

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PRINCÍPIOS  
FITOTERÁPICOS E HOMEOPÁTICOS NO CONTROLE  
DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E  
COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ESTIMATIVA  
DE ECLOSÃO DE LARVAS *in vitro***

**Amanda Figueiredo  
Médica Veterinária**

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PRINCÍPIOS  
FITOTERÁPICOS E HOMEOPÁTICOS NO CONTROLE  
DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E  
COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ESTIMATIVA  
DE ECLOSÃO DE LARVAS *in vitro***

**Amanda Figueiredo**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área de Medicina Veterinária Preventiva).

**2017**

## EPÍGRAFE

*Criador inefável,  
Tu que és a fonte verdadeira da luz e da ciência,  
Derrama sobre as trevas da minha inteligência  
Um raio da tua claridade.  
Dá-me inteligência para compreender,  
Memória para reter, facilidade para aprender,  
Sutileza para interpretar, e graça abundante para falar.*

*Meu Deus,  
Semeia em mim a semente da tua bondade.  
Faz-me pobre sem ser miserável, humilde sem fingimento,  
Alegre sem superficialidade, sincero sem hipocrisia;  
Que faça o bem sem presunção,  
Que corrija o próximo sem arrogância,  
Que admita a sua correção sem soberba,  
Que a minha palavra e a minha vida sejam coerentes.*

*Concede-me, Verdade das verdades,  
Inteligência para conhecer-te,  
Diligência para te procurar,  
Sabedoria para te encontrar,  
Uma boa conduta para te agradar,  
Confiança para esperar em ti,  
Constância para fazer a tua vontade.*

*Orienta, meu Deus, a minha vida,  
Concede-me saber o que tu me pedes e ajuda-me a realizá-lo  
Para o meu próprio bem e o de todos os meus irmãos. Amém.*

Santo Tomás de Aquino

## DEDICATÓRIAS

Ao Mestre dos mestres,  
Aos meus pais, irmãos e amigos,  
Que souberam compreender os motivos do  
Meu recolhimento para produzir esta dissertação,  
*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao Pai Celestial, *“Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna”* (Jo 3:16) e a Nossa Senhora das Graças, não menos importante na minha vida, por interceder por mim junto ao Pai. Por serem fontes de inspiração e proporcionarem graças necessárias para continuar buscando minha evolução espiritual e transformação como pessoa nesse mundo, além da graça de perseverar na busca pela Verdade.

Aos meus pais, Sidnei Figueiredo e Maria do Carmo Figueiredo, a quem irei honrar até o meu último dia de vida terrena. Por serem meu ponto de partida, meu suporte espiritual e terem ensinado os verdadeiros valores dessa vida, contribuindo com o meu crescimento em todos os sentidos e principalmente por terem me introduzido ao cristianismo (sem dúvidas a maneira mais linda de se viver) e sobretudo por terem ensinado como seguir Cristo com exemplos de Fé, Esperança e Caridade, as três maiores virtudes fortalecidas pela Encarnação do Verbo.

Aos meus queridos irmãos Lucas Figueiredo e Francisco Figueiredo Netto, que desde sempre estiveram ao meu lado, muito antes dessa caminhada. Às minhas cunhadas, Gisele Durigon Figueiredo e Evelin Paiva, por todo carinho que sempre dedicaram a mim e aos meus pais. E ao meu sobrinho, Vicente Durigon Figueiredo, que veio ao mundo na metade deste estudo para alegrar ainda mais nossas vidas! Gratidão a todos os meus familiares (em especial à tia Belinha dos Santos que sempre muito me ajudou e a quem muito devo gratidão), por constantemente me apoiarem com palavras de incentivo, orações e pela compreensão da minha distância.

A todos os meus amigos, em especial Ana Cristina Santos Lopes e Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto, pela presença, conselhos e direções, e à minha querida Olga Watanabe, a quem sou eternamente grata. Ao Fausto de Almeida Marinho Neto, assim como Tiago Maretti Gonçalves, amigos que se tornaram verdadeiros companheiros nesse tempo de estudo, assim como à Angelica Laís Sarmiento, Teresa Moretti, Paloma do Espírito Santo Silva, Gilberto Matado, Franco César de Godoi Simoni e Caroline Lima (pessoas que Deus colocou no meu

caminho para me ensinar e ajudar), sou infinitamente grata pelas orações, demonstrações de carinho e por não cessarem de torcer por mim em nenhum instante.

Aos companheiros de laboratório: Luciana Ferreira Domingues, Isabela Cabeça, Rafaela Regina Fantatto, Amanda Izeli Portilho, Louyse Gabrielli Lopes e Giovanna Cruvinel, Gilberto César Agostinho, bem como aos funcionários da Embrapa – CPPSE, Leni, Cosme, Jurandir, Cidinho e Paulinho, que colaboraram na parte a campo do projeto com homeopatia. Assim como à Teresa Cristina Alves (gestora do Sistema de Produção de Leite), Waldomiro Barioni Júnior (responsável pela Estatística), Márcio Dias Rabelo e Cíntia Hiromi Okino (Analistas Laboratório Sanidade Animal) e principalmente ao Rodrigo Giglioti, assim como aos colaboradores externos do CPPSE: Mário Ramos de Paula e Silva (Médico Veterinário da Prefeitura Municipal de Bauru e consultor de homeopatia), Profa. Dra. Maria Izabel C. Mathias e Dra. Patrícia Rosa de Oliveira (responsáveis pelos estudos histo-morfológicos em fotomicroscópio – Unesp – Rio Claro), Leonor Monteiro Nascimento e Leandro Rocha (responsáveis pela extração e elucidação do óleo essencial utilizado), por colocarem-se a disposição e terem colaborado com esse estudo.

À Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, responsável pelo meu crescimento pessoal e científico, pela orientação, amizade e confiança. E ao seu esposo Luiz Gonzaga N. Chagas, por juntos terem me dado apoio e incentivo para continuar na cidade de São Carlos.

Aos membros da banca, que contribuíram muito com esta dissertação: Dr. Gilson Pereira de Oliveira e Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira, à Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Jaboticabal e todos os seus servidores, em especial ao Diego Henrique Mafra e Branca Rochidali, pela atenção e colaboração na realização de diversas etapas desse Mestrado, à Embrapa Pecuária Sudeste, por ter disponibilizado toda a infraestrutura (instalações, equipamentos necessários e animais) para a execução destes experimentos e ao Conselho de Desenvolvimento Nacional Científico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
Certificado do Comitê de Ética.....	iii
RESUMO.....	iv
Palavras-chave.....	v
ABSTRACT.....	vi
Keywords.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	3
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	3
Princípios fitoterápicos no controle do carrapato bovino.....	7
Princípios homeopáticos no controle do carrapato bovino.....	9
Técnicas <i>in vitro</i> para detecção de substâncias eficazes sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino .....	11
Referências.....	13
CAPÍTULO 2 – EFEITO ACARICIDA E REPELENTE <i>in vitro</i> DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea elegans</i> (CANELA-SASSAFRÁS) SOBRE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	19
Resumo.....	19
Palavras-chave.....	20
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	22
Resultados.....	25
Discussão.....	29
Conclusões.....	32
Agradecimentos.....	32
Referências.....	33

	Página
CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA HOMEOPATIA NO CONTROLE DE INFESTAÇÕES NATURAIS POR <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> EM BOVINOS DE LEITE.....	38
Resumo.....	38
Palavras-chave.....	39
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	41
Resultados.....	45
Discussão.....	50
Conclusões.....	56
Agradecimentos.....	57
Referências.....	58
CAPÍTULO 4 – ALTERNATIVE METHODS FOR EGG HATCH EVALUATION OF <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	63
Abstract.....	63
Keywords.....	64
Introduction.....	64
Material and Methods.....	65
Results and Discussion.....	68
Conclusions.....	71
Acknowledgments.....	71
References.....	72





**Pecuária Sudeste**

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado: "**Avaliação de tecnologias para a melhoria da saúde animal e redução do uso de drogas veterinárias na produção de bovinos de leite - VERDEVET**", utilizando 170 animais da espécie bovina (*Bos taurus*), sob responsabilidade da pesquisadora científica Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição.

(We hereby declare that the research: "**Evaluation of technologies for improving animal health and reduction of the use of veterinary drugs in the production of dairy cattle**", utilizing 170 animals of the bovine (*Bos taurus*) species, under the responsibility of the scientific researcher Dr. Ana Carolina de Souza Chagas, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Livestock and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 03 de Outubro de 2014.

**Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira**  
*Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais*  
*Embrapa Pecuária Sudeste*

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*  
*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*  
*Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP*  
*Telefone (16) 3411-56100 - Fax (16) 3361-5754*

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PRINCÍPIOS FITOTERÁPICOS E  
HOMEOPÁTICOS NO CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ESTIMATIVA DE ECLOSÃO DE  
LARVAS *in vitro***

**RESUMO** – O parasitismo por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ocasiona grandes perdas econômicas nos rebanhos bovinos, e seu controle por meio de carrapaticidas sintéticos enfrenta problemas de resistência, além do risco de resíduos nos alimentos e ambiente. Com o objetivo de contribuir com informações relevantes para o controle desse parasita, o presente estudo teve três objetivos: 1) avaliar *in vitro* o efeito do óleo essencial de *Ocotea elegans* “canela-sassafrás” sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*; 2) avaliar medicamento homeopático no controle de infestações naturais; 3) comparar as técnicas de estimativa visual e de quantificação por amostragem de larvas eclodidas no teste de imersão de fêmeas adultas, visto a importância dessas no levantamento de substâncias com ação carrapaticida. No primeiro experimento “Efeito acaricida e repelente *in vitro* do óleo essencial de *Ocotea elegans* (canela-sassafrás) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”, foram adotados os testes: contato de larvas em papel impregnado (LPI), teste de repelência larvar (TR) e imersão de fêmeas adultas (AIT). A fim de verificar a eficácia, *O. elegans* foi avaliada nas concentrações de 0,78 mg/mL a 100 mg/mL. No AIT, a partir da concentração de 25 mg/mL, a eficácia foi superior a 90%. Os LPI (48h) a 100 mg/mL resultaram em taxas de mortalidade acima de 70%. Já o TR obteve repelência superior a 80% a partir da menor concentração avaliada. Em relação às concentrações letais (CL), a menor CL<sub>50</sub> obtida no LPI foi de 25,59 mg/mL 48h pós tratamento. As CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> no AIT foram de 4,96 e 17,37 mg/mL e no TR de 0,04 e 1,24 mg/mL, respectivamente. Foi possível concluir que *O. elegans* demonstrou efeito significativo sobre fêmeas ingurgitadas e de repelência das larvas, e possivelmente pode ser um adjuvante no controle do carrapato bovino, devendo-se priorizar testes *in vivo*. No segundo experimento, “Estudo da homeopatia no controle de infestações naturais por *R. (B.) microplus* em bovinos de leite”, 24 fêmeas da raça Holandesa e Jersey x Holandesa foram divididas nos grupos controle (placebo) (n=12) e tratado (bioterápico 30 CH + Sulphur 30 CH) (n=12), administrado no concentrado (2kg/animal/dia) por 12 meses. De cada grupo coletou-se fêmeas ingurgitadas, a fim de comparar os parâmetros reprodutivos, e semi-ingurgitadas para avaliações morfo-histológicas dos ovários. Mensurou-se o peso vivo (PV), volume globular (VG) e realizou-se contagens de fêmeas ingurgitadas no corpo dos animais. Os resultados médios de PV, VG e nº de carrapatos não foram diferentes estatisticamente para os grupos controle e homeopatia: 616,5 kg e 618,6 kg, 27,9% e 27,3%, 12,19 e 13,58 carrapatos, respectivamente. Nas análises *in vitro*, as médias do peso das fêmeas (0,18 e 0,17 g), peso dos ovos (0,07 e 0,06 g), % de eclosão de larvas (70,1 e 76,6%) e índice de eficiência reprodutiva (54,3 e 60,6%), para os grupos controle e homeopatia, respectivamente, também não tiveram diferença estatística. Além disso, nenhuma alteração nos ovários foi observada nos estudos em foto-microscopia. Portanto, o medicamento homeopático avaliado não foi eficaz no controle de *R. (B.) microplus* e não interferiu nos parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas. Finalmente, no estudo “Alternative methods for egg hatch evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*” em que comparou-se duas técnicas de estimativa de eclosão de ovos,

fêmeas ingurgitadas coletadas de bovinos foram submetidas ao AIT com extratos vegetais e mantidas em incubadora para realizar a oviposição. Os ovos foram transferidos para seringas e incubados por 15 dias. A eclosão dos ovos foi avaliada em 210 seringas por estimativa visual (%) e também contadas até 100, em três repetições. Foram encontradas diferenças significativas entre os dois testes. Na estimativa visual (56,8%) a porcentagem de eclosão média foi maior do que na quantificação por amostragem (48,0%). Na quantificação por amostragem, não foram observadas diferenças estatísticas nas contagens das três amostras (48,1, 47,8 e 48,1%) e a correlação entre as repetições foi de 0,96, sugerindo que a contagem de uma amostra é suficiente e o resultado independente do avaliador. O presente estudo contribuiu com informações inéditas sobre o potencial acaricida e repelente de *O. elegans*. Discutiu-se que apesar do medicamento homeopático não ter tido efeito, tal conclusão não pode ser estendida a outras formulações homeopáticas, vias de aplicação e condições de manejo adversas às do presente estudo. Por fim, os resultados do estudo comparativo contribuem para o aperfeiçoamento do AIT e podem estimular os pesquisadores a optar por técnicas mais confiáveis na avaliação da eclosão de ovos.

