrato acetato de etila, o qual apresentou maior atividade acaricida em comparação aos demais.

3.9.1 Análise química qualitativa e quantitativa dos extratos

Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada e, posteriormente, analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG/EM) e espectro de ultravioleta.

Visando uma análise fitoquímica preliminar, os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada utilizando-se sistemas de eluentes e reveladores usuais para “screening” fitoquímico.

Para este procedimento foram utilizadas placas de cromatografia de sílica Gel 60 F254 Merck como fase estacionária. Como fase móvel para *P. aduncum* foi utilizado: CHCl₃ + MeOH (95:5); e para *P. margravii*: CHCl₃ + MeOH (95:5), CHCl₃ + MeOH + H₂SO₄ 1%, AcOEt + HCOOH + CH₃COOH glacial + H₂O (10: 11: 11: 27), AcOEt + MeOH + H₂O (100: 13,5: 10).

A revelação das classes de compostos foi realizada utilizando reveladores universais como ultravioleta e ácido sulfúrico 10%, e reveladores específicos como: cloreto férrico 3%, para identificar polifenóis; Dragendorff, para identificação de alcalóides; reveladores de açúcares, a fim de identificar compostos glicosilados; bromocresol green pH de 3,8-5,4, para identificação de ácidos orgânicos; e revelador de produtos naturais (NPR) para flavonóides (Ugaz, 1994).

Placas preparativas (CCD) foram realizadas e as manchas mais características e que apresentaram a possibilidade da presença de flavonóides nos extratos de *P. aduncum* e *P. margravii* foram isoladas e colocadas em um vidro de 2cm de diâmetro e 4cm de altura e misturadas a 2 ml de metanol. Em seguida filtradas e submetidas à identificação cromatográfica e espectrométrica.

3.9.2 Análise espectrométrica em ultravioleta (UV)

As bandas obtidas por meio de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

foram submetidas à análise espectrométrica em UV, em espectrofotômetro Cecil 31000, utilizando

cloreto de alumínio ($AlCl_3$) como reagente de desvio para determinação estrutural de flavonóides

(Mabry et al., 1970).

3.10 Análise dos Dados

O delineamento para avaliação dos parâmetros nos bioensaios, tanto para larvas como para as teleóginas, foi inteiramente casualizado, sendo que para as larvas utilizaram-se cinco tratamentos com duas repetições, mais o grupo controle; para as teleóginas, cinco tratamentos, cinco repetições, mais o grupo controle. Como os dois grupos controles não foram estatisticamente diferentes, utilizou-se como controle o grupo imerso em solução de Tween-80 5% (v/v). Os valores obtidos nos experimentos foram analisados com o auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows 12.0) (Green & Salkind, 2004).

Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software Prism Graph Pad.

O método de Probit (Finney, 1971) foi usado para obtenção dos valores da CL_{50} , CI_{50} , TL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança 95% (IC-95%). Quando os dados não foram adequados para o modelo de probit, foi utilizado o método estatístico de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). Nos casos de mortalidade natural ocorrida no controle, antes do

cálculo da CL_{50} e TL_{50} os valores da mortalidade, nos tratamentos, foram corrigidos segundo a

fórmula de Abbott (1925), a seguir:

$Mc(\%) = \%Mo - \%Mt \times 100$, onde

$$100 - \%Mt$$

Mc = Mortalidade corrigida

Mo = Mortalidade observada

Mt = Mortalidade na testemunha

Para comparação de toxicidade entre os extratos, os valores dos intervalos de confiança de duas CL50 foram usados, ou seja, valores da CL50 foram considerados estatisticamente diferentes quando não houve sobreposição dos intervalos de confiança 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade acaricida do extrato hexânico de *P. aduncum* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Os valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a diferentes concentrações de extrato hexânico de folhas de *P. aduncum* estão apresentados na Figura 6. Observou-se médias crescentes de mortalidade, entretanto não houve diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 6 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*.

Os percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, tratados com extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*, em diferentes concentrações, variaram de 10,14 a 39,57%, sendo que as concentrações de 50, 75 e 100 mg/ml não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 7).

Figura 7 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas às concentrações de extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*.

O extrato hexânico de folhas de *P. aduncum* induziu mortalidade de larvas de *R. microplus* superior a 50% nas concentrações de 10, 15 e 20mg/ml em 24 horas, observando-se 70,42% de mortalidade na maior concentração (Figura 8).

Figura 8 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* submetidas a concentrações de extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*.

A concentração letal mediana (CL50), obtida a partir das médias de mortalidade de larvas de *R. microplus*, expostas às concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 mg/ml de extrato hexânico de folhas de *P. aduncum* foi 9,30 mg/ml (Figura 9).

Figura 9 – Determinação da concentração letal mediana (CL50) do extrato hexânico de folhas de *P. aduncum* para larvas de *R. microplus*.

4.2 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de *P. aduncum* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O extrato acetato de etila de *P. aduncum*, nas concentrações avaliadas, induziu 22% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, na maior concentração utilizada (100mg/ml), entretanto não apresentou diferença estatística em relação às concentrações de 50 e 75 mg/ml (Figura 10).

Figura 10 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. aduncum*.

Os valores percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. aduncum*, encontram-se na Figura 11. Verificou-se que na maior concentração avaliada (100 mg/ml) a inibição da oviposição foi de 46,78%, não apresentando, estatisticamente, diferença em relação às concentrações de 25, 50 e 75mg/ml.

Nos ensaios realizados observou-se que o extrato acetato de etila de *P. aduncum* foi eficiente para inibir a oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Figura 11 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. aduncum*.

Os valores médios de mortalidade de larvas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. aduncum*, no intervalo de tempo de 24 horas, variaram de 2,00 a 17,25% (Figura 12).

Figura 12 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às diferentes concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. aduncum*.

4.3 Atividade acaricida do extrato etanólico de *P. aduncum* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

A Figura 13 apresenta as médias de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, expostas a concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*, observando-se médias de mortalidade crescente nas concentrações avaliadas, entretanto não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 13 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*.

Na avaliação de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas às concentrações de 5 a 100 mg/ml de extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*, verificou-se que os percentuais de inibição de oviposição variaram de 10,56 a 35,02% e as concentrações de 50, 75 e 100mg/ml não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 14).

Figura 14 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*.

O extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*, nas concentrações de 1 a 20 mg/ml, induziram mortalidade de larvas de *R. microplus*, com percentuais que variaram de 26,32 a 40,47% (Figura 15).

Figura 15 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*.

4.4 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de diferentes extratos de *P. aduncum*.

Os valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos de folhas de *P. aduncum* estão representados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Verificou-se que o extrato acetato de etila induziu baixo percentual de mortalidade tanto para ácaros adultos e larvas; o extrato etanólico foi mais eficiente para larvas do que para fêmeas nas concentrações avaliadas; o extrato hexânico de *P. aduncum* apresentou maior toxicidade para larvas de *R. microplus*, induzindo a mortalidade de 70,42%.

Os três extratos avaliados, nas concentrações estabelecidas nos tratamentos, não foram suficientemente

tóxicos para determinar a concentração letal mediana de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Entretanto, o extrato hexânico ocasionou taxas de mortalidade de larvas superiores a 50% nas concentrações de 10, 15 e 20 mg/ml.

Tabela 1 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de *P. aduncum*.

Tabela 2 – Percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de *P. aduncum*.

4.5 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos de *P. aduncum*.

Os valores percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extratos de folhas de *P. aduncum*, demonstram que o extrato acetato de etila na concentração de 100mg/ml inibiu 46,78% da oviposição, porém não foi diferente estatisticamente dos extratos hexânico e etanólico (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de folhas de *P. aduncum*.

Concentração (mg/ml)

Extrato

controle 5 25 50 75 100

H 0,00 10,14 25,11 31,85 37,05 39,57 a

A 0,00 7,01 23,04 34,80 40,68 46,78 a

E 0,00 10,56 14,78 23,84 26,66 35,02 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 0,05$.

4.6 Atividade acaricida do óleo essencial de *P. aduncum* sobre larvas de *R. microplus*.

Os percentuais de mortalidade de larvas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial extraído do extrato hexânico bruto de *P. aduncum*, no intervalo de tempo de 24 horas podem ser visualizados na Figura 16, observando-se 100% de mortalidade nas três concentrações avaliadas.

4.7 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com extratos de *P. aduncum*.

O extrato etanólico apresentou menor potencial no controle de reprodução fêmeas ingurgitadas *R. microplus*, sendo que na maior concentração (100 mg/ml) o percentual de controle foi de 38,08%. Verificou-se que o extrato acetato de etila, na maior concentração estabelecida nos tratamentos, apresentou maior percentual no controle de reprodução (61,81%), porém não apresentou diferença estatística em relação ao extrato hexânico que foi de 54,22% (Tabela 4).

4.8 Análise fitoquímica do extrato hexânico de *P. aduncum*

Na extração de 0,25 ml de óleo essencial, a partir de 3,68mg do extrato hexânico bruto, obteve-se rendimento de 6,79%, verificando-se na sua composição química a presença de somente um composto majoritário, o fenilpropanóide dilapiol (94,84%), e pequenas proporções de sesquiterpenos (Figura 17).

Figura 17 – Cromatografia gasosa do óleo essencial extraído do extrato hexânico bruto de *P. aduncum*. 1-nerodiol (0,74%); 2-globulol (0,65%); 3-Espatulenol (0,64%); 4-croweacin (1,91%); 5-dilapiol (94,84%); 6-apiol (0,38%).

A Figura 18 apresenta as estruturas moleculares dos compostos químicos presentes no óleo essencial extraído do extrato hexânico de *P. aduncum*.

Figura 18 – Estruturas moleculares dos compostos presentes no óleo essencial de *P.aduncum*.

Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato hexânico de *P. aduncum*, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5) está apresentada na Figura 19. Sem a utilização de revelador, verificou-se a presença de duas bandas de cor amarelo ao visível de $R_f = 0,65$ e $0,97$.

Figura 19 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*.

A cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato hexânico de *P. aduncum*, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5) e como reveladores luz ultravioleta a 254nm e 365nm, proporcionou a visualização das duas bandas amarelas com $R_f = 0,65$ e $0,97$, que foram observadas no visível e outras bandas (Figura 20). A banda de $R_f = 0,65$ foi isolada e submetida à análise espectrométrica em ultravioleta, realizando-se o espectro em metanol e, posteriormente, empregando-se reativo de corrimento (AlCl_3), indicando a presença de compostos pertencentes ao grupo flavonóide, em particular, chalconas. Esse grupo químico já foi identificado em *P. aduncum* por Orjala et al. (1994) que analisaram os compostos químicos presentes no extrato diclorometano de folhas dessa Piperaceae e identificaram três novas diidrochalconas: piperaducinas A(3), B(4) e C(5), as quais apresentaram atividade citotóxica e antibacteriana.