**Palavras-chave:** carrapato, fitoterapia, homeopatia, resíduos, resistência, contagem de larvas.

## EVALUATION OF THE EFFECTS of PHYTOTHERAPY AND HOMEOPATHIC PRINCIPLES IN THE CONTROL OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* AND COMPARISON OF TECHNIQUES TO ESTIMATE LARVAE HATCHING *in vitro*

**ABSTRACT** – The parasitism by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causes large economic loss in cattle herds and its control through chemical acaricides faces problems of resistance and residues in food and in the environment. Aiming to contribute with relevant information for the control of this parasite, the present study had three objectives: 1) evaluate the effect *in vitro* of *Ocotea elegans* essential oil on larvae and engorged females of *R. (B.) microplus*, 2) evaluate homeopathic medicine to control *R. (B.) microplus* natural infestations, and 3) compare visual estimation and quantification by sampling techniques of larvae hatching in the engorged females immersion test, due to the importance of this technique in the screening of substances with antiparasitic action. In the first experiment, "*In vitro* acaricidal and repellent effect of *Ocotea elegans* essential oil on *R. (B.) microplus*", were adopted the tests: larval packet test (LPT), the larval repellency test (RT) and the adult immersion test (AIT). In order to verify efficacy, *O. elegans* was evaluated at concentrations of 0.78 mg/mL to 100 mg/mL. In the AIT, from the concentration of 25 mg/ml, the efficacies were higher than 90%. LPT (48h) at 100 mg/mL resulted in mortality rates higher than 70%. The RT obtained repellency higher than 80% since the lowest concentration evaluated. In relation to the lethal concentrations, the lowest LC<sub>50</sub> obtained in the LPT was 25.59 mg/mL, 48 hours post treatment. The LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> in the AIT were 4.96 and 17.37 mg/mL and in TR were 0.04 and 1.24 mg/mL, respectively. It was possible to conclude that *O. elegans* had significant effect in engorged females and larvae repellency and may be in the future an adjuvant for tick control, prioritizing *in vivo* tests. In the second experiment, "Study of homeopathy in the control of natural infestation of *R. (B.) microplus* in dairy cattle", 24 females of the Dutch and Jersey x Dutch breed were divided in the control group (placebo) and treated (biotherapeutic 30 CH + *Sulphur* 30 CH) (n=12), administered in the concentrate at 2 kg/animal/day for 12 months. It was collected in each group engorged females to compare the reproductive parameters, and semi-engorged females for the ovaries histologic evaluation. The live weight (LW), packed cell volume (PCV) and counts of engorged females in the animals' body were held. The average results of LW, PCV and ticks were not statistically different in the control and homeopathic groups: 616.5 kg and 618.6 kg, 27.9% and 27.3%, 12.19 and 13.58 ticks, respectively. In the *in vitro* analyzes, the average weight of females (0.18 and 0.17 g), egg weight (0.07 and 0.06 g), larvae hatching % (70.1 and 76.6%) and reproductive efficiency index (54.3 and 60.6%), to control and homeopathic groups, respectively, had no statistical difference as well. In addition, no changes in the ovaries were observed in microscopy. Therefore, the homeopathic medicine assessed didn't present efficacy in the *R. (B.) microplus* control, and didn't interfere in the reproductive parameters of engorged females. Finally, in the study "Alternative methods for egg hatch evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*" in which two techniques of egg hatching estimation were compared, engorged females collected from cattle were subject to the AIT with plant extracts and kept in an incubator to perform oviposition. Eggs were transferred to syringes and incubated for 15 days. Egg hatching was evaluated in 210 syringes by visual estimation (%) and also counted until 100 in three repetitions.

Significant differences were found between the two tests. In the visual estimation (56.8%) the hatching percentage average was higher than in the quantification by sampling (48.0%). In quantification by sampling, no statistical differences were observed in the pairwise counts between the three samples (48.1, 47.8 and 48.1%) and, the correlation of repetitions was 0.96, suggesting that the count of one sample is sufficient and the result should not differ much, regardless of the evaluator. The present study contributed with unreleased information about the acaricide and repellent effect of *O. elegans*. It was discussed that despite the homeopathic medicine had not effect, such conclusion cannot be extended to other homeopathic formulations, process of application and management conditions adverse to the present study. Finally, the results of the comparative study contribute for the improvement of the AIT and may encourage researchers to choose more reliable techniques in the assessment of the egg hatching.

**Keywords:** tick, herbal medicine, homeopathy, residues, resistance, counting of larvae.

## Lista de Tabelas

	Página
CAPÍTULO 1	
<b>Tabela 1.</b> Principais classes de carrapaticidas sintéticos atualmente utilizados e modo de ação correspondente.....	5
CAPÍTULO 2	
<b>Tabela 1.</b> Dados de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -RMN da substância sesquirosefurano, em ppm. Análise realizada por meio de PRESAT, COSY, APT, HSQC e HMBC.....	26
<b>Tabela 2.</b> Médias dos pesos das fêmeas (PF), pesos das massas de ovos (PO), % de eclosão das larvas (ECLO), índice de eficiência reprodutiva (REI) e eficácia do óleo essencial (EO) de <i>Ocotea elegans</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> , testadas pelo teste de imersão de adultos (AIT).....	27
<b>Tabela 3.</b> Médias de eficácia do óleo essencial de <i>O. elegans</i> em relação à mortalidade, verificada pelos testes de contato de larvas em papel impregnado (LPI) de 24h e 48h, e em relação à repelência obtida no teste de repelência (TR).....	28
<b>Tabela 4.</b> Concentrações letais (CL, mg/mL) $\pm$ 95% de limites de confiança do óleo essencial de <i>O. elegans</i> avaliado sobre <i>R. (B.) microplus</i> pelo teste de imersão de teleóginas (AIT), teste de contato de larvas em papel impregnado (LPI) e teste de repelência (TR).....	29
CAPÍTULO 3	
<b>Tabela 1.</b> Médias do peso vivo (PV), volume globular (VG) e número de carrapatos das vacas leiteiras dos grupos controle e homeopatia (bioterápico de <i>R. (B.) microplus</i> 30 CH + <i>Sulphur</i> 30 CH) durante 12 meses na Embrapa Pecuária Sudeste.....	45
<b>Tabela 2.</b> Médias dos pesos das fêmeas (PF), pesos dos ovos (PO), % de eclosão das larvas (ECLO) e índice de eficiência reprodutiva (REI), obtidas nas fêmeas ingurgitadas dos grupos controle e homeopatia durante as quatro estações do período experimental.....	48

## CAPÍTULO 4

<b>Table 1.</b> Estimated egg hatching percentage (average of triplicate) of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> engorged females submitted to essential oils of 11 plant species at five concentrations (mg/mL) and controls (C1= distilled water, C2= distilled water with 2% Tween 80), by means of adult immersion test (AIT).....	66
<b>Table 2.</b> Averages of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> egg hatching evaluated by visual estimation (56.8%) and quantification by sampling (48.0%), organized by categories.....	71

## Lista de Figuras

	Página
CAPÍTULO 2	
<b>Figura 1.</b> Estrutura química do sesquirosefurano, substância majoritária do óleo essencial de <i>O. elegans</i> .....	26
<b>Figura 2.</b> Espectro de RMN do óleo essencial das folhas de <i>O. elegans</i> e seus respectivos deslocamentos químicos de carbono <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	26
CAPÍTULO 3	
<b>Figura 1.</b> Médias do peso vivo (kg) dos animais, obtidas a partir da mensuração mensal, durante o período experimental de 12 meses.....	46
<b>Figura 2.</b> Médias do volume globular (%), obtidas a partir dos hemogramas dos animais, durante o período experimental de 12 meses.....	46
<b>Figura 3.</b> Número médio de carrapatos, obtidos a partir das contagens no corpo dos animais, durante o período experimental de 12 meses.....	46
<b>Figura 4.</b> Médias de temperatura, umidade e pluviosidade total, obtidas a partir do monitoramento meteorológico, durante o período experimental de 12 meses.....	47
<b>Figura 5.</b> Médias da velocidade do vento e intensidade de radiação solar, obtidas a partir do monitoramento meteorológico, durante o período experimental de 12 meses.....	47
<b>Figura 6.</b> Médias gerais de: A) peso das fêmeas ingurgitadas (PF); B) peso da ovipostura (PO); C) porcentagem de eclosão das larvas (% Eclo); D) índice de eficiência reprodutiva (REI) das fêmeas ingurgitadas, durante o período experimental de 12 meses.....	49
<b>Figura 7.</b> Secções histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas do carrapato <i>R. (B.) microplus</i> tratadas com medicamento homeopático (bioterápico 30 CH e <i>Sulphur</i> 30 CH), demonstrando que não houve alteração nos ovócitos (estágios de I a V) corados com hematoxilina-eosina (A-E). nu: nucléolo; vg: vesícula germinal; v: vacúolo; gv: grânulos de vitelo.....	50



## CAPÍTULO 4

**Figure 1.** The content of a syringe was homogenized and distributed in 3 areas of a disposable Petri dish (90 x 15 cm) to count larvae and infertile eggs under a stereoscope (Coleman-1.25 magnification). Black arrow: eggs, black arrowheads: larvae..... 67

**Figure 2.** Scattergram showing the correlation (Pearson r) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* egg hatching between visual estimation and quantification by sampling, in each category (A: 1=0–25%, B: 2=26–50%, C: 3=51–75%, D: 4=76–100%) and in general (E: the standard deviation bars (grey bars) are related to the three counts in the quantification by sampling)..... 69

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

Nas próximas quatro décadas, a população mundial terá um aumento de dois bilhões de pessoas (FAO, 2013). A produção agrícola global terá de aumentar em 60% em relação aos níveis produzidos entre os anos de 2005 a 2007 para atender a demanda por alimento. Por representar 23% do PIB (Produto Interno Bruto), o agronegócio é considerado um setor importante para a economia brasileira. Apesar das quedas observadas no ramo da pecuária, observou-se alta de 9,5% no preço do leite cru motivado pela baixa oferta do produto no mercado, com impacto direto sobre a indústria de laticínios (CEPEA, 2016).

A produção de leite no Brasil é laboriosa em função da rotina de manejo. Condições tropicais propiciam maior desenvolvimento de bactérias e parasitas, e por esse motivo sistemas de produção leiteira enfrentam problemas sanitários, principal barreira frente a ascensão do desenvolvimento desse setor. A pecuária em larga escala esbarra, principalmente, nos elevados custos com insumos para a prevenção e controle de doenças causadas por parasitas e patógenos. Outra dificuldade está pautada nos medicamentos utilizados na pecuária que, em sua maioria, vêm perdendo sua eficácia devido à resistência dos parasitas e patógenos frente aos antibióticos, anti-helmínticos e carrapaticidas (TAYLOR; HUNT; GOODYEAR, 2002; GIBBONS, 2004; BISSINGER; ROE, 2010).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado um dos principais entraves da pecuária por conta dos prejuízos econômicos que acarreta como queda da produtividade, transmissão de doenças e consequente perda de animais. Elevados são os custos relacionados à compra de carrapaticidas sintéticos e mão de obra para sua aplicação (GRISI et al., 2014) e a utilização intensa e indiscriminada desses pode resultar na presença de resíduos na carne, leite e ambiente. O maior problema, porém, está relacionado à multirresistência que o carrapato vem adquirindo frente aos carrapaticidas disponíveis no mercado, pois a produção de novas moléculas é lenta em relação ao surgimento da resistência (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2007; HIGA et al., 2016).

Diante dessa situação, fitoterapia e homeopatia podem ser ferramentas no controle das infestações pelo carrapato, atuando na melhoria da saúde animal e na redução do uso de drogas veterinárias, uma vez que podem ser associadas aos carrapaticidas e possivelmente agir por meio de diferentes modos de ação sobre os parasitas, possibilitando prolongar a vida útil dos produtos comerciais disponíveis. Atualmente, estudos fitoquímicos de extratos vegetais fornecem informações quanto à natureza dos bioativos, o que permite o monitoramento da qualidade e embasamento para elaboração de formulações antiparasitárias (CHAGAS, 2015). A avaliação de produtos homeopáticos atualmente utilizados em fazendas orgânicas certificadas é de grande interesse para o esclarecimento de sua efetividade, possível validação e transferência. Dessa forma, os estudos aqui realizados objetivaram trazer esclarecimentos acerca de ferramentas que pudessem contribuir com o desenvolvimento de uma pecuária mais sustentável.

Assim, avaliaram-se os efeitos do óleo essencial de *Ocotea elegans* “canela-sassafrás” sobre larvas e fêmeas adultas de *R. (B.) microplus* por meio do teste de contato de larvas com papel impregnado (LPI), teste de repelência larvar (TR) e o teste de imersão de teleóginas (AIT), bem como a eficácia de um medicamento homeopático no controle de infestações naturais. Além disso, levando-se em consideração que parâmetros reprodutivos de *R. (B.) microplus* são frequentemente analisados em laboratório por meio do AIT (por serem bons indicadores tanto da resistência dos carrapatos quanto da eficácia de extratos de plantas), técnicas para o cálculo da taxa de eclosão de ovos, empregadas no referido teste, foram comparadas.

O presente estudo pertence ao projeto aprovado na chamada n°. 01/2013 da Embrapa – Prioridades do Portfólio de Projetos em Sistemas de Produção de Base Ecológica, Linha Temática: Controle sanitário em sistemas produtivos de base ecológica, intitulado: “Avaliação de tecnologias para a melhoria da saúde animal e redução do uso de drogas veterinárias na produção de bovinos de leite – VERDEVET”.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*R. (B.) microplus* é um ectoparasita hematófago e monóxeno, cujos estádios se completam em apenas um único hospedeiro. O ciclo de vida é dividido em duas fases: parasitária e de vida livre. O período total de parasitismo varia de 17 a 52 dias e todo o ciclo biológico pode completar-se em dois meses, sendo que as condições climáticas podem influenciar sobre as variações entre os estádios. Na fase de vida livre, ao desprender-se do hospedeiro, a fêmea ingurgitada deposita cerca de três mil ovos no solo, em um período que pode variar de 4 a 44 dias. Desses ovos, entre 14 a 146 dias eclodem as larvas (com capacidade de sobreviver até 20 semanas sem alimento) que, ao se tornarem infectantes, ascendem a pastagem até fixarem-se no hospedeiro. Da fixação larvar até o ingurgitamento são necessários 21 dias. Posteriormente, ocorre a queda da fêmea adulta (HITCHCOCK, 1955; OLIVEIRA et al., 1974; BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

Popularmente conhecido como carrapato bovino ou carrapato-boi devido à sua especificidade por essa espécie animal, esse parasita pode ocasionalmente recorrer a hospedeiros alternativos como equinos, cães e até mesmo o homem, na ausência de bovinos (SOARES et al., 2007). Na pecuária, infestações por esse parasita afetam o bem-estar e provocam prejuízos diretos ao gado devido à espoliação sanguínea, resultando em anemia, lesões na pele que podem servir de porta de entrada para bactérias ou miíases, bem como efeitos negativos indiretos como a transmissão de hemoparasitas (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*) agentes da Tristeza Parasitária Bovina, doença que provoca alto índice de mortalidade nos rebanhos (GONZALES et al., 1973; RAYNAL et al., 2013; GUERRERO et al., 2014).

O carrapato bovino tem populações estabelecidas em todas as regiões intertropicais. Entre os países situados entre os paralelos 35° Norte e 35° Sul, essa espécie de carrapato é a que possui maior distribuição e importância econômica (DAVEY; OSBURN; MILLER, 1984). Sua distribuição geográfica, atualmente, abrange a região pantropical, África, América Latina e Austrália,

promovendo perdas econômicas significativas em vários países. Devido ao clima tropical e subtropical, o território brasileiro é potencialmente favorável à sua sobrevivência e propicia características necessárias ao seu desenvolvimento durante praticamente o ano inteiro (SOUZA et al., 1997; ESTRADA-PEÑA; VENZAL, 2006) e, por esse motivo, assim como por interferir de maneira negativa na lucratividade da pecuária, ao longo dos anos tornou-se um dos principais inimigos dos produtores (HIGA et al., 2016). Somente no Brasil, o parasitismo é responsável por perdas estimadas em 3,24 bilhões de dólares por ano na pecuária (GRISI et al 2014) e poucas são as regiões com baixa incidência, onde seu controle não é justificável (KUNZ; KEMP, 1994; BARROS; PELLEGRIN, 2002).

A principal e se não exclusiva forma de controle se faz por meio de carrapaticidas sintéticos. Estes geralmente estão disponíveis comercialmente sob forma de aspersão, pour on ou injetáveis (FURTADO et al., 2013). Como forma de controlar e diminuir os prejuízos causados pelo parasitismo nos rebanhos, sua aplicação tornou-se indispensável e constante. No entanto, o uso intenso e indiscriminado, bem como a falta de apoio técnico ao pecuarista, contribuíram para a resistência que *R. (B.) microplus* adquiriu frente aos acaricidas. Quando o problema de resistência se instala em uma propriedade, o produtor frequentemente aumenta a dose do produto e reduz o intervalo entre as aplicações, o que contribui para agravar ainda mais o quadro de resistência (KLAFKE et al., 2006; FURLONG; MARTINS; PRATA, 2007; HIGA et al., 2016).

A problemática que envolve resistência tem se intensificado e a preocupação é evidente, visto que nas últimas décadas houve aumento de relatos científicos acerca de *R. (B.) microplus* resistentes aos carrapaticidas sintéticos. Recentemente, foi documentado o primeiro caso de resistência ao Fluazuron, único princípio ativo até então sem relatos anteriores de resistência, além de identificada a primeira população de carrapatos resistentes a seis classes de acaricidas (RAYNAL et al., 2013; RECK et al., 2014; CRUZ et al., 2015; HIGA et al., 2016).

Em sua maioria, as classes de carrapaticidas sintéticos atuam no sistema nervoso central (SNC) dos ectoparasitas, com modos de ação variados (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Principais classes de carrapaticidas sintéticos atualmente utilizados e modo de ação correspondente.

CLASSE QUÍMICA	MODO DE AÇÃO
<b>Organofosforados</b>	Ligam-se irreversivelmente ao sítio esterásico da enzima colinesterase, que é responsável pela cisão da molécula de acetilcolina.
<b>Carbamatos</b>	São inibidores reversíveis da colinesterase.
<b>Piretróides</b> (cipermetrina e deltametrina)	Possuem propriedades lipofílicas que facilitam a sua penetração nos artrópodes, através de sua cutícula rica em lipídeos, em que, uma vez absorvidos, são levados pela hemolinfa para as células nervosas, interferindo no canal de sódio, aumentando a condutância desse íon.
<b>Formamidinas</b> (amitraz)	Ainda não foi totalmente esclarecido pela literatura, entretanto, observou-se que em larvas de carrapato, penetra rapidamente, podendo atuar na forma de amitraz ou de seu metabólito ativo, o M-2,4-dimetil-fenil-N'-metilformamidina, inibindo a monoaminoxidase (MAO). Esta enzima mitocondrial possui ação catalizadora no processo de desaminação de catecolaminas, resultando no aumento dos níveis de noradrenalina e serotonina no SNC. Nas teleóginas, as formamidinas inibem o processo de liberação de ovos, impedindo a contração da sua musculatura genital.
<b>Lactonas Macrocíclicas</b> (avermectinas)	Potencializam a ação inibidora neuronal mediada pelo GABA, promovendo hiperpolarização do neurônio e, portanto, inibindo a transmissão nervosa. Agem nos canais de cloro GABA independentes, onde há aumento na condutância da membrana do músculo, pelo bloqueio para a resposta do ácido ibotênico (ativador específico do portão-glutamato). Assim, há um aumento da permeabilidade da membrana celular. E essas moléculas provocam ataxia e paralisia nos insetos e nematódeos.
<b>Fenilpirazóis</b> (fipronil)	Inibe não competitivamente o GABA, fixando-se no receptor no interior do canal de cloro, inibindo o fluxo celular dos íons, anulando assim o efeito neuroregulador do GABA e causando a morte do parasito por hiperexcitação.

\*Fonte: Adaptado de SARTOR; SANTARÉM (2006).

Dessa forma, carrapaticidas a base de vegetais têm sido amplamente avaliados como método alternativo no controle de *R. (B.) microplus*. Isso devido a algumas das principais vantagens dos produtos derivados de plantas (PDP),

incluindo baixa toxicidade sobre os mamíferos, menor período de persistência no ambiente, além de químicos complexos. Como a busca por novos fármacos para controlar infestações pelo carrapato bovino tem ascendido constantemente, faz-se muito importante adotar estratégias eficientes para o desenvolvimento desses, buscando compreender a estrutura química e os mecanismos de ação do produto com o qual se deseja trabalhar (ROEL, 2001; MARSHAL, 2004; CHAGAS et al., 2012).

Alguns PDPs já possuem modos de ação relativamente bem estabelecidos sobre os parasitas como é o caso do *Pyrethrum* spp., que age sobre os canais de sódio, servindo como uma neurotoxina. A *Azadirachta indica*, conhecida como neem, que age no sistema colinérgico através da inibição da AChE, interferindo no equilíbrio hormonal e resultando em dissuasão alimentar, interrupção do crescimento, podendo, ainda, reduzir a aptidão e atuar sobre a oviposição e esterilidade. Estudos recentes relataram que óleos essenciais (com potencial parasiticida) e seus constituintes agem principalmente sobre GABA, receptores/sinapses de tiramina e octopamina, e sobre a inibição da acetilcolinestraxe (AChE). Além disso, independente do modo de ação específico, a lipofilicidade dos mesmos pode desempenhar um papel importante na eficácia, otimizando a penetração dos produtos no corpo dos artrópodes (GEORGE et al., 2014).

Apesar do grande número de pesquisas sobre o potencial de PDP no controle de parasitas, poucas estabeleceram os modos de ação, descrevendo apenas de maneira geral os efeitos registrados. Porém, estudos recentes sugerem que os óleos essenciais são capazes de atuar em diferentes sítios de ação dos parasitas. Além disso, por conta de suas propriedades químicas complexas, poderão, promissora, retardar o desenvolvimento da resistência sobre os PDP. Isso será possível apenas se houver controle de qualidade do material vegetal por meio de técnicas analíticas, as quais permitirão futura produção em escala industrial de fármacos à base de PDP com potencial ação antiparasitária (MIRESMALLI; BRADBURY; ISMAN, 2006; GEORGE et al., 2014; CHAGAS, 2015).

Outro agravante acerca do uso indiscriminado de carrapaticidas sintéticos é

o risco da presença de resíduos desses na carne, leite e meio ambiente, o que invariavelmente pode comprometer a saúde humana e prejudicar o equilíbrio ambiental (SCHWARZENBACH et al., 2010; FURTADO et al., 2013). Entre 2006 e 2007, a Anvisa examinou amostras de leite do comércio exposto ao consumo humano. Apesar de estarem abaixo do limite máximo de resíduos permitidos (LMR) 41,29% e 52,17% das amostras possuíam resíduos de ivermectina, 2,80% e 7,25% de abamectina e 3,89% e 21,74% de doramectina, no leite UHT e leite em pó respectivamente. Essa última em níveis acima do LMR em 0,22% das amostras de UHT e em 5,80% das amostras de leite em pó (5,80%) (PAMVET, 2009).