Figura 20 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de *P. aduncum* revelada em luz ultravioleta a 254 e 365nm.

Na análise espectrométrica da banda de $R_f = 0,65$ (Figura 21), o efeito do tricloreto de alumínio não foi o esperado, pois produziu uma reação incompleta, não sendo possível extrair informação estrutural deste experimento.

Figura 21 – Espectrometria da banda amarela de $R_f = 0,65$ do extrato hexânico de *P. aduncum*, isolada por cromatografia em camada delgada preparativa.

A cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de *P. aduncum*, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5) e como revelador ácido sulfúrico (H_2SO_4) 10%, apresentou quatro bandas de cor violeta com R_f s = 0,23, 0,30 e 0,81 (Figura 22), as quais indicam a presença de compostos terpênicos na composição química desse extrato (Wagner & Bladt, 1996). Essa identificação cromatográfica preliminar confirma os trabalhos realizados por Gottlieb et al. (1981), Orjala et al. (1993), Vila et al. (2005), Oliveira et al. (2006) e Rali et al. (2007) que analisaram os compostos químicos presentes em *P. aduncum* e reportaram a presença de compostos do grupo químico terpenóide, principalmente sesquiterpenos e monoterpenos.

Figura 22 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*, revelada com H_2SO_4 .

Utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5) e como revelador cloreto férrico (FeCl_3), a cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato hexânico de *P. aduncum* apresentou uma mancha de cor amarela, com $R_f = 0,65$ (Figura 23), a qual foi visualizada também ao visível e na revelação em luz ultravioleta, confirmando a presença de polifenóis, provavelmente flavonóides (Wagner & Bladt, 1996).

Figura 23 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*, revelada com FeCl_3 .

A Figura 24 apresenta a cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato hexânico de *P. aduncum*, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5) e revelador de produtos naturais (NPR). Visualiza-se uma banda de cor amarelo ($R_f = 0,13$) e outra de cor laranja ($R_f = 0,10$), que podem ser atribuídas a presença de compostos fenólicos, possivelmente pertencentes ao grupo flavonóide, que já foi reportado por Torres-Santos et al. (1999) como sendo um dos grupos químicos encontrados em *P. aduncum*, quando analisaram fitoquimicamente essa Piperaceae e purificaram, proveniente do extrato diclorometano da inflorescência, o composto 2',6'-Dihidroxi-4'-metoxichalcona, o qual apresentou significativa atividade intracelular “in vitro” contra promastigotos e amastigotos de *Leishmania amazonensis*.

Figura 24 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de folhas de *P. aduncum*, revelada com NPR.

Das análises do conjunto de experimentos em CCD, pode-se sugerir que a banda amarela fluorescente a 365nm, que também fluoresce a 254nm, e que foi revelada com FeCl₃ e NPR, corresponde a grupos fenólicos, com duplos laços conjugados que indicam a presença de grupos C6-C3-C6, os quais, como se discutiu anteriormente, podem indicar a presença de flavonóides, em particular chalconas.

A placa utilizando revelador de terpenos mostra que as bandas que absorvem a 254nm correspondem a compostos pertencentes a esse grupo químico, indicando a presença de compostos com sistemas diênicos conjugados ou com grupos aromáticos. Em particular a banda amarela com R_f = 0,65, além de fluorescer a 365nm, é revelada com NPR, sugerindo a possibilidade da presença de um composto aromático.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram o importante potencial tóxico do óleo essencial extraído do extrato hexânico de *P. aduncum* sobre larvas de *R. microplus*. Semelhante potencialidade foi demonstrada na ação inseticida do óleo essencial dessa Piperaceae sobre larvas

do coleóptero *Tenebrio molitor*, em trabalho realizado por Fazolin et al. (2007), induzindo a mortalidade total de larvas; e sobre adultos de *Callosobruchus maculatus*, avaliados por Pereira (2006), que verificou também mortalidade de 100% dos insetos.

A toxicidade do extrato hexânico pode ser atribuída também à presença de óleo essencial na sua composição, o qual contém o fenilpropanóide dilapiol com reconhecida ação inseticida e sinérgica (Maia et al., 1998; Bhuiyan et al., 2001; Fazolin et. al., 2005). Os terpenos apesar de estarem em baixas concentrações podem ter uma ação biológica complementar ou aditiva à ação do dilapiol. De acordo com Falkenberg et al. (1999) os extratos apolares contém compostos com características lipofílicas em sua composição química, como terpenóides.

De acordo com os nossos resultados, o dilapiol é o composto majoritário presente no óleo essencial de *P. aduncum*, mas há quantidades menores de terpenóides (isoprenóides) que são

também metabólitos secundários voláteis com atividade inseticida (Viegas Júnior, 2003) que altera o desenvolvimento e metabolismo em várias espécies de insetos e produzem distúrbios fisiológicos que podem levar a inibição de reprodução ou à morte, devido a interferência na alimentação e crescimento (Schmutterer, 1990);

A maior eficácia de óleos essenciais das plantas em insetos e ácaros pode ser atribuída à concentração maior de substâncias voláteis em sua composição (Fernandes et al., 2002) e também pelo fato de que o óleo levemente diluído faz com que penetração no ácaro ocorra mais lentamente, porém de maneira muito mais devastadora (Odhiambo, 1982), como pôde ser observado na ação do óleo essencial de *Piper aduncum*, analisada neste trabalho ocasionando 100% de mortalidade de *R. microplus*, sendo esse mesmo percentual de mortalidade

observado com óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana* (Chagas et al., 2002a), *Carapa guianensis* (Farias et al., 2007) e *Drimys brasiliensis* (Ribeiro et al., 2008b).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que os extratos e o óleo essencial de *P. aduncum* e os extratos *P. marcgravii* apresentam potencial para o controle de *R. microplus* quando comparados com alguns agentes de controle citados na Tabela 5. Essas plantas, além de terem apresentado atividade acaricida, têm ampla distribuição geográfica no Brasil, ocorrendo naturalmente e em grande abundância da região Amazônica. *P. aduncum* tem grande potencial de

exploração econômica em função da comprovada utilidade do seu óleo essencial na agricultura e

saúde humana (Gaia et al., 2004). Além disso, as espécies desse gênero são amplamente aplicadas na medicina popular em função das propriedades microbianas exibidas por seus constituintes (Bastos & Albuquerque, 2004).

Tabela 5 – Mortalidade de fêmeas ingurgitadas, larvas e controle de reprodução de *R. microplus* reportados na literatura.

Uma das principais vantagens na utilização de extratos de *P. aduncum* em relação aos produtos químicos sintéticos se refere ao fato de que os extratos vegetais, ao contrário dos produtos sintéticos, podem ter mais de um princípio ativo agindo sinergicamente, potencializando a atividade inseticida da planta e ainda dificultando a capacidade de resistência dos carrapatos à ação dos extratos (Mgbojikwe & Okoye, 2001); a vantagem do extrato de *P. aduncum* em relação aos fungos se deve ao fato da ação do extrato sobre o ácaro ocorrer em menor período de tempo, devido ao processo infectivo desses microrganismos ser mais lento sobre o hospedeiro, além de necessitar de condições ambientais favoráveis para desenvolver o ciclo completo da relação fungo-hospedeiro (Alves, 1998).

O composto químico dilapiol encontrado no óleo essencial extraído do extrato hexânico corrobora os trabalhos realizados por Orjala et al. (1993), Maia et al. (2001) e Pino et al. (2004), os quais analisaram os compostos químicos existentes no óleo essencial extraído de folhas de *P. aduncum* e constataram a presença desse fenilpropanóide. Essa substância também foi encontrada em espécies do gênero *Piper* analisadas por Santos et al. (2001).

O fenilpropanóide dilapiol encontrado no extrato hexânico, analisado nesse trabalho, foi também o composto majoritário obtido por diversos autores como Gottlieb et al. (1981), Pino et al. (2004), Oliveira et al. (2005) e Rali et al. (2007), os quais estudaram fitoquimicamente a espécie *P. aduncum*. Entretanto, outros pesquisadores (Mesquita et al., 2005; Oliveira et al., 2006) relataram ser o E-nerolidol o composto majoritário. Os constituintes majoritários do óleo volátil podem variar de acordo com o ambiente e as condições edafoclimáticas. Entretanto, Simões e Spitzer (2003) reportam que a maioria dos óleos voláteis apresenta na sua composição os grupos químicos fenilpropanóides e terpenóides e, nesses, predominam os monoterpenos e sesquiterpenos.

O rendimento de óleo essencial e concentração de dilapiol existentes no extrato hexânico foram maiores que os encontrados no trabalho realizado por Maia et al. (2001) que extraíram óleo essencial de folhas de *P. aduncum* coletadas em diferentes localidades da região Amazônica, verificando que as coletadas no município de Manaus-Amazonas apresentou maior rendimento de óleo e concentração de dilapiol, 3,4% e 91,1%, respectivamente. A espécie *P. aduncum*, analisada neste trabalho, também foi coletada no município de Manaus e o maior rendimento de óleo e maior concentração de dilapiol existentes no extrato hexânico podem ser atribuídos ao processo de obtenção do óleo ter sido realizado a partir do extrato bruto e também a fatores edafoclimáticos.

A maior suscetibilidade de larvas ao extrato hexânico pode ser explicada pelo fato desse extrato ser lipossolúvel, facilitando a penetração na cutícula do hospedeiro (Odhiambo, 1982), a qual é formada pela epicutícula, composta por ceras e proteínas, e pela procutícula constituída por quitina e proteína (Balashov, 1972). Entretanto em estudos realizados por Chagas et al. (2003) verificou-se sensibilidade de *R. microplus* a solventes, como álcool metílico, álcool etílico, acetona, acetato de etila, triton e xilol, reportando que as fêmeas ingurgitadas são mais sensíveis do que as larvas, sendo que esses autores acreditam que a diferença na composição da cutícula entre larvas e fêmeas ingurgitadas é que possa justificar os resultados obtidos. Porém, segundo Odhiambo (1982), a camada de ceras ou de lipídeos é vista em *R. microplus* somente a partir da ecdise na ninfa e, em maior quantidade, no adulto.