Ao mesmo tempo, a população também tem se tornado um pouco mais exigente no tocante aos cuidados com a alimentação e, por esse motivo, produtos orgânicos têm atraído novos consumidores. Houve aumento das vendas e das expectativas de prosperidade desse mercado (GOTTSCHALK; LEISTNER, 2013). Fazendas de produção de leite orgânico têm utilizado terapias não convencionais para controle de carrapatos, porém, isso ocorre muitas vezes sem respaldo científico. Dessa forma, é necessária a busca por alternativas mais eficientes no controle desses parasitas, considerando-se que produções agroecológicas e especialmente orgânicas não permitem a aplicação de pesticidas (OLIVO et al., 2009).

## **2.2. Princípios fitoterápicos no controle de *R. (B.) microplus***

Em todo o mundo, extratos de aproximadamente 55 espécies de plantas pertencentes a 26 famílias já foram avaliados sobre o carrapato bovino (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011). Há décadas tem se pesquisado novas moléculas a base de plantas para o controle parasitário, no entanto, a grande dificuldade está pautada nos testes a campo, já que resultados de boa atividade carrapaticida e/ou repelente *in vitro* muitas vezes não se repetem nos ensaios *in vivo* (HABEEB, 2010; CHAGAS, 2015; CHAGAS et al., 2016).

A diversidade química dos organismos vegetais é uma fonte inesgotável de busca por novas estruturas químicas para a produção de fármacos (GURIB-FAKIM, 2006). Assim, o “screening” dessas bibliotecas naturais, a realização de testes



biológicos e o desenvolvimento de relações de estrutura-atividade são fatores importantes para a execução de ações de pesquisa e desenvolvimento relacionadas ao controle de diversos tipos de doenças (BISSINGER; ROE, 2010). Busca-se nos estudos sobre as moléculas ativas oriundas de espécies vegetais por características que possam ser interessantes para o controle parasitário nos sistemas de produção animal: baixo impacto ambiental, redução do risco da presença de resíduos nos alimentos, lento desenvolvimento da resistência parasitária e baixo custo ao produtor (ROEL, 2001; MELLO-PEIXOTO et al., 2013).

Como exemplo podemos citar alguns estudos. O óleo de *Melaleuca alternifolia* em sua forma pura e nanoestruturada (nanopartículas) nas concentrações de 5% e 0,75%, respectivamente, foram testadas a campo. Verificaram que a forma pura apresentou efeito acaricida sobre *R. (B) microplus* no quarto dia de experimento, interferindo nas contagens de carrapatos. Obteve-se médias de 25, 12 e 7 teleóginas nas vacas do grupo controle, tratamento na forma nanoestruturada e tratamento com a forma pura, respectivamente. No teste *in vitro*, no qual incubaram-se fêmeas ingurgitadas de cada grupo para comparar o desempenho reprodutivo, o tratamento com *M. alternifolia* na forma nanoestruturada interferiu na reprodução das teleóginas, determinando menor taxa de oviposição e eclodibilidade, resultando em 34,5% de eficácia (BOITO et al., 2016).

A partir de estudo *in vitro* com o extrato etanólico de *Ageratum conyzoides* nas concentrações de 2 a 10%, obtiveram-se mortalidades de 76,7% a 90% sobre carrapatos resistentes a carrapaticidas sintéticos, bem como interferência na ovipostura das fêmeas ingurgitadas (com redução de 7,04% a 31,3% na oviposição) no AIT. As concentrações letais, ainda no AIT mas sobre carrapatos suscetíveis, foram de  $CL_{50} = 3,94\%$  e  $CL_{90} = 8,91\%$ , demonstrando 96,7% de mortalidade. No teste de imersão de larvas, a partir das sub frações bioativas do extrato, foram detectadas atividades larvicidas médias de 96,2% a 97,5% e de 77,1% a 94,9% contra larvas de cepas sensíveis e multirresistentes, respectivamente (KUMAR et al., 2016).

Apesar de elevado número de PDP terem sido testados contra *R. (B.) microplus in vitro*, apenas alguns desses foram avaliados em experimentos *in vivo*. Além disso, bons resultados *in vitro* com fitoterápicos podem não se repetir em

ensaios a campo, devido a alguns fatores limitantes, como variações químicas causadas por fatores bióticos e abióticos no pós e pré-colheita do material vegetal, podendo alterar a bioatividade do produto final. Por exemplo: diferentes variedades, partes da planta e locais geográficos distintos para uma única espécie vegetal, com ano de colheita e condições de armazenamento também distintos, podem influenciar na química do óleo essencial. Para isso, a identificação e uso das substâncias ativas, ao invés da mistura que substâncias que compõem os óleos (quimicamente menos estáveis) pode ser uma solução mais eficaz (GEORGE et al., 2014).

Dessa forma, faz-se de extrema importância estudar as espécies mais promissoras para determinar os seus principais compostos bioativos e validar a eficácia a campo sem efeitos tóxicos no hospedeiro (CHAGAS et al., 2012), pois a fitoterapia demonstra ter potencial para se tornar uma importante ferramenta na redução dos problemas de resistência e resíduos. Além disso, também existe a possibilidade da associação de bioativos vegetais com substâncias sintéticas, que permitiria prolongar a vida útil dos carrapaticidas sintéticos em uso (CHAGAS, 2008). Dessa forma, o conhecimento sobre as estruturas químicas dos ativos de plantas poderá contribuir com a síntese em larga escala.

### **2.3. Princípios homeopáticos no controle de *R. (B.) microplus***

A homeopatia foi criada no ano de 1796 e chegou ao Brasil em 1840. O preparo de seus medicamentos é respaldado pela Farmacopeia Homeopática Brasileira e atualmente essa prática está difundida em diversos países do mundo (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011) e tem como princípio a cura pelo semelhante: “Semelhante cura semelhante” (*Similia similibus curantur*), ou seja, se uma substância pode provocar sintomas específicos em um indivíduo sadio, essa mesma poderá proporcionar a cura de pacientes com sintomas similares, em sua forma homeopática (HAHNEMANN, 1995).

Os pilares da homeopatia ainda baseiam-se em: “Experimentação no homem são” (toda substância ou droga utilizada como remédio homeopático deve ter sido previamente experimentada no homem são); “Uso de doses mínimas ou infinitesimais” (substâncias utilizadas como tratamento devem ser administradas em

doses diminutas, diluídas e dinamizadas), e “Uso do medicamento único” (as drogas homeopáticas indicadas aos pacientes devem ser de remédio único, não de complexos, onde se perderia a referência de qual medicamento estaria fazendo o efeito desejado) (ANTONIASSI, 2010; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

Portanto, essa terapêutica valoriza não apenas a doença, mas principalmente o doente (com suas suscetibilidades, fragilidades, heranças genéticas e inconstâncias emocionais) (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011), pautando-se na administração de um medicamento único para cada organismo. Entretanto, o termo “homeopatia populacional”, utilizado pela primeira vez em 1987, tem sido empregado para o tratamento de populações animais acometidas por afecção comum à maioria dos indivíduos, baseando-se no conceito de observação de casos epidêmicos e repetição dos sintomas (REAL, 2008), e o que certamente é mais aplicável para sistemas de produção.

Entretanto, o uso da homeopatia em animais de produção tem sido alvo de questionamentos. Os resultados de pesquisa são controversos por serem publicados em revistas de baixa exigência técnico-científica, em alguns casos, além de não ser raro o uso de número pequeno de animais, períodos curtos de avaliação e metodologias inadequadas em parasitologia veterinária. Dos 115 artigos que envolviam avaliação de produtos homeopáticos em medicina veterinária, somente 38 possuíam critérios científicos satisfatórios (MATHIE; HACKE; CLAUSEN, 2012). Isso só comprova a necessidade de investigações elucidativas e confiáveis para efetiva transferência dessa tecnologia.

O sistema de produção de base ecológica e mesmo orgânica é carente de produtos e tecnologias que possibilitem sua sustentabilidade e expansão no Brasil. Já no Reino Unido, por exemplo, a homeopatia é uma das principais formas de tratamento da mastite em propriedades de leite orgânico. Em estudo verificou-se que o tratamento alopático era utilizado em 100% das fazendas tradicionais, enquanto nas propriedades reconhecidas como orgânicas, a porcentagem era de 40,7%. Este fato conduziu a uma economia relacionada principalmente com a redução do descarte do leite dos animais tratados (HOVI; RODERICK, 1998).

Em levantamento bibliográfico verificou-se que a preparação homeopática

Fator C&MC<sup>®</sup> 0,01g/dia misturado na ração foi avaliada em bovinos leiteiros confinados e infestados artificialmente com *R. (B.) microplus* por 5 meses. Observou-se eficácia de 26%, contra 64% do tratamento baseado no extrato Enxofre-*Allium sativum*<sup>®</sup> a 20 g/dia (COSTA-JÚNIOR; FURLONG, 2011). Em estudo com bezerros mestiços Gir x Holandês a pasto, a administração dos medicamentos homeopáticos Fator Pró<sup>®</sup> e C&MC<sup>®</sup> a 5 g/animal/dia junto ao sal proteinado, por oito meses consecutivos, não afetou o desenvolvimento corporal e a infestação por carrapato (SIGNORETTI et al., 2008).

Por outro lado, uma série de estudos com o produto Fator C&MC<sup>®</sup> adicionado ao sal mineral tem demonstrado eficácia no controle do carrapato bovino. Isso foi observado em propriedades leiteiras em relação a outras que utilizavam produtos sintéticos convencionais (MAGALHÃES-NETO, BENEDETTI; CABRAL, 2005). Novilhas Purunã também apresentaram 50,5% menos fêmeas ingurgitadas ao receberem o Fator C&MC<sup>®</sup> a 1,6 g/animal/dia por 12 meses, não havendo diferença significativa em relação ao grupo tratado com amitraz (SILVA et al., 2007). Em outro estudo, não houve necessidade de tratamento alopático para o controle de parasitas e mastite em oito vacas (20% do rebanho) Gir x Holandês que receberam no concentrado os medicamentos homeopáticos: Fator Pró<sup>®</sup>, Estresse<sup>®</sup>, M&P<sup>®</sup> e C&MC<sup>®</sup> (5 g/animal/dia) por nove meses (SIGNORETTI et al., 2010).

Dessa forma, questionamentos em relação à real aplicabilidade de tecnologias alternativas devem ser pesquisados e respondidos. O princípio do tratamento homeopático individualizado é responsabilizado por ser o principal obstáculo da sua avaliação clássica em ensaios clínicos, já que é muito complexo implementá-lo sob as condições de manejo das fazendas. Desta forma, espera-se verificar se o tratamento populacional se mostra eficaz.

#### **2.4. Técnicas *in vitro* para detecção de substâncias ativas sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino**

Os parâmetros reprodutivos de *R. (B.) microplus* são frequentemente avaliados em laboratório. Eles auxiliam no levantamento da resistência parasitária a carrapaticidas comerciais e na busca por novas moléculas com atividade

carrapaticida, oriundas de extratos vegetais ou qualquer outra fonte como fungos ou bactérias. Entretanto, a existência de metodologias adequadas na pesquisa de novos bioativos é essencial para que os diferentes modos de ação possam efetivamente ser avaliados. Como exemplos podemos citar: mortalidade da fêmea ingurgitada, redução da fertilidade da fêmea, inibição do desenvolvimento de diferentes estádios, inibição da eclosão das larvas e atividade repelente frente às larvas (CHAGAS; RABELO, 2012).

A técnica de imersão, sugerida inicialmente por Whitehead (1958) com larvas (Larval Immersion Test - LIT) e fêmeas ingurgitadas de *Boophilus decoloratus* (Adult Immersion Test - AIT), foi aprimorada por Shaw (1966) para as larvas de *R. (B.) microplus*, consistindo na imersão das mesmas por 10 minutos no produto a ser testado. Após este período, as larvas são secas e aproximadamente 100 exemplares são transferidos para papéis filtro secos, acondicionados em estufa e com leitura de mortalidade após 24 horas.

Para a imersão de fêmeas ingurgitadas, o teste mais utilizado é o AIT, aprimorado por Drummond et al. (1973), no qual essas são coletadas dos bovinos, higienizadas e divididas em grupos de 10 para serem imersas por 5 minutos nos produtos-teste. Após esse período, as fêmeas são secas, colocadas em placas de Petri e acondicionadas em estufas climatizadas. As que sobrevivem têm seus ovos pesados e a eclodibilidade verificada visualmente para cálculo da eficácia, conforme fórmulas sugeridas pelos autores. Entretanto, Amaral (1993) sugere que a avaliação visual da eclosão das larvas é subjetiva e pode variar quando efetuada por técnicos diferentes.

Assim, como a porcentagem de eclosão é um parâmetro usado rotineiramente no teste de imersão de fêmeas ingurgitadas, levantou-se a possibilidade de comparar as técnicas de estimativa visual e quantificação por amostragem, para cálculo da taxa de larvas. Assim, buscou-se contribuir para o aperfeiçoamento do AIT e estimular os pesquisadores a optarem por técnicas mais confiáveis nesse tipo de avaliação.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, N. K. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 2, n. 2, p. 144-151, 1993.
- ANTONIASSI, A. Programa de Plantas Medicinais e Terapias Não-convencionais. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, 25 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/proplamed/atividades/racionalidades-medicas/homeopatia/>>. Acesso em: 21 jan. 2017.
- BARROS, A. T. M.; PELLEGRIN, A. O. **Manejo produtivo**. Corumbá: Embrapa: CPAP, 2002. 45 p. (Embrapa-CPAP. Documentos, 01).
- BISSINGER, B. W.; ROE, R. M. Tick repellents: Past, present, and future. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 63-79. 2010.
- BLAGBURN, B. L.; DRYDEN, M. W. Biology, treatment, and control of flea and tick infestations. **Veterinary Clinics of Small Animals**, v. 39, p. 1173-1200, 2009.
- BOITO, J. P.; SANTOS, R. C.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R.; MACHADO, G.; TONIN, A. A.; DA SILVA, A. S. Evaluation of tea tree oil for controlling *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 70-72, 2016.
- BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2011.
- CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do Agronegócio Brasileiro**. Piracicaba, set. 2016. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acesso em: 27 out. 2016.
- CHAGAS, A. C. S. Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008. p. 1-13.
- CHAGAS, A. C. S.; BARROS, L. D.; CONTIGUIBA, F.; FULAN, M.; GIGLIOTI, R.; OLIVERIA, M. C. S.; BIZZO, H. R. *In vitro* efficacy of plant extracts, isolated and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 295-303, 2012.
- CHAGAS, A. C. S.; RABELO, M. D. **Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: revisão e recomendações**. São Carlos: CPPSE, 2012. 27p. (Embrapa- CPPSE. Documento Técnico, 106).

CHAGAS, A. C. S. Medicinal plant extracts and nematode control. **CAB Reviews**, v. 10, p. 1-8, 2015.

CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.

COSTA-JUNIOR, L. M.; FURLONG, J. Efficiency of sulphur in garlic extract and non-sulphur homeopathy in the control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 1, p. 7-11, 2011.

CRUZ, B. C.; LOPES, W. D.; MACIEL, W. G.; FELIPPELLI, G.; FÁVERO, F. C.; TEIXEIRA, W. F.; CARVALHO, R. S.; RUIVO, M. A.; COLLI, M. H.; SAKAMOTO, C. A.; DA COSTA, A. J.; DE OLIVEIRA, G. P. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p. 309-317, 2015.

DAVEY, R. B.; OSBURN, R. L.; MILLER, J. A. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographic areas. **Annals of the Entomological Society of America**, v.77, n.1, p.1-5, 1984.

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

ESTRADA-PEÑA. A.; VENZAL, J. M. High-resolution predictive mapping for *Boophilus annulatus* and *B. microplus* (Acari: ixodidae) in Mexico and Southern Texas. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-5, p. 350-358, 2006.

FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. Brasília: Comissão da Farmacopeia Brasileira, 2011. 364 p. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a\\_edicao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf)>.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. **Feeding the world**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e03.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2016.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, n. 159, p. 1-7, 2007.

FURTADO, F. N.; SILVA, V. A. R.; PEREIRA, J. R. G.; KISUE, A.; COELHO, F. A. S.; COELHO, M. D. G. Avaliação *in vitro* do potencial acaricida do óleo essencial de *Tagetes minuta* frente à *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Biociências**, v. 19, n. 01 p. 104-110, 2013.

GEORGE, D. R.; Finn, R. D.; Graham, K. M.; Sparagano, O. A. E. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 28, p. 1-12, 2014.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 2, p. 263-277, 2004.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência, controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. p. 13.

GOTTSCHALK, I.; LEISTNER, T. Consumer reactions to the availability of organic food in discount supermarkets. **International Journal of Consumer Studies**, v. 37, n. 2, p. 136-142, 2013.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; PEREZ DE LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUERRERO, F. D.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K. G.; CUNHA, R. C.; MILLER, R. J.; YEATER, K.; LEÓN, A. A. P. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 475, p. 1-12, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HABEEB, S. M. Ethno-veterinary and medical knowledge of crude plant extracts and its methods of application (traditional and modern) for tick control. **World Applied Sciences Journal**, v. 11, n. 9, p. 1047-1054, 2010.

HAHNEMANN, S. **Organon da Arte de Curar**. GEHSP "Bernoit Mure" (tradução da 6a ed Alemã): São Paulo, 1995. 191. p.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 163-171, 2016.

HITCHCOCK, L. F. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, n. 3, p. 295-311, 1955.

HOVI, M.; RODERICK, S. Mastitis therapy in organic dairy herds. **Proceedings of the British Mastitis Conference**. Axient/Institute for Animal Healthy, Milk Development Council/Novartis Animal Healthy, p. 29-35, 1998. Disponível em: <<http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC1998papers/Hovi.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2016.



KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; ALBUQUERQUE, T. A.; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 386-390, 2006.

KUMAR, K. G. A.; TAYADE, A. B.; KUMAR, R.; GUPTA, S.; SHARMA, A. K.; NAGAR, G.; TEWARI, S. S.; KUMAR, B.; RAWAT, A. K. S.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, K. G.; TAYADE, A. B.; KUMAR, R.; GUPTA, S.; SHARMA, A. K.; NAGAR, G.; TEWARI, S. S.; KUMAR, B.; RAWAT, A. K.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, S.; GHOSH, S. Chemo-profiling and bioassay of phytoextracts from *Ageratum conyzoides* for acaricidal properties against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infesting cattle and buffaloes in India. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 2, p. 342-349, 2016.

KUNZ, E. S.; KEMP, H. D. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 13, n. 4, p.1249-1286, 1994.

MAGALHÃES-NETO, M. A.; BENEDETTI, E.; CABRAL, D. D. Homeopatia no controle de carrapatos em bovinos leiteiros. **Revista Horizonte Científico**, v. 2, n. 5, p.1-20, 2005.

MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery - A personal view. In: Oprea TI (Ed.), **Chemoinformatics in drug discovery**. Weinheim: Wiley-VHC. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/413d/909ef156ee0fa848cd5cb7d349e15a42b1fb.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2017.

MATHIE, R. T.; HACKE, D.; CLAUSEN, J. Randomised controlled trials of veterinary homeopathy: Characterising the peer-reviewed research literature for systematic review. **Homeopathy**, v. 101, n. 4, p. 196-203, 2012.

MELLO-PEIXOTO, E. C. T.; FIGUEIREDO, A.; NOVO, S. M. F.; PORTO, E. P.; VALADARES, F.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Application of *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Azadirachta indica* A. Juss in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 32, p. 2392-2398, 2013.

MIRESMAILLI, S.; BRADBURY, R.; ISMAN, M. B. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. **Pest Management Science**, v. 62, n. 4, p. 366-371, 2006.

OLIVEIRA, G. P.; COSTA, R. P.; MELLO, R. P.; MENEGUELI, C. A. Estudo ecológico da fase não parasítica de *Boophilus microplus* no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural Do Rio de Janeiro**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 1974.

OLIVO, C. J.; HEIMERDINGER, A.; ZIECH, M. F.; AGNOLIN, C. A.; MEINERZ, G. R.; BOTH, F.; CHARÃO, P. S. Rope tobacco aqueous extract on the control of cattle ticks. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1131-1135, 2009.

PAMVET. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. **Relatório 2006-2007**, 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVET.pdf/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>>. Acesso em: 29 set. 2016.

RAYNAL, J. T.; SILVA, A. A. B.; SOUSA, T. J.; BAHIENSE, T. C.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 71-77, 2013.

REAL, C. M. Homeopatia populacional – Fundamentos Ruptura de um Paradigma. **A Hora Veterinária**, v. 28, n. 164, p. 13-20, 2008.

RECK J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, A. U.; CORAQQSSINI, B. V.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, S. J.; MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

ROEL, A. R. The use of plants with insecticide properties: a contribution for Sustainable Rural Development. **Interações – Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

SARTOR e SANTARÉM, 2006 in: SPINOSA, E. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan (4 ed.) Rio de Janeiro, 2006. p. 568-581.

SCHWARZENBACH, R. P.; EGLI, P.; HOFSTETTER, T. B.; GUNTEN, U.; WEHRLI, B. Global Water Pollution and Human Health. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, p. 109-136, 2010.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 389-405, 1966.

SIGNORETTI, R. D.; VERÍSSIMO, C. J.; SOUZA, F. H. M.; GARCIA, T. S.; OLIVEIRA, E. M.; SOUZA, K. G.; MOURÃO, G. B. Desempenho e infestação por parasitos em machos leiteiros suplementados com sal proteinado com ou sem os medicamentos homeopáticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 40-44, 2008.

SIGNORETTI, R. D.; VERÍSSIMO, C. J.; SOUZA, F. H. M.; OLIVEIRA, E. M.; DIB, V. Aspectos produtivos e sanitários de vacas mestiças leiteiras tratadas com produtos homeopáticos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 625-633, 2010.

SILVA, N. L.; MOLETTA, J. L.; MINHO, A. P.; FILIPPSEN, L. F. Uso de isoterápico no controle da infestação natural por *Boophilus microplus* em bovinos. **Arquivos da Associação Médico Veterinária Homeopatia Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 40-42, 2007.

SOARES, J. F.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F.; SILVA, C. F. B. Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1495-1497, 2007.

SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Avaliação da eficácia do fungo *Metharizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados com carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 109, 1997.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods: review. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 183-194, 2002.

WHITEHEAD, G. B. Acaricide resistance in the blue tick, *Boophilus decoloratus* (Koch) – Part I. **Bulletin of Entomological Research**, v. 49, n. 4, p. 661-673, 1958.

**CAPÍTULO 2 – EFEITO ACARICIDA E REPELENTE *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea elegans* (CANELA-SASSAFRÁS) SOBRE O CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Efeito acaricida e repelente *in vitro* do óleo essencial de *Ocotea elegans* (canela-sassafrás) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Amanda Amanda Figueiredo<sup>1</sup>, Leonor Monteiro Nascimento<sup>2</sup>, Louyse Gabrielli<sup>3</sup>, Rodrigo Giglioti<sup>1</sup>, Ricardo Diego D. G. de Albuquerque<sup>2</sup>, Marcelo Guerra Santos<sup>4</sup>, Déborah Quintanilha Falcão<sup>5</sup>, Leandro Rocha<sup>2,6</sup>, Ana Carolina de Souza Chagas<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro - Cidade Universitária, Rio de Janeiro - Rio de Janeiro – RJ - Brasil.

<sup>3</sup>Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>Faculdade de Formação de Professores, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Gonçalo, RJ – Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal Fluminense – Rua Dr. Mário Viana, 523 - Niterói – RJ - Brasil.

<sup>6</sup>Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal Fluminense – Rua Dr. Mário Viana, 523 - Niterói – RJ - Brasil

<sup>7</sup>Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3411 5675.

*E-mail address:* carolina.chagas@embrapa.br (A.C. S. Chagas).