A toxicidade do extrato hexânico sobre larvas pode ter sido devida a ação direta dos compostos presentes nesse extrato. Em relação ao óleo essencial, o efeito físico tóxico pela solubilização da cutícula por meio do óleo essencial não pode ser excluído, embora os terpenos e fenilpropanóides sejam conhecidos por agir sobre o receptor octapaminas, o qual atua como neurotransmissor, neurohormonal e neuromodulador nos invertebrados (Price & Berry, 2006).

4.9 Atividade acaricida do extrato hexânico de *P. marcgravii* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O extrato hexânico de folhas de *P. marcgravii*, nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 mg/ml, apesar de ter mostrado médias de mortalidade crescente de fêmeas ingurgitadas de *R.*

microplus variando de 10 a 22%, não apresentou diferença estatística em relação ao controle (Figura 25).

Figura 25 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato hexânico de folhas de *P. marcgravii*.

Os percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, tratados com extrato hexânico de folhas de *P. marcgravii* foram inferiores a 50% (Figura 26), observando-se inibição de 44,96% na concentração de 100 mg/ml, sendo que em relação às concentrações de 25, 50 e 75mg/ml não apresentou diferença estatística.

Figura 26 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas às concentrações de extrato hexânico de folhas de *P. marcgravii*.

Os valores percentuais de mortalidade de larvas de *R. microplus*, expostas às concentrações de 15 e 20 mg/ml de extrato hexânico de folhas de *P. marCGravii*, durante 24 horas, foram superiores a 50% (Figura 27). Verificou-se que mortalidade observada variou de 11,22 a 75,13%.

Figura 27 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às diferentes concentrações de extrato hexânico de folhas de *P. marCGravii*.

A concentração letal mediana (CL50), obtida a partir dos valores percentuais de mortalidade de larvas de *R. microplus* nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 mg/ml de extrato hexânico de folhas de *P. marcegravii*, no intervalo de tempo de 24 horas, foi 9,27 mg/ml (Figura 28).

Figura 28 – Determinação da concentração letal mediana (CL50) do extrato hexânico de folhas de *P. marcegravii* para larvas de *R. microplus*.

4.10 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de *P. marcgravii* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Nas concentrações de 50, 75 e 100 mg/ml de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*, os valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram superiores a 50% (Figura 29), verificando-se que a maior concentração induziu a mortalidade de 78% dos ixodídeos, não apresentando diferença estatística em relação às concentrações de 50 e 75 mg/ml.

Figura 29 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*.

A Figura 30 apresenta a concentração letal mediana (CL50), obtida a partir das médias de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 mg/ml de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* no intervalo de tempo de seis dias.

Verificou-se que a concentração letal mediana foi de 30,08 mg/ml.

Figura 30 – Determinação da concentração letal mediana (CL50) do extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O tempo letal mediano (TL50), obtido a partir dos valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* na concentração de 100 mg/ml de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*, foi de 4,72 dias (Figura 31).

Figura 31 – Determinação do tempo letal mediano (TL50) do extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Os valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*, estão representados na Figura 32. Observou-se que a partir da concentração de 50 mg/ml os valores médios de mortalidade são máximos e não apresentaram diferença estatística.

Figura 32 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*

A CI50 (concentração inibitória mediana), obtida a partir dos valores percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a diferentes concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*, durante quinze dias, foi de 5,79 mg/ml (Figura 33).

Figura 33 – Determinação da concentração inibitória mediana (CI50) do extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

A Figura 34 apresenta as médias de mortalidade de larvas de *R. microplus*, submetidas a concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 mg/ml de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*, observando-se que a partir da concentração de 5 mg/ml, a mortalidade foi acima de 50%, sendo que a maior concentração (100 mg/ml) induziu a mortalidade de 95,11%.

Figura 34 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*.

A concentração letal mediana (CL50), obtida a partir das médias de mortalidade de larvas de *R. microplus*, submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii*, foi de 2,46 mg/ml (Figura 35).

Verificou-se alto potencial toxicológico do extrato acetato de etila de *P. marcgravii* nas três avaliações realizadas, destacando-se o efeito desse extrato na inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, o qual apresentou 100% de eficiência.

Figura 35 – Determinação da concentração letal mediana (CL50) do extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* para larvas de *R. microplus*.

4.11 Atividade acaricida do extrato etanólico de *P. marcgravii* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Nas concentrações avaliadas de extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificou-se que a concentração de 100mg/ml induziu a mortalidade de 64% de ácaros, porém não apresentou diferença estatística da concentração de 75mg/ml que induziu 48% de mortalidade (Figura 36).

Figura 36 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii*.

A Figura 37 apresenta a concentração letal mediana (CL50), estimada a partir das médias de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. margravii*. Verificou-se que a concentração necessária para induzir a mortalidade de 50% desses ixodídeos foi de 76,55 mg/ml.

Figura 37 – Determinação da concentração letal mediana (CL50) do extrato etanólico de folhas de *P. margravii* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O tempo letal mediano (TL50), obtido a partir dos valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* na concentração de 100 mg/mL de extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii*, foi de 5,14 dias (Figura 38).

Figura 38 – Determinação do tempo letal mediano (TL50) do extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Os valores percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii*, estão representados na Figura 39. Verificou-se que nas concentrações avaliadas, a inibição de oviposição variou de 18,78 a 85,36% e a concentração de 100mg/ml não apresentou diferença estatística em relação à concentração de 75mg/ml.

Figura 39 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* nas diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii*.

A concentração inibitória mediana (CI50), obtida a partir dos valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii*, está demonstrado na Figura 40. Observou-se que a concentração para inibir 50% da oviposição dos ácaros foi de 32,14 mg/ml.

Figura 40 – Determinação da concentração inibitória mediana (CI50) do extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii*, nas concentrações avaliadas, causou mortalidade de larvas de *R. microplus*, variando de 12,27 a 87,66% no intervalo de tempo de 24 horas (Figura 41).

Figura 41 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. marcgravii*.

A Figura 42 apresenta a concentração letal mediana (CL50), obtida a partir das médias de mortalidade de larvas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de *P. marçgravii*. A concentração necessária para induzir a mortalidade de 50% de larvas foi de 4,38 mg/ml.

Comparando-se as três avaliações realizadas utilizando o extrato etanólico de *P. marçgravii*, verificou-se que esse extrato apresentou maior eficácia no controle de larvas e em relação à inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Figura 42 – Determinação da concentração letal mediana (CL50) do extrato etanólico de folhas de *P. marçgravii* para larvas de *R. microplus*.

4.12 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos de *P. marCGravii*.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* respectivamente. Observou-se que o extrato acetato de etila de *P. marCGravii* apresentou maior potencial toxicológico para fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus*, induzindo, nas maiores concentrações, percentuais de mortalidade de 78 e 95,11% respectivamente. O extrato hexânico foi o que apresentou menor toxicidade para ácaros adultos, induzindo mortalidade inferior a 50%. Os extratos acetato de etila e etanólico não apresentaram diferença estatística em relação à mortalidade de fêmeas ingurgitadas.

A 3,75 30,32 71,25 77,78 91,20 95,11 a

E 3,70 12,27 58,10 66,08 82,97 87,66 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 0,05$.

4.13 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos de *P. marcgravii*.

O extrato acetato de etila de *P. marcgravii* foi o mais eficiente para inibir a oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, inibindo, a partir da concentração de 75 mg/ml, 100% da

oviposição, seguido do extrato etanólico que na maior concentração inibiu 85,36% da oviposição

e o extrato hexânico foi o menos eficiente inibindo 44,96% na maior concentração (Tabela 8).

4.14 Toxicidade de extratos acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O extrato acetato de etila de *P. marcgravii* foi mais eficiente no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* com CL50 de 30,08mg/ml (Tabela 9).

O extrato acetato de etila induziu a mortalidade de 50% de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em menor período de tempo que o extrato etanólico, 4,72 dias e 5,14 dias, respectivamente, porém os mesmos não apresentaram, estatisticamente, diferenças significativas (Tabela 10).

Tabela 10 – Toxicidade de extratos vegetais para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (tempo letal mediano – TL50)

A comparação de concentrações inibitórias de oviposição para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* entre os extratos de folhas de *P. marcgravii*, utilizando os valores dos intervalos de confiança de duas concentrações inibitórias medianas (CI50), estão representados na Tabela 11. Observou-se que o extrato acetato de etila de *P. marcgravii* foi mais eficiente para inibir a oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, apresentando $CI50 = 5,79$ mg/ml.

4.15 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com extratos de *P. marcgravii*.

Comparando-se o potencial toxicológico dos três extratos em relação ao controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificou-se que o extrato acetato de etila apresentou maior eficiência em relação aos demais, controlando 100% da reprodução a partir da concentração de 50 mg/ml. Os extratos acetato de etila e etanólico, na concentração de 100mg/ml, não apresentaram diferença estatística em relação ao controle de reprodução (Tabela 12).

Tabela 12 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de *P. marcgravii*.

4.16 Análise fitoquímica dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii*

A Figura 43 apresenta a cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos

hexânico (1), acetato de etila (2) e etanólico (3) de *P. marcgravii*, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5). Sem a utilização de revelador, observou-se no extrato 1 uma mancha amarela de cor bem viva ($R_f = 0,45$), que segundo Wagner & Bladt (1996), dependendo do tipo de estrutura, podem indicar a presença de composto pertencente ao grupo xantonas, cromonas ou

flavonóides, igual as duas manchas de cor amarelo de $R_f = 0,72$ e $0,84$ visualizadas no extrato 2

e da mancha amarela de $R_f = 0,89$ no extrato 3.

Figura 43 – Cromatografia em camada delgada dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de *P. marcgravii*.

Na análise espectrométrica da banda de $R_f = 0,45$ (Figura 44) observou-se um efeito batocrômico e hiperacrômico, apresentando um pico, indicando a absorção de um composto no comprimento de onda de 354,5nm, característico de um fenol com substituição orto-difenólica, provavelmente pertencente à classe dos flavonóis, a qual pertence ao grande grupo dos flavonóides e que se caracteriza por possuírem uma hidroxila na posição C-3 e também por ter uma absorção no comprimento de onda acima de 340nm (Guyot et al. 1998).

Figura 44 - Espectrometria da banda amarela de $R_f = 0,45$, do extrato hexânico de *P. marcgravii*, isolada por CCDP.

Cromatografias em camada delgada dos extratos hexânico (1) acetato de etila (2) e etanólico (3) de *P. marcgravii*, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5) e como reveladores luz ultravioleta a 254 e 365nm estão demonstradas na Figura 45. Verificou-se várias manchas, com destaques para a azul fluorescente mostrada no extrato 2, a qual apresenta $R_f = 0,56$. No comprimento de onda 365nm, visualiza-se três manchas azuis fluorescentes com R_f s = 0,62, 0,056 e 0,069, as quais, provavelmente, indicam presença de compostos aromáticos, possivelmente pertencente ao grupo flavonóide (Wagner & Bladt, 1996).