## **RESUMO**

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por afetar o bem-estar animal, causar queda do desempenho produtivo e transmitir a Tristeza Parasitária Bovina, doença que provoca elevada taxa de mortalidade nos rebanhos. A principal forma de controle se faz por meio de carrapaticidas químicos, entretanto, além do risco de resíduos nos alimentos e ambiente, a situação de resistência parasitária aos mesmos é preocupante. Dessa forma,

avaliou-se o efeito acaricida e repelente *in vitro* do óleo essencial da espécie *Ocotea elegans* (canela-sassafrás) sobre larvas e fêmeas adultas de *R. (B.) microplus*. Foram realizados o teste de contato em papel impregnado (LPI), teste de imersão de adultos (AIT) e teste de repelência larvar (TR). A identificação e elucidação estrutural das substâncias do óleo foram realizadas por ressonância magnética nuclear (RMN). No AIT verificou-se eficácia acima de 90% a partir da concentração de 25 mg/mL. Nos dois LPIs realizados com 48h, somente a concentração de 100 mg/mL resultou em mortalidades acima de 70%. Por outro lado, o óleo apresentou repelência média de 95% a partir de 0,78 mg/mL no TR. A partir dos resultados obtidos em cada teste foi possível estimar via Probit SAS as CL<sub>50</sub> de dois testes LPI com 48h, sendo 59,68 (41,34–100,51) e 25,59 (14,23–58,57) mg/mL, respectivamente, bem como as CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do AIT: 4,96 (2,02–7,22) e 17,37 (12,52–33,23) mg/mL, e do TR: 0,04 (0,01–0,15) e 1,24 (0,49–2,14) mg/mL, respectivamente. Foi possível concluir que *O. elegans* possui efeito acaricida significativo sobre fêmeas ingurgitadas e na repelência de larvas do carrapato *R. (B.) microplus*, podendo ser uma alternativa promissora no controle desse ectoparasita.

*Palavras-chave:* carrapato bovino, resistência, resíduos, óleos essenciais, fitoterapia.

## 1. Introdução

A importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* está altamente relacionada aos prejuízos causados por seu parasitismo, uma vez que afeta diretamente o bem-estar dos animais, resultando em estresse, anemia devido à espoliação sanguínea, queda dos desempenhos produtivo e reprodutivo, além da transmissão dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina, doença que provoca elevada taxa de mortalidade nos rebanhos. O impacto econômico é grande e os setores de produção de leite e carne. No Brasil, as perdas são estimadas em \$3,24 bilhões de dólares por ano com medidas para controle e prevenção desse ectoparasita (Rodrigues e Leite, 2013; Raynal et al., 2013; Grisi et al., 2014).

A aplicação de antiparasitários químicos tornou-se indispensável na pecuária e, atualmente, este é o principal método utilizado no controle de carrapatos (Furtado et al., 2013). Porém, há uma evidente preocupação por parte dos produtores relacionada à resistência que os parasitas vêm adquirindo frente aos produtos disponíveis no mercado. Nas últimas décadas, relatos científicos acerca da resistência de *R. (B.) microplus* frente aos carrapaticidas químicos aumentaram (Raynal et al., 2013; Cruz et al., 2015; Higa et al., 2016)

e este ainda é um quadro preocupante.

A busca por novos fármacos como alternativas para controlar parasitas tem ascendido constantemente e, nesse sentido, a fitoterapia tem demonstrado potencial para se tornar uma ferramenta na redução da resistência e resíduos, possibilitando prolongar a vida útil dos produtos comerciais utilizados, bem como a associação de bioativos vegetais com substâncias sintéticas (Roel, 2001; Chagas, 2008). Moléculas ativas, oriundas de espécies vegetais, têm sido extensivamente estudadas. Busca-se por características que seriam interessantes para o controle parasitário em sistemas de produção animal, tais como: menor impacto ambiental, redução da presença de resíduos nos alimentos, baixo custo e retardo na resistência parasitária (Roel, 2001; Mello-Peixoto et al., 2013).

*Ocotea elegans* Mez, conhecida popularmente no Brasil como “canela-sassafrás”, pertence à família Lauraceae. Esta família vegetal, dependendo da espécie, pode atingir até 50 metros de altura e possui distribuição pantropical. Ocorre na América, Ásia, Austrália, Madagascar e África do Sul. Possui importância econômica por suas espécies apresentarem diversas substâncias de uso nas indústrias farmacêutica, química, alimentícia e cosmética, bem como na construção, marcenaria e fabricação de papel (Rohwer, 1993; Marques, 2001; Marques et al, 2004). Espécies de *Ocotea spp.* são encontradas em toda a América tropical, ocorre em floresta seca no bioma restinga, vegetação encontrada na costa brasileira (Kropf et al., 2015).

Várias classes de compostos foram isoladas do gênero *Ocotea*, tais como terpenóides, alcalóides, neolignanais, alil-fenóis, cumarinas, e sesquiterpenlactonas (Hess, 1995). Estudos recentes detectaram efeito acaricida de extratos obtidos de *Ocotea lancifolia* e *Ocotea diospyrifolia* sobre fêmeas ingurgitadas e larvas do carrapato *R. (B.) microplus* (Barbosa et al. 2013; Santos et al., 2013). Prieto et al. (2010) testaram *in vitro* os óleos essenciais de *Ocotea macrophylla* e *Ocotea longifolia* sobre o inseto *Sitophilus zeamais* (“gorgulho-do-milho”) por meio de papéis impregnados. A primeira espécie não apresentou efetividade, mas a atividade inseticida do óleo de *O. longifolia* aumentou proporcionalmente com as concentrações, resultando em mortalidade superior a 90% a 500 µL/L ar.

Uma série de espécies da família Lauraceae, de ocorrência no Brasil, ainda não foram investigadas quanto às suas possíveis atividades biológicas (Marques, 2001; Yamaguchi et al., 2012). Partindo-se desse princípio e levando-se em consideração as atividades do gênero *Ocotea* relatadas na literatura, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito acaricida

e repelente, *in vitro*, do óleo essencial da espécie *O. elegans* sobre larvas e fêmeas adultas de *R. (B.) microplus*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial de *Ocotea elegans***

Folhas de *O. elegans* foram coletadas de diferentes espécimes no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), no município de Carapebus, Rio de Janeiro, Brasil, geograficamente situada à 22° 18'32" S, e 41° 66'11" W, durante o dia, nos meses de novembro e dezembro de 2014 e janeiro de 2015, sob autorização de coleta 13659-2 do IBAMA. A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Dr. Marcelo Guerra Santos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e um voucher do espécime foi depositado no herbarium da Faculdade de Formação de Professores (RFFP), sob o número RFFP: 16.873. As folhas foram submetidas à hidrodestilação por 4 h em aparato modificado do tipo Clevenger para extração do óleo essencial, processo descrito por Nascimento et al. (2017).

### **2.2. Análises químicas do óleo essencial de *Ocotea elegans***

O óleo essencial utilizado no presente estudo foi previamente analisado por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG/MS) e detector por ionização de chama (CGFID) (Nascimento et al., 2017). A identificação e elucidação estrutural das substâncias do óleo foram realizadas por ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C foram obtidos no equipamento Varian VNMRS com frequência de 300 e 500 MHz <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C, utilizando solvente deuterado e TMS como padrão interno. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm). A edição dos espectros foi realizada utilizando o SpinWorks 3.1.5.0 e mestReNova 6.0.2-5475.

### **2.3. Testes *in vitro* com o carrapato *R. (B.) microplus***

Esses testes foram realizados de acordo com a Autorização de pesquisa n° 37006-4 do

SISBIO. As fêmeas ingurgitadas utilizadas neste ensaio foram provenientes de bovinos do Sistema de Produção de Leite da Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, isentos de tratamento carrapaticida há pelo menos 90 dias. De acordo com biocarrapaticidograma realizado em 2016, detectou-se que os carrapatos deste rebanho são resistentes a piretróides, organofosforados e amidinas.

### 2.3.1. Teste de imersão de fêmeas adultas (AIT)

Fêmeas ingurgitadas foram colhidas manualmente dos bovinos com movimentos de rotação até seu total desprendimento, a fim de preservar a integridade do aparelho bucal. Foram então higienizadas com água corrente, enxutas com papel absorvente e distribuídas ao acaso em grupos de 10. Os grupos tiveram o peso mensurado e balanceado (balança Shimadzu, modelo AUX220; 0,0001g de precisão) e, posteriormente, submetidas à imersão por cinco minutos consecutivos em recipientes contendo 5 mL de *O. elegans* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78 mg/mL, com três repetições. O mesmo procedimento foi realizado para os grupos controle (C) com água destilada (C1) e etanol 75% (C2). Em seguida, as fêmeas ingurgitadas foram enxugadas com papel absorvente e acondicionadas em placas de Petri e foram mantidas em estufa a 27°C, com umidade relativa (UR) acima de 80%. Após o período de ovipostura, mensurou-se o peso dos ovos e esses foram transpostos para seringas adaptadas, vedadas com algodão hidrófilo e novamente mantidos em estufa por mais 15 dias. Ao final desse período, realizou-se a estimativa de eclosão por meio da contagem de amostras de cada seringa (Giglioti et al., 2011). Avaliou-se o Índice de Oviposição (IO), % de inibição da oviposição, Índice de Eficiência Reprodutiva (REI) e Eficácia do Óleo (EO) de *O. elegans*, de acordo com as fórmulas de Drummond et al. (1973):

$$\text{IO} = \frac{\text{massa dos ovos (g)}}{\text{biomassa das fêmeas (g)}}$$

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

$$\text{REI} = \frac{\text{massas dos ovos (g)} \times \% \text{ eclosão}}{\text{biomassa das fêmeas (g)}} \times 20.000^*$$

\*número estimado de ovos presentes em 1g de postura de *R. (B.) microplus*



### 2.3.2. Testes com larvas de *R. (B.) microplus*

Para os testes descritos a seguir, foram utilizadas larvas com idades entre 14 e 21 dias. A partir de bovinos do CPPSE, coletaram-se fêmeas ingurgitadas que foram higienizadas, acondicionadas em placas de Petri e incubadas em estufa B.O.D. ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ; UR > 80%) para realizarem ovipostura. Posteriormente, transferiu-se as massas de ovos para seringas adaptadas e vedadas para a eclosão das larvas.

### 2.3.3. Teste de contato de larvas em papel impregnado (LPI)

Papéis filtro (2 cm x 2 cm) foram impregnados com 1 mL de *O. elegans* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78 mg/mL. Com auxílio de alça de platina, cerca de 100 larvas foram depositadas nos papéis impregnados com a solução e, utilizando-se uma pinça, cobriu-se as larvas formando um “sanduíche”, o qual foi acondicionado dentro de um envelope de papel filtro maior (4 cm x 6 cm), previamente identificado quanto à concentração. Os envelopes foram então vedados, a fim de evitar fuga das larvas, e mantidos em estufa ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ; UR > 80%) por 24 horas. As mesmas concentrações também foram avaliadas após 48 horas de exposição. Realizou-se 03 repetições para cada concentração, bem como para os grupos controles, sendo esses compostos por água (C1) e água destilada+tween 80 a 2% (C2). A leitura do teste foi realizada por meio de bomba a vácuo. Quantificaram-se larvas vivas e mortas, obtendo o índice de mortalidade e eficácia do óleo, calculados em porcentagem, através do total de larvas mortas em relação ao total presente em cada repetição (FAO, 1971).

### 2.3.4. Teste de repelência larvar (TR)

A atividade repelente foi avaliada 6h após a imersão de palitos de madeira (25 cm de comprimento) em *O. elegans* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78 mg/mL. A primeira porção do palito próximo à base (15 cm) não teve contato com a solução, enquanto a mediana (de 15 a 20 cm) e a extremidade superior (de 20 a 25 cm) sim, ou seja, os 10 cm superiores dos palitos permaneceram imersos nas soluções dispostas em tubos Falcon de 15 mL por 15 minutos consecutivos. Cada palito foi fixado no centro de um suporte

previamente montado com papel filtro quantitativo (JP41, faixa preta, 12,5 cm de raio, poros de 28  $\mu\text{m}$ ) cortado no formato de um triângulo ( $\pm 6$  cm de cada lado) e com um orifício no centro, colado no centro de um copo plástico descartável de 50 mL contendo gesso. Os palitos dos grupos controle foram imersos em água destilada (C1) e água destilada+Tween 80 a 2% (C2). Cerca de 100 larvas foram adicionadas na base de cada palito (entre 2 e 4 cm) e essas se deslocaram para o ápice ou dispersaram-se no papel filtro. Cada tratamento foi realizado em triplicata (total de 300 larvas/tratamento). Posteriormente, quantificaram-se larvas de cada área por meio de bomba à vácuo estimando-se a repelência de *O. elegans* (Chagas e Rabelo, 2012).