Figura 45 – Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de *P. marcgravii* revelada em luz ultravioleta a 254 e 365nm.

Em análise realizada em Cromatografia em camada delgada, com revelador cloreto férrico (FeCl_3), utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5), os extratos hexânico (1), acetato de etila (2) e etanólico (3) apresentaram bandas de cor marrom arroxeadas com R_f s = 0,08; 0,18; 0,09, respectivamente, características de compostos do grupo fenólico (Figura 46).

A cromatografia em camada delgada dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii*, utilizando revelador bromocresol green PH range 3,8-5,4 e como fase móvel $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ (95:5) está representada na Figura 47. Obervou-se nos extratos 2 e 3 a presença de duas bandas amarelas no ponto inicial de aplicação do extrato na placa cromatográfica, indicando a presença de ácidos orgânicos. Essa análise química preliminar sugere

Figura 46 – Cromatografia em camada delgada dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de *P. marcgravii*, revelada com FeCl_3 .

a presença de ácido monofluoracético e monofluoracetato nesses extratos, de acordo com os trabalhos realizados por Tokarnia et al. (1979), que identificaram a presença do ácido monofluoroacético em *P. marcgravii* e verificaram que essa substância interfere no metabolismo energético das células, precisamente no ciclo de Krebs; e com as pesquisas realizadas por Oliveira (1963) e De-Moraes-Moreau et al. (1995) que analisaram quimicamente os compostos presentes nas folhas dessa Rubiaceae e verificaram a presença de monofluoracetato.

Figura 47 – Cromatografia em camada delgada dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de *P. marcgravii*, revelada com bromocresol green PH range 3,8-5,4.

A cromatografia em camada delgada dos extratos hexânico (1), acetato de etila (2) e etanólico (3) de *P. marcgravii*, utilizando revelador Dragendorff e como fase móvel AcOEt + MeOH + H₂O (100: 13,5: 10) está demonstrada na Figura 48. Verificou-se no extrato 3 uma banda de cor laranja com $R_f = 0,57$. Esse resultado preliminar sugere a presença do grupo químico alcalóide presente nesse extrato, corroborando as pesquisas realizadas por diversos autores, que analisaram quimicamente a espécie *P. marcgravii*, como: Gorniak et al. (1986) que identificaram alcalóide xantinico e cafeína, sendo que esse não foi confirmada a sua presença neste ensaio; Morita et al. (1989) que identificaram alcalóide glicosídico (palicosido); e Kemmerling (1996) que identificou N-metiltiramina e 2-metiltetrahydro- β -carbonila.

Figura 48 – Cromatografia em camada delgada dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii*, revelada com Dragendorff.

O percentual de mortalidade e o controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Tabelas 6 e 12 respectivamente), na concentração de 25 mg/ml do extrato hexânico, foram semelhantes aos encontrados por Chungsamarnyat e Jansanwan (1996) que, ao avaliarem o efeito tóxico de d(+)-limoneno sobre esse ácaro, observaram 17% de mortalidade e por Borges et al. (2005) que utilizaram o extrato hexânico de fruto maduro de *Melia azedarach* e verificaram um percentual de controle de 27,3%. As baixas taxas de mortalidade e de controle de reprodução observadas nesses trabalhos mostram a baixa atividade acaricida do d(+)-limoneno e das substâncias presentes nas espécies avaliadas, como taninos, compostos fenólicos não tânicos e esteróides encontrados em *M. azedarach* (Dantas et al., 2000); alcalóide glicosídico (Morita et al., 1989) e alcalóides quinolínicos (Simões et al., 1999) em *P. marcegravi*.

A concentração letal mediana (CL₅₀ = 9,27 mg/ml) determinada pelo extrato hexânico de *P. marcegravi* para larvas de *R. microplus* (Figura 28) foi mais tóxica do que a CL₅₀ = 73,82 mg/ml obtida nos estudos realizados por Mendes et al. (2002), que verificaram a toxicidade do extrato de *Tecoma stans* sobre larvas desse ácaro. Possivelmente a toxicidade do extrato hexânico de *P. marcegravi* se deve a maior sensibilidade das larvas a um composto ou ao sinergismo de compostos de baixa polaridade e não ao ácido monofluoracético, princípio ativo dessa espécie (Tokarnia et al. 1979), o qual não foi identificado nesse extrato devido a alta polaridade desse ácido.

O extrato acetato de etila, na concentração de 75 e 100 mg/ml, induziu a mortalidade de 70 e 78% de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, respectivamente, e na concentração de 10 mg/ml induziu a mortalidade de 77,78% de larvas desse ácaro. O mesmo efeito foi observado por Chagas (2001) e Chungsamarnyat e Jansawan (1996), que ao avaliarem a atividade acaricida do óleo essencial de *Eucalypto citriodora* e do óleo da casca de *Citrus reticulata*, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificaram mortalidade de 73 e 78% respectivamente. Em relação

às larvas, os resultados obtidos neste estudo mostraram o maior potencial larvicida do extrato acetato de etila em relação a 33 produtos sintetizados por meio de clorossulfonação da (+)-cânfora e da (+)-isopinocanfona analisados por Chagas (2001), que avaliou 10 mg desses produtos, solubilizados em acetona e acetato de etila, sobre larvas de *R. microplus* e verificou que não houve mortalidade significativa de larvas e a sobrevivência variou entre 95 a 100%.

O extrato acetato de etila controlou 100% da reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e induziu a mortalidade de 95,11% de larvas desse ácaro. Esses resultados indicam a importância desse extrato, considerando a legislação pertinente para a comercialização de acaricidas no Brasil (Ministério da Agricultura 1990), que exige, para obtenção do registro de acaricidas, o controle de no mínimo 95% dos ixodídeos. Sugere-se a atividade desse extrato à presença de monofluoracetato (De-Moraes-Moreau et al., 1995) ou pelo sinergismo do fluoracetato com os alcalóides N-metiltiramina e 2-metiltetrahydro- β -carbolina presentes nas folhas dessa planta (Kemmerling, 1996). Entretanto, a mais provável atividade desse extrato está relacionada à presença do ácido monofluoracético (Tokarnia et al., 1979), o qual interfere no metabolismo energético das células, precisamente, no ciclo de Krebs, ocasionando diminuição do metabolismo da glicose, do armazenamento de energia e da respiração celular (Oliveira et al., 2003). A concentração inibitória mediana (CI₅₀ = 5,79 mg/ml) para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, obtidas com o extrato acetato de etila (Figura 32) apresentou maior toxicidade que a CI₅₀ = 54 mg/ml observada no trabalho realizado por Williams (1993), que avaliou o efeito do extrato etanólico de *Artocarpus altilis* sobre a reprodução desse ácaro. O maior potencial acaricida do extrato acetato de etila de *P. marcgravii* em relação aos metabólitos secundários presentes naquela Moraceae, que apesar de apresentar atividade acaricida, apresentou concentração muito alta, inviabilizando uma possível comercialização do produto, pode ser

atribuído ao efeito tóxico do ácido monofluoracético reportado por Tokarnia et al., (1979), observando-se que, neste trabalho, constatou-se a presença de ácido orgânico nesta espécie por meio de análise cromatográfica em camada delgada.

Observou-se que o extrato acetato de etila, na concentração de 25 mg/ml, controlou a reprodução de 82,16% de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Percentuais semelhantes de redução de eficiência reprodutiva foram obtidos por Campos et al. (2005) que utilizaram a linhagem B 157, na concentração de 10 conídios/ml do fungo *Beauveria amorpha*, a qual controlou a reprodução desse ixodídeo em 82,77%. Apesar dos resultados apresentarem semelhança, a utilização do extrato pode ser mais recomendável devido a sua ação ser mais rápida que a ação do microrganismo, que desenvolve um processo infectivo mais lento sobre o hospedeiro, além de necessitar de condições favoráveis de temperatura, umidade, luminosidade, radiação, aplicação e outros para desenvolver o ciclo completo da relação fungo-hospedeiro (Alves, 1998).

Nos ensaios com o extrato etanólico estimou-se para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* CI₅₀ de 32,14 mg/ml e para larvas desse ácaro CL₅₀ de 4,38 mg/ml. A atividade acaricida apresentada por esse extrato, foi semelhante à atividade observada por Williams (1993), que, ao avaliar o efeito do extrato etanólico de *Azadirachta indica* sobre a reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, observou CI₅₀ = 46 mg/ml. Para larvas, a concentração letal mediana foi maior que as obtidas por Souza et al. (2006b) que, utilizaram os produtos químicos cipermetrina e amitraz e observaram CL₅₀ = 2,99 e CL₅₀ = 17,22 ppm respectivamente. Entretanto a utilização de produto químico desenvolve resistência aos ácaros, além de causarem efeitos negativos ao meio ambiente (Chagas et al., 2002a). Desta forma se torna mais viável o controle do ácaro por extrato botânico, com substâncias extraídas de plantas, as quais são obtidas de recursos renováveis e rapidamente degradáveis, além do desenvolvimento da resistência dos

ácaros, a essas substâncias, ser muito mais lento, devido à associação de vários princípios ativos e múltiplos modos de ação, tornando possível um amplo espectro de uso enquanto retém uma ação seletiva dentro de cada classe de praga (Quarles, 1992).

Entre os extratos avaliados, o que apresentou maior toxicidade para fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* foi o extrato acetato de etila, provavelmente pela maior concentração de ácido monofluoracético nesse extrato, proporcionando um maior potencial tóxico sobre o ácaro. Esse resultado demonstra a atividade acaricida de *P. marcgravii*, que, embora ainda não tenha registros na literatura de seu efeito tóxico sobre ácaros, já foi comprovada a sua atividade inseticida por Silva (2005) e Gonzaga et al. (2007) sobre adultos de *Aetalion* sp. e *Aphis spiraeicola*, respectivamente, observando mortalidade significativa.

4.17 Toxicidade de extratos de *P. marcgravii* e *P. aduncum* para larvas de *R. microplus*.

A comparação de toxicidade para larvas de *R. microplus* entre os extratos de folhas de *P. marcgravii* e *P. aduncum*, utilizando os valores dos intervalos de confiança de duas concentrações letais medianas (CL50), está demonstrada na Tabela 13.

Tabela 13 – Toxicidade de extratos vegetais para larvas de *R. microplus* (concentração letal mediana – CL50)

Entre os quatro extratos avaliados utilizados para a determinação da concentração letal mediana para larvas de *R. microplus*, verificou-se que o extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* apresentou maior toxicidade (CL50 = 2,46 mg/ml) sendo, estatisticamente, diferente dos demais extratos apresentados na Tabela 13. Estes resultados podem ser atribuídos ao alto potencial toxicológico do ácido monofluoracético em relação aos compostos químicos presentes nos outros extratos, ressaltando que o extrato etanólico de *P. marcgravii* apresentou o valor da concentração letal mediana mais próximo da concentração letal mediana determinada pelo extrato acetato de etila, provavelmente pela presença desse ácido naquele extrato, porém em menores teores.

4.18 Atividade acaricida do extrato hexânico de *D. negrensis*. sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Os valores médios de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extrato hexânico de caule de *D. negrensis*, estão apresentados na Figura 49. Verificou-se baixo potencial acaricida desse extrato, com médias de mortalidade crescentes, entretanto as concentrações avaliadas não apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

Figura 49 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a concentrações de extrato hexânico de caule de *D. negrensis*.

O extrato hexânico de caule de *D. negrensis* mostrou percentuais crescentes de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* variando de 10,12 a 29,13%, entretanto as concentrações avaliadas, quando comparadas, não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 50).

Figura 50 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* nas diferentes concentrações de extrato hexânico de folhas de *D. negrensis*.

A Figura 51 apresenta os valores percentuais de mortalidade de larvas de *R. microplus*, submetidas às concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 mg/ml de extrato hexânico de caule de *D. negrensis*, verificando-se que a mortalidade variou de 25,38 a 50,03%. Nas avaliações realizadas utilizando o extrato hexânico de *D. negrensis*, verificou-se que a maior eficiência desse extrato foi em relação à mortalidade larvas de *R. microplus*.

Figura 51 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* submetidas a concentrações de extrato hexânico de caule de *D. negrensis*.

4.19 Atividade acaricida do extrato acetato de etila de *D. negrensis*. sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Nas concentrações avaliadas de extrato acetato de etila de caule de *D. negrensis* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificou-se que a maior concentração (100 mg/ml) induziu

a mortalidade de 26% dos ixodídeos, não apresentando diferença estatística em relação às concentrações de 25, 50 e 75 mg/ml (Figura 52).

Figura 52 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a concentrações de extrato acetato de etila de caule de *D. negrensis*.

O percentual de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, expostas a concentrações de extrato acetato de etila de caule de *D. negrensis*, variou de 24,01 a 37,28%, verificando-se que não houve diferença estatística entre as concentrações avaliadas (Figura 53).

Figura 53 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato acetato de etila de caule de *D. negrensis*.

O extrato acetato de etila de *D. negrensis*, na maior concentração avaliada (20 mg/ml), induziu a mortalidade de 47,15% de larvas de *R. microplus* (Figura 54), verificando-se que na três avaliações toxicológicas realizadas com esse extrato, a maior eficiência apresentada foi em relação ao controle de larvas de *R. microplus*.

Figura 54 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às diferentes concentrações de extrato acetato de etila de *D. negrensis*.

4.20 Atividade acaricida do extrato etanólico de *D. negrensis*, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

O extrato etanólico de caule de *D. negrensis* apresentou baixo potencial toxicológico para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificando-se que as médias de mortalidade foram crescentes, entretanto não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (Figura 55).

Figura 55 – Valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a concentrações de extrato etanólico de caule de *D. negrensis*.

Os valores percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, expostas a concentrações de extrato etanólico de caule de *D. negrensis*, estão apresentados na Figura 56. Observou-se que os valores percentuais de inibição de oviposição foram crescentes, variando de 13,20 a 25,95%, porém não apresentaram diferença estatística.

Figura 56 – Percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extrato etanólico de caule de *D. negrensis*.

A Figura 57 apresenta os valores percentuais de mortalidade de larvas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de caule de *D. negrensis*. Verificou-se que a mortalidade variou de 16,12 a 32,17% nas concentrações avaliadas. Utilizando esse extrato, os melhores resultados apresentados foram em relação ao controle de larvas.

Figura 57 – Médias de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às diferentes concentrações de extrato etanólico de *D. negrensis*.

4.21 Comparação dos percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos de *D. negrensis*.

Os valores percentuais de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos de caule de *D. negrensis* encontram-se na Tabela 14 e 15

respectivamente. Os extratos avaliados induziram percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* abaixo de 50%. Verificou-se que o extrato hexânico induziu

a mortalidade de 50,03% de larvas, porém esse percentual é o observado, sendo que esse percentual corrigido por Probit foi abaixo de 50%.

Tabela 14 – Percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de *D. negrensis*.

Tabela 15 – Percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de *D. negrensis*.

4.22 Comparação dos percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em relação às concentrações de extratos de *D. negrensis*.

A Tabela 16 apresenta os valores percentuais de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a diferentes concentrações de extratos de caule de *D. negrensis*, verificando-se que o extrato acetato de etila na concentração de 100mg/ml inibiu 37,28% da oviposição, porém não foi estatisticamente diferente dos demais extratos.

Tabela 16 – Valores médios de inibição de oviposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas às concentrações de extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de caule de *D. negrensis*.

4.23 Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com extratos de *D. negrensis*.

Os valores referentes à eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, submetidas a diferentes concentrações de extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de folhas de *D. negrensis*, estão representados na Tabela 17.

Comparando-se a toxicidade dos três extratos em relação ao controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificou-se que o extrato acetato de etila apresentou maior

eficiência em relação aos demais, controlando, na concentração de 100mg/ml, 47,86% da

reprodução. Os extratos hexânico e etanólico, na maior concentração avaliada, não foram diferentes estatisticamente.

Tabela 17 – Eficiência reprodutiva e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* submetidas a extratos hexânico (H), acetato de etila (A) e etanólico (E) de *D. negrensis*.

Os extratos do caule de *D. negrensis* induziram maior percentual de mortalidade de larvas em relação a fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Observa-se na Tabela 14 que o extrato acetato de etila apresentou maior toxicidade induzindo a mortalidade de 26% de ácaros adultos, enquanto que para larvas, o extrato hexânico induziu a mortalidade de 50,03%, proporcionando maior mortalidade em relação ao extrato acetato de etila, que causou 47,15% de mortalidade,

porém não apresentaram diferenças estatísticas (Teste t-Student). O extrato acetato de etila foi mais eficiente no controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas (47,86%) em relação aos demais extratos (Tabela 17).

Observando-se os resultados obtidos neste trabalho em relação à mortalidade de fêmeas ingurgitadas utilizando o extrato acetato de etila, verifica-se semelhança com os resultados obtidos por Pereira & Famadas (2004), os quais avaliaram a eficiência do extrato etanólico da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) em *R. microplus*, verificando-se mortalidade de 34% de ácaros adultos. Esses resultados sugerem que os ácaros adultos são mais resistentes a esses extratos do que as larvas, sendo que a diferença de composição da cutícula entre larvas e fêmeas ingurgitadas é que possa justificar os resultados obtidos, devido a formação da camada externa da cutícula dos carrapatos ser formada por ceras (Balashov, 1972) e que somente a partir do estágio ninfal, *R. microplus* apresenta essa camada de proteção (Odhiambo, 1982).

Em relação à mortalidade de larvas e controle de reprodução de fêmeas ingurgitadas, os resultados obtidos nesse trabalho diferem dos encontrados por Pereira & Famadas (2004), os quais obtiveram taxas de mortalidade de 93,92% de larvas e um percentual de 79,73% no controle de reprodução desse ácaro. Estes resultados podem ser atribuídos à menor concentração de rotenona no caule de timbó e a maior concentração ser encontrada nas raízes, podendo variar de 5 a 13%, dependendo da espécie (Costa et al., 1999). Confirmando o maior potencial de extratos das raízes em relação aos do caule de plantas do gênero *Derris*, Maini & Morallo (1993)

analisaram o efeito tóxico de *Derris elliptica* sobre caracóis e lesmas, verificando que o extrato aquoso da raiz foi tóxico na concentração de 2000 ppm, induzindo a mortalidade de 30%, enquanto que o extrato aquoso do caule proporcionou o mesmo percentual de mortalidade na concentração de 10000 ppm.

Pesquisas realizadas por diversos autores (Caminha Filho, 1940; Maia, 1976; Mariconi, 1988; Saito & Luchini, 1998; Fazolin et al., 2002; Kathrina & Antonio, 2004; Cloyd, 2004; Alécio, 2007) reportam a presença da rotenona em plantas da família Leguminosae e seu efeito tóxico para insetos e ácaros. Entretanto observou-se, neste trabalho, que o extrato do caule

de *D. negrensis* induziu mortalidade e controle de reprodução de *R. microplus* abaixo de 50%. Isso pode ser atribuído às baixas concentrações de rotenona presentes no caule dessa espécie, constatando-se o que foi reportado por Costa et al. (1999), que entre as plantas conhecidas como timbó, as que possuem os maiores teores de rotenona são as pertencentes aos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus* e a maior concentração desse composto se encontra nas raízes. Podemos fazer uma

análise sobre a importância da rotenona no controle de *R. microplus*, porém temos que levar em consideração que esse composto por se encontrar na raiz da planta necessita de plantio e produção em larga escala para ser bioindustrializado, pois se não houver um programa de uso sustentável, a coleta da raiz ocasionará a morte da planta e, conseqüentemente, impacto ambiental.

Entre os três extratos avaliados, o extrato acetato de etila foi o que apresentou melhores resultados quanto à mortalidade e controle de reprodução de *R. microplus*. Entretanto, induziu a mortalidade e controlou a reprodução abaixo de 50%, não sendo possível estimar a concentração letal mediana, sendo que esse extrato em relação às das outras espécies, avaliadas neste trabalho, que apresentaram toxicidade, foi o que apresentou menor potencial toxicológico sobre *R. microplus*.

Portanto o extrato acetato de etila de folhas de *P. marcgravii* e o óleo essencial de *P. aduncum* são eficientes no controle de *R. microplus*, podendo ser uma alternativa de produtos acaricidas para o manejo e controle desse ácaro, a fim de substituir ou minimizar o uso de defensivos químicos no campo.