#### 2.4. Análise estatística

Os dados foram analisados por delineamento inteiramente casualizado por meio do procedimento PROC GLM, cujo modelo incluiu o efeito fixo de dose e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com significância de 5%. A determinação da concentração letal (CL) foi realizada por meio da regressão linear Probit utilizando a distribuição normal e o modelo linear generalizado para dados binários (regressão logística), com estimativas dos parâmetros dessas equações por máxima verossimilhança. Foram estimadas então as  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  (concentração necessária para as respectivas letalidades). Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SAS (2002/2010).

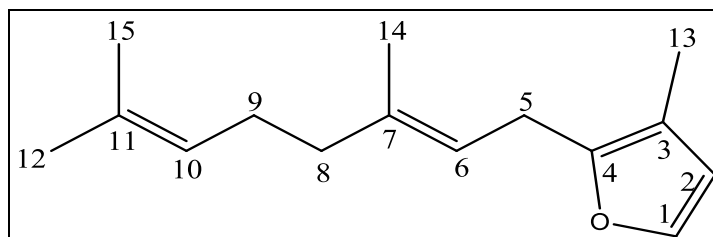
### 3. Resultados

O óleo essencial obtido a partir das folhas de *O. elegans* apresentou aspecto amarelo claro, odor acentuado e agradável. Onze compostos sesquiterpenos foram identificados, sendo o sesquirosefurano o constituinte majoritário, correspondente a 92,2% da composição relativa total. Informações sobre a composição química deste óleo essencial podem ser vistas no estudo de Nascimento et al. (2017). Na **Tabela 1**, constam os resultados das análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto químico sesquirosefurano (**Figura 1**). O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 2**) apresentou quatro sinais referentes às metilas que aparecem como singlete em  $\delta$  1.96, 1.70, 1.67 e 1.59, um sinal referente ao hidrogênio ligado ao carbono 5, que aparece como um dublete em  $\delta$  3.28, um multiplete na região proximal a  $\delta$  5.08, e dois dubletos em  $\delta$  6.15 e

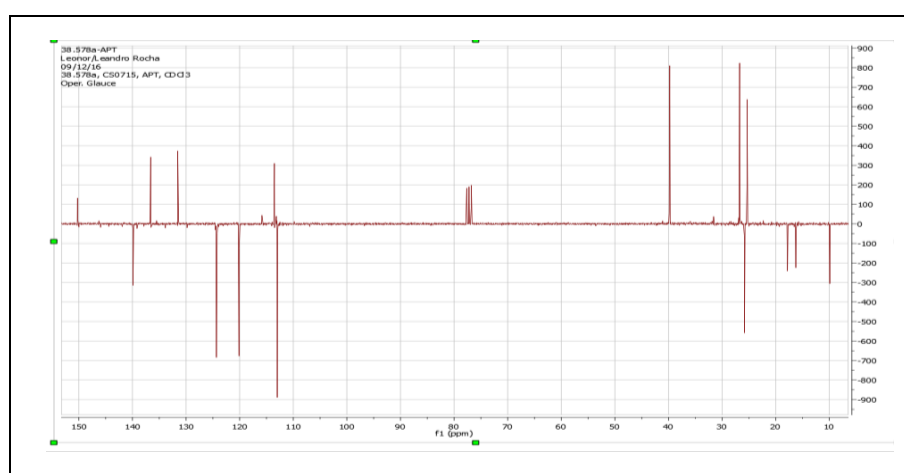
7.20, referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 1, respectivamente.

**Tabela 1.** Dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN da substância sesquirosefurano, em ppm. Análise por meio de PRESAT, COSY, APT, HSQC e HMBC.

Posição	$\delta$ H	$\delta$ C
1	7.20 (d)	139.00
2	6.15 (d)	124.33
3	-	136.48
4	-	150.00
5	3.28 (d)	39.66
6	multiplete	120.10
7	-	131.56
8	-	26.72
9	-	25.25
10	multiplete	112.93
11	-	113.52
12	1.70 (s)	17.80
13	1.96 (s)	25.79
14	1.59 (s)	9.92
15	1.67 (s)	16.24



**Fig. 1.** Estrutura química do sesquirosefurano, substância majoritária do óleo essencial de *O. elegans*.



**Fig. 2.** Espectro de RMN do óleo essencial das folhas de *O. elegans* e seus respectivos deslocamentos químicos de carbono  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Foi possível observar os seguintes sinais (em  $\delta$  ppm) no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN: 150.00 (C-4), 139.90 (C-1), 136.48 (C-3), 131.56 (C-7), 124.33 (C-2), 120.10 (C-6), 113.52 (C-11), 112.93 (C-10), 39.66 (C-5), 26.72 (C-8), 25.79 (C-13), 25.25 (C-9), 17.80 (C-12), 16.24 (C-15), 9.92 (C-14), que por sua vez foram coerentes com os dados encontrados em estudo anterior (Masahiro et al, 1982) e na base de dados SciFinder, Chemical Abstracts Service.

No AIT, conforme ilustrado na **Tabela 2**, não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação aos pesos das fêmeas ingurgitadas (PF), visto que esses foram previamente ajustados para minimizá-las. Como esperado, os grupos controle apresentaram as maiores médias de peso dos ovos (PO), em função de maior ovipostura realizada pelas fêmeas ingurgitadas desses grupos. *O. elegans* nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL inibiu a ovipostura, pois resultaram nas menores médias de peso dos ovos, e conseqüentemente, em menores porcentagens de eclosão das larvas (ECLO), ou até mesmo nulas, como ocorreu para as concentrações de 50 e 100 mg/mL. Os índices de eficiência reprodutiva (REI) confirmam isso, uma vez que constatou-se eficiência reprodutiva nula das fêmeas submetidas ao tratamento nas concentrações de 50 e 100 mg/mL, alcançando-se 100% de eficácia nas mesmas. A partir da concentração de 12,5 mg/mL a eficácia foi menor, mas manteve-se superior a 70%.

**Tabela 2.** Médias dos pesos das fêmeas (PF), pesos das massas de ovos (PO), % de eclosão das larvas (ECLO), índice de eficiência reprodutiva (REI) e eficácia do óleo essencial (EO) de *Ocotea elegans* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, avaliadas pelo teste de imersão de teleóginas (AIT).

Concentração* (mg/mL)	PF (g)	PO (g)	ECLO (%)	REI	EO (%)
<b>C1 (água)</b>	2.29±0.00a	1.09±0.07a	98.00±0.00a	93.30±6.71a	
<b>C2 (etanol)</b>	2.30±0.00a	0.81±0.09a,b	88.33±2.88a	62.19±5.26a,b	
<b>6.2</b>	2.29±0.00a	0.66±0.14b	55.00±39.05a,b	33.65±25.64b,c	63.93±27.48a
<b>12.5</b>	2.32±0.01a	0.77±0.07b	36.00±15.27b,c	25.13±12.43c,d	73.07±13.32a
<b>25</b>	2.29±0.01a	0.32±0.14c	8.00±10.39c	2.63±3.68c,d	97.18±3.95a
<b>50</b>	2.29±0.02a	0.06±0.11c	0.00±0.00c	0.00±0.00d	100.00±0.00a
<b>100</b>	2.32±0.01a	0.03±0.03c	0.00±0.00c	0.00±0.00d	100.00±0.00a

\*Letras diferentes na mesma coluna representam uma diferença ( $p \leq 0.5$ ).

Os resultados obtidos nos testes com larvas revelam as porcentagens médias de eficácia do óleo essencial de *O. elegans* tanto para as taxas de mortalidade obtidas nos testes LPI, quanto para os índices de repelência obtidos no TR, conforme observado na **Tabela 3**. No LPI1 (24h), de maneira geral, as médias de mortalidade evidenciadas foram baixas, apresentando alguma eficácia apenas a partir da concentração de 12,5 mg/mL a 100 mg/mL, sem diferença significativa entre os tratamentos e controles. Apesar de se preconizar a contagem das larvas 24h após o tratamento, realizou-se adaptação para a avaliação após 48h de exposição. Assim, no LPI2 (48h), evidenciou-se mortalidade das larvas a partir da concentração de 3,12 mg/mL, destacando-se a concentração de 100 mg/mL, que resultou em taxa de mortalidade diferente estatisticamente das demais. O LPI3 (48h) foi realizado com o intuito de confirmar os resultados obtidos no LPI2. Observou-se que os resultados seguiram padrão semelhante ao LP2, com mortalidade das larvas a partir da concentração de 3,12 mg/mL, sem diferença ( $p>0,05$ ) entre as concentrações, exceto para 100 mg/mL, e com porcentagens médias de mortalidade semelhantes ao LPI2.

**Tabela 3.** Médias de eficácia do óleo essencial de *O. elegans* em relação à mortalidade, verificada pelos testes de contato de larvas em papel impregnado (LPI) de 24h e 48h, e em relação à repelência obtida no teste de repelência (TR).

Concentração (mg/mL)*	Mortalidade (%)			Repelência (%)
	LPI 1 (24h)	LPI 2 (48h)	LPI 3 (48h)	TR
C1 (água)	0.00±0.00a	0.00±0.00d	0.00±0.00b	19.44±6.89c
C2 (etanol)	0.00±0.00a	0.00±0.00d	0.00±0.00b	8.07±4.00c
<b>0.78</b>	0.00±0.00a	0.00±0.00d	0.00±0.00b	91.19±7.51a,b
<b>1.56</b>	0.00±0.00a	0.00±0.00d	0.00±0.00b	85.23±3.35b
<b>3.12</b>	0.00±0.00a	10.99±6.37c,d	7.59±5.31b	97.85±2.32a
<b>6.25</b>	0.00±0.00a	5.25±0.70d	37.73±54.13a,b	94.21±5.95a,b
<b>12.5</b>	6.71±9.98a	22.81±4.34b,c	31.12±20.15a,b	99.11±1.52a
<b>25</b>	8.25±4.42a	23.90±7.94b,c	52.26±9.22a,b	99.11±0.86a
<b>50</b>	10.82±17.88a	28.43±8.69b	61.23±33.66a,b	100.00±0.00a
<b>100</b>	34.48±47.61a	77.40±8.40a	76.25±21.90a	100.00±0.00a

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ( $p\leq 0.5$ ).

Em relação ao TR, ainda é possível observar na **Tabela 3** porcentagens de repelência elevadas a partir da concentração mais baixa, que foi de 0,78 mg/mL. A concentração de 1,56 mg/mL, apesar de ter obtido média de repelência inferior em relação à 0,78 mg/mL ( $85,23 \pm 3,35$  e  $91,19 \pm 7,51$ , respectivamente), não diferiu estatisticamente das concentrações 0,78 e 6,25 mg/mL. As maiores porcentagens de repelência foram verificadas a partir da concentração de 12,5 mg/mL, sendo que 50 mg/mL e 100 mg/mL atingiram 100%.

A partir dos resultados obtidos em cada teste, foi possível estimar via Probit as concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) do óleo essencial de *O. elegans* sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* no AIT, bem como sobre as larvas nos testes LPI1, LPI2, LPI3 e TR, conforme pode ser visualizado na **Tabela 4**. Esses dados revelam que tanto no AIT ( $CL_{50} = 4,96$  mg/mL e  $CL_{90} = 17,37$  mg/mL), quanto no TR ( $CL_{50} = 0,04$  mg/mL e  $CL_{90} = 1,24$ ), baixas concentrações foram necessárias para determinar o bom desempenho de *O. elegans*, confirmando sua ação acaricida e repelente.

**Tabela 4.** Concentrações letais (CL, mg/mL)  $\pm$  95% de limites de confiança do óleo essencial de *O. elegans* avaliado sobre *R. (B.) microplus* pelos testes de imersão de teleóginas (AIT), contato de larvas em papel impregnado (LPI) e repelência (TR).

Testes	$CL_{50}$	$CL_{90}$
AIT	4.96 (2.02-7.22)	17.37 (12.52-33.23)
LPI 1 (24h)	*	*
LPI 2 (48h)	59.68 (41.34-100.51)	*
LPI 3 (48h)	25.59 (14.23-58.57)	*
TR	0.04 (0.01-0.15)	1.24 (0.49-2.14)

\*A letalidade observada não foi suficiente para determinar os valores de CL.