Este trabalho possibilitou perspectivas para futuras investigações, utilizando os extratos de *P. aduncum* e *P. marcgravii*, envolvendo os seguintes temas: analisar quimicamente o extrato hexânico de *P. aduncum*; fracionar e isolar os compostos químicos existentes e avaliar suas atividades biológicas sobre *R. microplus*; analisar quimicamente e avaliar o potencial acaricida do óleo essencial extraído diretamente das folhas de *P. aduncum* sobre *R. microplus* “in vitro” e em campo; isolar o fenilpropanóide dilapiol do óleo essencial de *P. aduncum*, verificar sua atividade sobre *R. microplus* e estudar sua toxicidade; realizar teste histopatológico e teste de citotoxicidade com o extrato hexânico e óleo essencial de *P. aduncum*; avaliar o potencial acarida do extrato acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii* sobre *R. microplus* em teste de campo; fracionar e isolar os compostos químicos existentes nos extratos acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii* e avaliar suas atividades biológicas sobre *R. microplus*; analisar quimicamente os extratos acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii*, a fim de elucidar as estruturas químicas dos compostos com atividade acaricida; realizar teste histopatológico e teste de citotoxicidade com os extratos acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii*.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, em condições experimentais, neste trabalho, podemos concluir que:

Os extratos hexânico de *P. aduncum* e hexânico, acetato de etila e etanólico de *P. marcgravii* apresentaram potencialidade acaricida;

O extrato hexânico de *P. aduncum* estimou CL50 apenas para larvas;

O óleo essencial encontrado no extrato hexânico bruto de *P. aduncum* induziu a mortalidade de 100% de larvas de *R. microplus* em baixas concentrações (0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml;

1 mg/ml);

O óleo essencial de *P. aduncum* se destacou pelo alto potencial acaricida com a particularidade adicional de apresentar na sua composição química apenas um composto majoritário, o fenilpropanóide dilapiol (94,84%);

O extrato hexânico de *P. marcgravii* estimou CL50 apenas para larvas.

O extrato acetato de etila de *P. marcgravii* foi o mais eficiente no controle de fêmeas ingurgitadas (CL50 = 30,08 mg/ml) e larvas (CL50 = 2,46 mg/ml) de *R. microplus*;

O extrato acetato de etila de *P. marcgravii* controlou a reprodução de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* acima de 95%;

O extrato etanólico de *P. marcgravii* estimou CL50 para fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus*;

Os extratos de *D. negrensis* não estimaram CL50 para fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W.S.A. (1925). Method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Ent.* College Park. 18: 265-266.
- Abreu, O.; Pino, J.A. (2008). Leaf oil composition of *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. CD.) Saralegui from Cuba. *Natural Product Communications*. 3(2): 271-273.
- Albuquerque, J.M. (1980). Identificação de plantas invasoras de culturas da região de Manaus. *Acta Amazônica*. 10: 47-95.
- Alécio, M.R. (2007). Toxicidade do extrato de *Derris amazônica* Killip a adultos de *Cerotoma arcuatus* Olivier, 1971 (Coleoptera: Chrysomelidae). Dissertação de mestrado. Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais da Amazônia – PIPGBTRN, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.
- Almeida Neto, P.P. (2004). Os sistemas agroflorestais dos Katitauru “território dos saberes, geografia da biodiversidade”. *Revista de Geografia da UFC*, ano 3, n.5.
- Alonso-Díaz, M.A.; Garcia, L.; Galindo-Velasco, E.; Lezama-Gutierrez, L.; Angel-Sahagúm, C.A.; Rodriguez-Vivas, R.I.; Fragoso-Sánchez, H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 147: 336-340.
- Alves, S.B. (1998). Controle microbiano de insetos. 2 ed. FEALQ: Piracicaba, 1163p.
- Alves-Branco F.P.J.; Echevarria, F.A.M.; Siqueira, A.S. (1983). Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). Comunicado técnico EMBRAPA. 1:1-4.
- Alves-Branco, F.P.J.; Sapper, M.F.M.; Artiles, J.M.J. (1992). Diagnóstico de resistência de *Boophilus microplus* a piretróides. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária. Anais. p. 44. Gramado, 1992.
- Amaral, N.K.; Nonmany, L.G.S.; Carvalho, L.A.D. (1974). Acaricide AC 84,633: First trials for control of *Boophilus microplus*. *J. Econ. Ent.* 67: 387-389.
- Amaral, M.A.Z.; Prata, M.C.A.; Furlong, J.; Daemon, E. (2004). Biologia de *Boophilus microplus* a partir de infestações artificiais em coelhos. Resultados Preliminares. In: XXV Congresso Brasileiro de Zoologia. Resumos. p.461, Brasília: UNB, 2004.

Andreotti, R. (2002). Caracterização de inibidores de serinoproteases (bmtis) presentes em larvas de carrapatos *Boophilus microplus* e o seu efeito no controle a infestação parasitária em bovinos. Tese de doutoramento. Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, Brasil.

Arthur, D.R. (1960). Ticks. A monograph of the Ixodoidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaropus*. London: Cambridge University Press. 251p.

Azevedo, F.R.; Guimarães, J.A.; Braga Sobrinho, R.; Lima, M.A.A. (2005). Eficiência de produtos naturais para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em meloeiro. *Arq. Inst. Biol.* 72(1): 73-79.

Babes, V. (1888). Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences.* 107: 692-694.

Bahiense, T.C.; Fernandes, E.K.; Bittencourt, V.R.E.P. (2006). Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Vet. Parasitol.* 141: 319-324.

Balashov, Y.S. (1972). Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals (translation from Russian). *Misc Publ Entomol.* 8(5): 161-165.

Baldoqui, D.C.; Kato, M.J.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.; Furlan, M. (1999). A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry.* 51(7): 899-902
Basso, L.M.S.; Monteiro, A.C.; Andrade Belo, M.A.; Soares, V.E.; Garcia, M.V.; Mochi, D.A. (2005). Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. *Pesq. Agropec. Bras.* 40(6): 595-600.

Bastos, C.N.; Albuquerque, P.S.B. (2004). Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em póscolheita de *Colletotricum musae* em banana. *Fitopatol. Bras.* 29: 555-557.

Bhuiyan, M.K.R.; Hassan, E.; Isman, M.B. (2001). Growth inhibitory and lethal effects of some botanical insecticides and potential synergy by dilapiol in *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera Noctuidal). *J. Plant. Dis. Prot.* 108: 82-88.

Bittencourt, V.R.E.P.; Macarenhas, A.G.; Faccini, J.L.H. (1999). Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato bovino *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Cienc. Rural.* 29: 351-354.

Borges, L.M.F.; Ferri, P.H.; Silva, W.J.; Silva, W.C.; Silva, J.G. (2003). In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med. Vet. Entomol.* 17(2): 228-231.

- Borges, L.M.F.; Ferri, P.H.; Silva, W.C.; Silva, W.J.; Melo, L.S.; Souza, L.A.D.; Soares, F.S.; Faria, K.A.; Gomes, N.A.; Mori, A.; Silva, N.F. (2005). Ação do extrato hexânico de fruto maduro de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. *Med. Vet. Entomol.* 34(1): 53-59.
- Brum, J.G.W. (1988). Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont et al., 1981: etiopatogenia e sazonalidade. Tese de doutoramento. Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Bullman, G.M.; Muños Cabenas, M.E.; Ambrustolo, R.R. (1996). El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. *Veterinária Argentina.* 8: 3-15.
- Burke, B.; Nair, M. (1986). Phanylpropene benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican Piper species. *Phytochemistry.* 25(6): 1427-1430.
- Buss, E.A.; Park-Brown, S.G. (2002). Natural products for insect pest management. Disponível(online) <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN19700.pdf> (acesso: 31 de março de 2008).
- Caminha Filho, A. (1940). Timbós e rotenona: uma riqueza nacional inexplorada. 2. ed. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, 14p.
- Campos Júnior, D.A.; Oliveira, P.R. (2005). Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Cienc. Rural.* Santa Maria. 35(6): 1386-1392.
- Campos, R.A.; Arruda, W.; Boldo, J.T.; Silva, M.V.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. (2005). *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like protease and chitinases. *Curr. Microbiol.* 50: 257-261.
- Cascon, S.C.; Moraes, W.B. (1962). Substâncias isoladas da *Palicourea maracgravii* St. Hil. Uma nova síntese de N-metil-tiramina. *Anais da Associação Brasileira de Química.* 21: 53-60.
- Chagas, A.C.S. (2001). Efeito acaricida de produtos naturais e sintéticos de plantas e solventes sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Tese de doutoramento. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T., Leite, R.C., Furlong, J., Fortes, I.C.P., (2002a). Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo. 39(5): 247-253.
- Chagas, A.C.S.; Prates, H.T.; Leite, R.C.; Furlong, J. (2002b). Ação larvicida de derivados arilsulfonílicos da (+)-cânfora e da (+)-isopinocanfona sobre o carrapato *Boophilus microplus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Belo Horizonte. 54(5): 462-467.

- Chagas, A.C.S., Leite, R.C., Furlong, J., Prates, H.T., Passos, W.M., (2003). Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciência Rural*. Santa Maria. 33(1), 109-114.
- Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda, S.; Jansawan, W. (1991). Acaricidal effect of plant crude extracts on the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Kasetsart J. (Nat. Sci. Suppl.)*. 25: 90-100.
- Chungsamarnyart, N.; Jansawan, W. (1996). Acaricidal activity of peel oil of *Citrus* spp. on *Boophilus microplus*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 30: 112-117.
- Cloyd, R.A. (2004). Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? *Illinois Pesticide Review*. 17(3): 1-8.
- Corbett, C.E. (1940). *Plantas ictiotóxicas: farmacologia da rotenona*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 157p.
- Corrêa, R.S. (2006). Toxicidade de extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth (Timbó) sobre *Toxoptera citricida* Kirkald (pulgão preto dos citros)(*Sternorrhyncha: Aphididae*). Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.
- Costa, J.P.C.; Alves, S.M.; Belo, M. (1999). Teores de rotenona em clones de timbó (*Derris* spp., Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia e os seus efeitos na emergência de imagos em *Musca domestica* L. *Acta Amaz.* 29(4): 563-573.
- Costa-Júnior, L.M.; Chagas, A.C.S.; Furlong, J.; Reis, E.S.; Mascaro, U.C.P. (2002). Eficiência in vitro de rotenóides extraídos do Timbó (*Derris urucu*) em teleóginas do carrapato *Boophilus microplus*. . In: XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Anais. Rio de Janeiro: CBPV, 2002. CD-Rom. PJ Eventos.
- Cravero, E.S.; Guerra, M.S.; Silveira, C.P.D. (1976). *Manual de inseticidas e acaricidas: aspectos toxicológicos*. Pelotas: Aimara Ltda. 229p.
- Da Silva Vaz Júnior, I. (1997). Caracterização de proteínas de *Boophilus microplus* como imunógeno em vacina contra o carrapato. Tese de doutoramento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Dantas, D.A.; Maganha, M.; Beretta, T.E.; Nozu, P.; Pereira, G. da S.; Matias, R.; Sólón, S.; Resende, U.; Koller, W.W.; Gomes, A. (2000). Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In: II Encontro de pesquisa e iniciação científica da UNIDERP. Anais. pp. 119-120. Campo Grande, 2000.
- Davey, R.B.; George, J.E.; Miller, R.J. (2003). Efficacy of various concentrations of coumaphos to control adult, nymphal, and larval stages of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* on infested cattle. *Am. J. Vet. Res.* 64 (6): 684-689.

Davey, R.B., Miller, R.J., George, J.E. (2008). Efficacy of amitraz applied as a dip against an amitraz-resistant strain of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle. *Vet. Parasitol.* 152: 127-135.

De-Moraes Moreau, R.L.; Haraguchi, M; Morita, H. Palermo-Neto, J. (1995). Chemical and biological demonstration of the presence of monofluoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Braz J Med Biol Res.* 28: 685-692.

Drummond, R.O.; Ernest, de S.E.; Trevino, J.L.; Gladney W.J.; Grahan, O.H. (1973). *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Ent.* 66(1): 130-133. Elder, J.K.; Kearnan, J.F.; Waters, K.S.; Dunwell, G.H.; Emmerson, F.R.; Knott, S.G. (1980). A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. *Aust. Vet. J.* 56: 219–231.

Estrela, J.L.V.; Fazolin, M.; Catani, V.; Alécio, M.R.; de Lima, M.S. (2006). Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *Pesq. Agropec. Bras.* 41(2): 217-222. Falkenberg, M.B.; Santos, R.I.; Simões, C.M.O. (1999). Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 1 ed. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. pp. 163-179.

FAO Plant Protection Bulletin (1971). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides. Tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus microplus* spp. *FAO method.* 19(7): 15-18.

Farias, M.P.O.; Sousa, D.P.; Arruda, A.C.; Wanderley, A.G.; Alves, L.C.; Faustino, M.A.G. (2007). Eficácia “in vitro” do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Ver. Bras. Plant. Med.* 9(4): 68-71.

Farias, N.A.R. (1995). Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba/RS: Agropecuária. 80p. Fazolin, M.; Estrela, J.L.V.; de Lima, A.P.; Argolo, V.M. (2002). Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinha-do-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyné). Rio Branco: Embrapa Acre: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. n.37, 42p.

Fazolin, M.; Estrela, J.L.V.; Catani, V.; de Lima, M.S.; Alécio, M.R. (2005). Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Crysomelidae). *Neotrop. Etmol.* 34: 485-489.

Fazolin, M.; Estrela, J.L.V.; Catani, V.; Alécio, M.R.; Lima, M.S. (2007). Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC.; *Piper aduncum* L.; e *Tanaecium*

nocturnum (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758(1). *Ciênc. Agrotec., Lavras*. 31(1): 113-120.

Fernandes, E.K.K.; Costa, G.L.; Bittencourt, V.R.E.P. (2002). Potencial entomopatogênico de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* isolados e testados em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus*. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: CBPV, 2002. CD-Rom. PJ Eventos.

Fernandes, F.F., Freitas, E.P.S. (2007). Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasit.* 147: 150-154.

Finney, D.J. (1971). *Probit analysis*. 3th ed. London: Cambridge University Press. 25p.

Flora Brasiliensis. (1862). Obra. 15, part.1, 289p.

Furlong, J.; Martins, J.R.; Prata, M.C.A. (2007). O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *Hora Vet.* 27: 26-32.

Gaia, J.M.D.; Mota, M.G.C.; Conceição, C.C.C. (2004). Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. *Hortic. Bras.* 22: 686-689.

Gonçalves, K.; Toigo, E.; Ascoli, B.; Von Poser, G.; Ribeiro, V.L.S. (2007). Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol. Res.* 100: 1267-1270.

Gonzaga, A.D; Ribeiro, J.D; Vieira, M.F; Alécio, M.R. (2007) Toxidez de três concentrações de Erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hil.) e manipueira (*Manihot esculenta* Crantz) em pulgão verde dos citros (*Aphis spiraecola* Patch) em casa de vegetação. *Rev. Bras. Biociênc.*5: 55-56.

Gonzales, J.C. (1974). *O carrapato do boi: vida, resistência e Controle*. São Paulo: Mestre Jou. 101p.

Gonzales, J.C. (1975). *O controle do carrapato dos bovinos*. 2.ed. Porto Alegre : Sulina, 103p.

Gonzales, J.C. (1995). *O controle do carrapato do boi*. 2 ed.. Porto Alegre: Edição do autor. 80p.

Gorniak, S.L.; de Souza-Spinosa, H.; Palermo-Neto, J. Ferro, V.O.; de Oliveira, F. (1986). Chromatographic isolation of caffeine from *Palicourea marcgravii*. *Vet. Human Toxicol.*28(6): 542-542.

Gottlieb, O.R.; Koketsu, M.; Magalhães, M.T.; Maia, J.G.S.; Mendes, A.I.R.; da Silva, M.L.; Wilberg, V.C. (1981). Óleos essenciais da Amazônia. VII. *Acta Amaz.* 11: 143-148.

- Graham, O.H.; Hourrigan, J.L. (1977). Eradication programs for the arthropod parasite of livestock. *J. Med. Entomol.* 13: 629-59.
- Green, S.B.; Salkind, N.J. (2004). *Using SPSS for windows and macintosh – analyzing and understanding data*. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall. 457p.
- Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P.; Drilleau, J.F. (1998), Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1698-1705.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. (1977). Trimmed spearman karber method for stimating median lethal concentration in toxicity biossays. *Environ. Sci. Technol.* 11: 714-719.
- Harvey, G.T.; Brown, A.W.A. (1951). The effect of insecticides on the rate of oxygen consumption in *Blatella*. *Can. J. Zool.* 29: 42-53.
- Hebling-Beraldo, M.J.A.; Polezi, K.R.; Almeida, R.E. (1983). Efeitos respiratórios de acephate, metamidophos e naled (inseticidas organofosforados) em *Atta sexdens rubropilosa* Forel e (*F. Smith*) (Hymenoptera: Formicidae). *Naturalia*, 8: 85-90.
- Hewetson, R.W. (1972). The inheritance of resistance by cattle to catle tick. *Aus. Vet. J.* 48(5):299-303.
- Hoehne, F.C. (1932) Plantas tóxicas e suspeitas da flora brasileira. *Palicourea marcgravii* St. Hil. (*Psychotria maregravii* Spreng.). Herva-de-rato verdadeira. *Rev. Ind. Anim.* 2(8): 873-881.
- Horn, S.C. (1987). Bovine ectoparasites and their economic impact in South America. In: *Proceedings MSD Agvet Symposium in association with the 23 World Veterinary Congress*. Leaning, W.H.D.; Guerrero, J. (Ed.) *The economic impact of parasitism in cattle*. pp.77-80. Montreal, 1987.
- Kaaya, G.P.; Hassan, S.; (2000). Entomopatogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp. App. Acarol.* 24: 913-926.
- Kathrina, G.A.; Antonio, L.O.J. (2004). Controle biológico de insetos mediante extractos botânicos. In: Cabral, M.; Guaharay, F. (Ed.). *Control Biologico de Plagas Agrícolas*. Managua: CATIE, Série Técnica. Manual Técnico/CATIE, 53. pp.137-160.
- Kaufman, W.R. (1989). Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitol. Tod.* 5: 47–56.
- Kemmerling, W. (1996) Toxicity of *Palicourea marcgravii*: combined effects of fluoroacetate, N-methyltyramine and 2-methyltetrahydro-beta-carboline. *Zeitschrift für Naturforschung*, 51: 59-64.

Lago, J.H.G.; Ramos, C.S.; Casanova, D.C.C.; Morandim, A.A.; Bergamo, D.C.B.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.S.; Furlan, M.; Guimarães, E.F.; Young, M.C.M.; Kato, M.J. (2004). Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.* 67(11): 1783-1788.

Lima, R.R. (1987). Informações sobre duas espécies de timbó: *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride e *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride, como plantas inseticidas. Belém: Embrapa-CPATU (Documentos, 42). 23p.

Londt, J.G.H.; Arthur, D.R. (1975). The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). *J Ent Soc Sth Afr.* 38: 321–340.

Lord, K.A. (1949). The effect of insecticides on the respiration of *Oryzaephilus surinamensis*: an attempt to compare the speeds of action of a number of DDT analogues. *Ann. Appl. Biol.* 36(1): 113-138.

Mabry, T J; Markham, K R; Thomas, M B. (1970) Systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York, USA. pp. 354.

Maia, J.G.S. (1976). Estudo químico de *Derris negrensis*. *Acta Amaz.* 1: 59-61.

Maia, J.G.S.; Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L.; da Luz, A.I.R.; Bastos, C.N. (1998). Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flav. Frag. J.* 13: 269-272.

Maia, J.G.S; Zoghbi, M.G.B; Andrade, E.H. (2001). Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi (Coleção Adolpho Ducke). 173p.

Maini, P.N.; Morallo, R.B. (1993). Molluscicidal activity of *Derris elliptica* (Farm.Leguminosae). *Philipp. J. Sci.* 122(1): 61-69.

Maklouf, L.A. (1986). A volta do timbó: o terror das pragas. *Globo Rural*, São Paulo. 11: 96-89.

Mariconi, F.A.M. (1988). Inseticidas e seu emprego no combate às pragas: com uma introdução sobre o estudo dos insetos. 7 ed. São Paulo: Nobel. 466p.

Martin, P.M.; Horwitz, K.B.; Ryan, D.S.; McGuire, W.L. (1978). Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 103(5): 1860-1867.

Martins, J.R. (2004). Manejo da resistência aos carrapaticidas. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13:114-115.

Martins, R.M. (2006). Estudo in vitro da ação acaricida do óleo essencial da gramínea Citronela de Java (*Cymbopongo Winterianus* Jowitt) no carrapato *Boophilus microplus*. *Rev. Bras.Plant. Med.* 8(2): 71-78.

- Mendes, M.C.; Braggio, M.M.; Haraguchi, M. (2002). Efeitos dos extratos de *Sesbania virgata*, *Tabebuia ochracea* e *Tecoma stans* em larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini). In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Anais. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. CD ROM.
- Mesquita, J.M.O.; Cavaleiro, C.; Cunha, A.P.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. (2005). Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Rev. Bras. Farmacog.* 15(1): 6-12.
- Mgbojikwe, L.O., Okoye, S.C., (2001). Acaricidal Efficacy of the Aqueous Stem Bark Extract of *Adenium obesum* on the Various Life Stages of Cattle Ticks. *Nig. J. Exp. Appl. Biol.* 2: 39-43.
- Ministério da Agricultura. (1990). Portaria n. 90 de 04 de dezembro de 1989. Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários. *Diário Oficial*, 22 jan, séc.1, col. 2.
- Moreira, D.L.; Guimarães, E.F.; Kaplan, M.A. (1998). A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*. 48(6): 1075-1077.
- Morita, H.; Ichihara, Y.; Takeya, K.; Watanabe, K.; Itokawa, H.; Motidomem, M. (1989). A new indole alkaloid glycoside from the leaves of *Palicourea marcgravii*. *Plant. Med.*, 55: 288-289.
- Novelino, A.M.; Daemon, E.; Soares, G.L. (2007). Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. *Parasitol. Res.* 101: 809-811. Odhiambo, T.R. (1982). *Current themes in tropical science: physiology of ticks*. Pergamon Press, Oxford. 508p.
- Okunade, A.L.; Hufford, C.D; Clark A.M; Lentz, D. (1997). Antimicrobial Properties of the constituents of *Piper aduncum*. *Phytother. Res.* 11: 142-144.
- Oliveira, L.C.P.; Mause, R.A.; Nunomura, S.M. (2005). Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *Piper aduncum* L. *J. Braz. Chem. Soc.* 16(6): 1439-1442.
- Oliveira, J.C.S.; Dias, O.J.M.; Camara, C.A.G.; Schwartz, M.O.E. (2006). Volatile constituents of the leaf oils of *Piper aduncum* L. from different regions of pernambuco (Northeast of Brazil). *J. Essent. Oil Res.* 18(5): 557-559.
- Oliveira, M.M. (1963). Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Experientia*. 19: 586-587.

- Oliveira, R.B.; Godoy, S.A.P.; Costa, F.B. (2003). Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes. 1 ed. Ribeirão preto, São Paulo: Holos. 64p.
- Onofre, S.B., Miniuk, C.M., Barros, N.M., Azevedo, J.L., (2001). Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am. J. Vet. Res.* Shranbrook - IL. USA. 62: 1478-1480.
- Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. (1993). Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Dep. Pharm. Swiss Fed. Inst. Technol., Zurich, Switz. Plant. Med.* 59(6): 546-551.
- Orjala, J; Wright, A.D; Behrends, H; Folkers, G.; Sticher, O. (1994). Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.* 57: 18-26.
- Pereira, A.C.L. (2006a). Utilização de óleos essenciais e fixos no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em *Caupi*, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. armazenado. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Pereira, J.R. (2006b). In vitro efficacy of comercial formulations of ixocidides in engorged female of *Boophilus microplus* collected of dairy cattle at Paraíba Valey in the state of São Paulo. *Rev. Bras. Parasitol Vet.* 15: 45-48.
- Pereira, J.R.; Famadas, K.M. (2004). Avaliação “in viro” da eficiência do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (Leguminosae, Papilionidae, Millettiedae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887) na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol. São Paulo.* 71(4): 443-450.
- Pereira, J.R.; Famadas, K.M. (2006). The efficiency of extracts of *Dahlstedtia pentaphylla*(Leguminosae, Papilionoidae, Millettiedae) on *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in artificially infested bovines. *Vet. Parasit.* 142: 192-195.
- Pereira, M.C. (1982). *Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica. 1. ed. São Paulo: Químico Divisão Veterinária. 105p.
- Pino, J.A.; Marbot, R.; Bello, A.; Urquiola, A. (2004). Essential oils of *Piper peltatum* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Havana, Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 16(2): 124-126.
- Price, D.N.; Berry, M.S. (2006). Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *J. Insect. Physiol.* 52(3): 309-319.
- Prista, L.N.; Alves, A.C.; Morgado, R.M.R. (1981). Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 3.ed. Calouste Gulbenkian, Lisboa, 147p.

Quarles, W. (1992). Botanical pesticides from *Chenopodium*. *IPM Practitioner*. 14: 1-11.

Rali, T.; Wossa, S.W.; Leach, D.N.; Waterman, P.G. (2007). Volatile chemical constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C.DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. Chemistry Department, University of PNG, Papua New Guinea. *Molecules*. 12(3): 389-394.

Ribeiro, V.L.S.; Avancini, C.; Gonçalves, K.; Toigo, E.; von Poser, G. (2008a). Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 15: 351-354.

Ribeiro, V.L.S.; Rolim, V.; Bordignon, S.; Henriques, A.T.; Dorneles, G.G.; Limberger, R.P.; von Poser, G. (2008b). Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitol. Res.* 102(3): 531-535.

Riek, R.F. (1965). The cattle tick and fever. *Aust Vet J.* 41: 211-215.

Roberts, J.A. (1968) Resistance of cattle to the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini,1987).1. Development of ticks on *Bos Taurus*. *J. Parasitol.* 54: 663-666.

Saint-Hilaire, M.A. (1824). *Histoire des plantes les plus remarquables du Brésil et du Paraguay; comprenant leur description, et des dissertations sur leurs rapports, leurs usages, etc.* in-4°, T. 1, Paris: Tome Premier, 340p.

Saito, M.L.; Luchini, F. (1998). Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. *Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, documentos* 12. 46p.

Santos, P.R.D.; Moreira, D.L.; Guimarães, E.F.; Kaplan, M.A.C. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*. 58: 547-551.

Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 2168-2174.

Shaw, R.D. (1966). Culture of an organophosphorus strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bull Ent Res.* 56: 389-405.

Silva, G.; Lagunes, A.; Rodrigues, J.C.; Rodrigues, D. (2001). Insecticidas vegetales; una vieja nueva opción en el manejo de insectos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología.* 66: 4-12.

Silva, M.C.L.; Sobrinho, R.N.; Linhares, G.F.C. (2000). Avaliação in vitro da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus*, colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia-Goiás. *Cienc. Anim. Bras.* 1(2): 143-148.

- Silva, W.C. (2005) Atividade inseticida de *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae) e *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre cigarrinha (*Aetalion* sp.), praga de importância econômica no Amazonas. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil.
- Silva, W.C.; Ribeiro, J.D.; Souza, H.E.M.; Corrêa, R.S. (2007). Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera:Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta Amaz.* 37(2): 297-302.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (1999). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 1 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC. 821p.
- Simões, C.M.O.; Spitzer, V. (2003). Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O. Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC. pp. 467-495.
- Smith, T.; Kilbourne, F.L. (1893). Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. *Bur Anim. Ind. Bull.* 1: 151-152.
- Sonenshine, D.E. (1993). *Biologia of ticks*. Vol. 2. New York: Oxford University Press. 465p.
- Souza, A.P.; Veiga, L.P.H.N.; Bellato, V.; Sartor, A.A.; Nunes, A.P.O.; Cardoso, H.M.; Ramos, C.I. (2006a). Susceptibilidade do *Boophilus microplus* a cipermetrina e amitraz no Planalto Catarinense. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. II Simpósio LatinoAmericano de Rickettsioses. *Anais.* pp. 232-232. Ribeirão Preto, 2006.
- Souza, A.P.; Veiga, L.P.H.N.; Sartor, A.A.; Bellato, V.; Nunes, A.P.O.; Cardoso, H.M. (2006b). Teste carrapaticida por imersão de larvas de *Boophilus microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. II Simpósio LatinoAmericano de Rickettsioses. *Anais.* pp. 232-232. Ribeirão Preto, 2006.
- Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytech. J.* 232: 461-465.
- Srivastava, R.; Ghosh, S.; Mandal, D.B.; Azhahianambi, P.; Singhal, P.S.; Pandey, N.N.; Swarup, D. (2008). Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitol. Res.* Accepted: 18 august 2008.
- Stendel, W. (1980). The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *J. South African Vet. Assoc.* 51(3): 147-152.
- Sutherst, R.W.; Jones, R.J.; Schnitzerling, H.J. (1982). Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature.* 295: 320-321.

- Theiler, A. (1912). Gallsickness of imported cattle and protection against the disease. *Agric. J. Union South Africa*, 3(1): 7-46.
- Tokarnia, C.H.; Dobereiner, J.E; Silva, M.F. (1979). *Plantas tóxicas da Amazônia*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA. 95p.
- Torres-Santos, E.C.; Moreira, D.L.; Kaplan, M.A.; Meirelles, M.N.; Rossi-Bergmann, B. (1999). Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chem.* 43(5): 1234-1241.
- Ugaz, O.L. (1994). *Investigacion Fitoquimica: métodos el estudio de productos naturales*. 2.ed. Peru: Pontificia Universidade Católica Del Peru; Fondo Editorial. pp. 250-299.
- Vargas, M.S.; Céspedes, N.S.; Sánchez, H.F.; Martins, J.R.; Céspedes, C.O.C. (2003). Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. *Cienc. Rural. Santa Maria*. 33(4): 737-742.
- Verdeal, K.; Brown, R.R.; Richardson, T.; Ryan, D.S. (1980). Affinity of phytoestrogen for estradiol-binding protein and effect of coumestrol on growth of 7,12-dimethyl benz(a)anthracene induced rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 64: 285-290.
- Viegas Júnior, C. (2003). Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova*. 26: 390-400.
- Vila, R.; Tomi, F.; Mundina, M.; Santana, A.I.; Solis, P.N.; Arce, J.B.L.; Iclina, J.L.B.; Iglesias, J.; Gupta, M.P.; Casanova, J.; Canigual, S. (2005). Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*. *Unitat de Farmacologia i Farmacognosia, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. Flav. Frag. J.* 20(1): 67-69.
- Wagland, B.M. (1978). Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. *Aust J Agri Res.* 29: 401-409.
- Wagner, H.; Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography Atlas*. 2nd. Ed. Springer, 384p.
- Wharton, R.H. (1976). Enfermedades del ganado transmitidas por las garrapatas y sus vectores. Resistência a los acaricidas. *Rev. mund. Zootec.* 20(5): 783-793.
- Willadsen, P.; Jongejan, F. (1999). Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Dis. *Parasitol Tod.* 15(7): 258-62.
- Williams, L.A.D. (1993). Adverse effects of extracts of *Artocarpus altilis* Park. And *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus microplus*(Canest.). *Invert. Reprod. Develop.* 23(2-3): 159-164.
- World Health Organization (WHO). (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO. 115p.

Yuncker, T.G. (1975). The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*. 2: 99-102.

Zoghbi, M.G.B.; Marques, M.F.S.; Cabral, J.A.S.; Braz Filho, R. (1988). Isolamento de cumestrol de uma espécie do gênero *Derris*. *Acta Amaz.* 18: 57-60.