#### 4. Discussão

Os sesquiterpenos foram apontados como predominantes nos estudos de composição química do gênero *Ocotea*, bem como por sua atividade biológica (Moraes, 2012; Camargo et al, 2013). Pode-se citar as espécies *O. catharinensis* (Teles, 2012), *O. duckei* (Teles, 2012; Rosseti et al, 2014), *O. gomezii* (Chaverri, 2011) e *O. elegans* (Batista et al, 2010; Nascimento et al, 2017). A presença do sesquiterpeno “sesquirosefurano” na família Lauracea havia sido

relatada previamente por Hayashi e Komae (1980), bem como por Nascimento et al. (2017), que descreveram os constituintes do óleo essencial avaliado no presente estudo, todos sesquiterpenos:  $\alpha$ -copaeno (0,4%),  $\beta$ -cariofileno (0,4%), farneseno<(e)- $\beta$ -> (2,8%), aloaromadendreno (1,1%), biciclogermacreno (0,6%), nerolidol <(e)-> (0,3%), dendrolasina (0,8%), espatulenol (0,8%), eremoligenol (0,3%), metil farnesoato <(2e,6e)-> (0,3%) e sesquirosefurano (92,2%).

Os resultados da análise por RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  mostram a correspondência dos resultados encontrados no presente estudo com os dados de literatura para o constituinte majoritário sesquirosefurano (Masahiro et al., 1982). A substância foi identificada e consta na biblioteca Scifinder pelo número de CAS 39007-93-7 e seu espectro de sinais (**Figura 1 e Tabela 1**) teve resultados semelhantes aos descritos por Tada et al. (1982).

O sesquirosefurano foi também relatado em outras espécies de Lauraceae, como *Lindera strychnifolia* Vill, *Neolitsea aciculata*, *Neolitsea sericea* Blume Koidz, *Neolitsea zeylanica* Merr (Gottlieb, 1972), *Actinodaphne longifolia* (Hayashi e Komae, 1980) e *Litsea coreana* Leveille (Rattan, 2010). Esse composto apresenta propriedade termicida (Ozaki, 1999) e potencial como precursor biogenético de substâncias com importantes propriedades farmacológicas, como a formação de litseaverticilois (sesquiterpenos isolados de *Vietnamese shrub*), aos quais são atribuídas propriedades anti-HIV (Margaros et al., 2006). Em estudos químicos envolvendo auto-oxidação por biomimetismo na síntese química, os sesquirosefuranos perileno, rosefurano e litseaverticilois apresentaram potencial intermediário de síntese (Tada et al., 1982; Margaros et al., 2006).

As análises realizadas por Prieto et al. (2010) revelaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos no óleo essencial obtido a partir das folhas de *O. longifolia* (91,67% e 6,20%, respectivamente) e de *O. macrophylla* (0,62%, 70,62%, respectivamente).

Este é o primeiro estudo no qual se avaliou o efeito biológico do óleo essencial de *O. elegans* sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus*. De acordo com Enan (2001), qualquer que seja o modo de ação específico, a lipofilicidade dos óleos essenciais e dos seus constituintes possivelmente desempenham um papel importante na eficácia, por otimizarem a penetração dos bioativos através da cutícula dos artrópodes. O modo de ação dessa espécie vegetal ainda não foi elucidado, entretanto, neste ensaio demonstrou atividade acaricida e repelente. As concentrações de 50 e 100 mg/mL interferiram na ovipostura das fêmeas, resultando em menores pesos de ovos (0,06 g e 0,03 g, respectivamente) e ainda

inibindo completamente a eclosão de larvas no AIT. Isso corrobora com os estudos de Barbosa et al. (2013), no qual extratos de *O. lancifolia* a 0,2%, produzidos com folhas e cascas do tronco, demonstraram atividade significativa sobre os parâmetros reprodutivos de *R. (B.) microplus*, obtendo eficácia de 34,5 % no AIT. Dessa forma, pode-se inferir que o óleo essencial de *O. elegans* possivelmente interferiu no aparelho reprodutivo das fêmeas ingurgitadas, e deve ser melhor estudado em nível histológico. Essas mesmas concentrações (50 e 100 mg/mL) no TR repeliram 100% das larvas, observando-se resultados próximos a 95% a partir da concentração de 3,12 mg/mL.

Em estudo no qual avaliou-se extrato etanólico obtido a partir de ramos e folhas de *O. diospyrifolia*, por meio do teste de imersão de larvas, a atividade larvicida foi superior a 95% na concentração de 40% (Santos et al., 2013). O presente ensaio, apesar de não ter demonstrado tal desempenho larvicida nos testes de LPI, obteve taxas de mortalidade acima de 75% com o óleo de *O. Elegans*, em ambos os testes realizados com 48h, na concentração de 100 mg/mL, considerada bem inferior aos 400 mg/mL utilizado por Santos et al. (2013).

Estudos com óleos essenciais de espécies vegetais de restinga, também coletadas no PNRJ, apresentaram bons resultados quanto à atividade inseticida e carrapaticida. Nos estudos de Nogueira et al. (2014a e 2014b), o óleo essencial de *Zanthoxylum caribaeum* mostrou-se eficaz contra ninfas do inseto hematófago *Rhodnius prolixus*, bem como atividade frente ao carrapato *R. (B.) microplus*. O óleo essencial era constituído de 47.3% de sesquiterpenos.

O óleo essencial de *O. longifolia* demonstrou atividade significativa contra o inseto *S. zeamais*, praga de plantações de milho, apresentando  $CL_{50}$  de 280,5  $\mu$ L/L ar. Neste estudo, os autores ainda sugeriram que esse óleo poderia ser associado aos inseticidas sintéticos para o controle da praga (Prieto et al., 2010). Do mesmo modo, a partir do bom desempenho do óleo essencial de *O. elegans*, conforme demonstrou-se no presente estudo, é possível afirmar que essa espécie vegetal representa potencial alternativa frente ao controle de infestações por *R. (B.) microplus*, podendo, com perspectiva, ter seu componente majoritário incorporado aos carrapaticidas sintéticos. Por esse motivo, necessita ser melhor estudado *in vitro* e em ensaios toxicológicos e a campo.

Pesquisas com foco no levantamento de novas substâncias ativas presentes em extratos vegetais para o controle do carrapato bovino têm se intensificado, no entanto, resultados de elevada eficácia *in vitro* por vezes não se repetem a campo. Isso pode estar relacionado às condições de coleta, estabilização e de armazenamento, o que pode influenciar



a qualidade e o valor terapêutico do material vegetal (Chagas, 2015). Diante disso, o presente ensaio preconizou boas técnicas de armazenamento e conservação do material vegetal de *O. elegans*. No entanto, também faz-se necessário avançar no desenvolvimento de formulações adequadas que permitam melhorar a solubilidade, aprimorando processos de absorção e distribuição tecidual e diminuindo possíveis efeitos tóxicos.

### **Conclusões**

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que *O. elegans* apresenta atividades acaricida, especialmente sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, e atividade repelente sobre as larvas. Por conseguinte, possui potencial para possivelmente ser um adjuvante no controle do carrapato bovino, devendo-se focar os próximos estudos em formulações contendo seu constituinte majoritário, o sesquirosefurano, bem como em ensaios toxicológicos e clínicos.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter concedido bolsa de estudo e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Projeto 02.13.01.001.00-00, pelo financiamento dessa pesquisa.

## Referências

- Barbosa, C.S., Borges, L.M.F., Nicácio, J., Alves, R.D., Miguita, C.H., Violante, I.M.P., Hamerski, L., Garcez, W.S., Garcez, F.R., 2013. *In vitro* activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 60, 421–430.
- Batista A.N.L., Batista Junior J.M., López S.N., Furlan M., Cavalheiro A.J., Silva D.H.S., Bolzani V.S., 2010. Aromatic Compounds from three Brazilian Lauraceae species. *Quim. Nova.* 33, 321–323.
- Blenau, W., Rademacher, E., Baumann, A., 2012. Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets? *Apidologie.* 43, 334–347.
- Camargo, M.J., Miranda, M.L.D., Kagamida, C.M., Rodrigues, E.D., Garcez, F.R., Garcez, W.S., 2013. Sesquiterpeno em *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). *Quim. Nova.* 36, 1008–1013.
- Chagas, A.C.S. Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2008, Curitiba. Anais... Curitiba: CBPV, 15, 2008. 13p.
- Chagas, A.C.S., 2015. Medicinal plant extracts and nematode control. *CAB Rev.* 10, 1–8.
- Chagas, A.C.S., Rabelo, M.D., 2012. Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: revisão e recomendações. Publicação Seriada Embrapa, Documento Técnico 106. São Carlos: Embrapa, 2012. 27p.
- Chaverri C., Díaz C., Ciccio J.F., 2011. Chemical analysis of essential oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) collected at "Reserva Biológica Alberto M. Brenes" in Costa Rica and their cytotoxic activity on Tumor Cell Lines. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 741–745.
- Cruz, B.C., Lopes, W.D., Maciel, W.G., Felippelli, G., Fávero, F.C., Teixeira, W.F., Carvalho, R.S., Ruivo, M.A., Colli, M.H., Sakamoto, C.A., da Costa, A.J., De Oliveira, G.P., 2015. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. *Vet. Parasitol.* 207, 309–317.
- Drummond, R.O., Ernest, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O. H., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66, 130–133.

- Enan, E., 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 130, 325–337.
- FAO, 1971. Recommended method for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides: tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp. *Plant Prot. Bull.* 19, 15–18.
- George, D.R., Finn, R.D., Graham, K.M., Sparagano, O.A.E., 2014. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasit Vectors.* 7, 1–12.
- Giglioti, R., Forim, M.R., Oliveira, H.N., Chagas, A.C.S., Ferrezini, J., Brito, L.G., Falcoski, T.O.R.S., Albuquerque, L.G., Oliveira, M.C.S., 2011. *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 181, 309 – 315.
- Gottlieb, O.R., 1972. Chemosystematics of Lauraceae. *Phytochemistry.* 11, 1537–1570.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., Perez de León, A.A., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23, 150–156.
- Hayashi, N, Komae, H., 1980. Chemistry and distribution of sesquiterpene furans in Lauraceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 8, 381–383.
- Hess, S.C. Estudos Químicos, Biológicos e Farmacológicos com *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) e com *Ocotea Suaveolens* (Meissn.) Hassler (Lauraceae). 1995. 186 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina., Florianópolis, 1995.
- Higa, L.O.S., Garcia, M.V., Barros, J.C., Koller, W.W., Andreotti, R., 2016. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25, 163–171.
- Krstin, S., Mohamed, T., Wang, X., Wink, M., 2016. How do the alkaloids emetine and homoharringtonine kill trypanosomes? An insight into their molecular modes of action. *Phytomedicine.* 23, 1771–1777.
- Kropf, M.S., Quinet, A., Andreatta, R.H.P., 2015. Lauraceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Ser. Bot.* 70, 287–308.

- Margaros, I., Montagnon, T., Tofi, M., Pavlakos, E., Vassilikogiannakis, G., 2006. The Power of singlet oxygen chemistry in biomimetic syntheses. *Tetrahedron*. 62, 5308–5317.
- Marques, C.A., 2001. Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*. 8, 195–206.
- Marques, C.A., Barros, C.F., Costa, C.G., 2004. *Beilschmiedia rigida* (Mez) Kosterm. (Lauraceae): diferenciação e desenvolvimento da lâmina foliar. *Rodriguesia*. 55, 89–100.
- Masahiro, T., Chiba, K., Hashizume, T., 1982. Formation of Dendrolasin, Sesquirosefuran, Perillene and Rosefuran by biomimetic auto oxidation. *Agric. Biol. Chem.* 46, 819–820.
- Mello-Peixoto, E.C.T., Figueiredo, A., Novo, S.M.F., Porto, E.P., Valadares, F., Silva, L.P., Silva, R.M.G., 2013. Application of *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Azadirachta indica* A. Juss in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Med. Plants Res.* 7, 2392–2398.
- Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain, MestreNova 6.0.1.
- Moraes, M.M. Relação entre a toxicidade de mono e sesquiterpenos identificados no óleo essencial de espécies dos gêneros *Ocotea* (Lauraceae) e *Eugenia* (Myrtaceae) sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*). Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- Nascimento, L.M., Apolinário, R., Corrêa, A.L., Caldas, G.R., Ruppelt, B.M., Souza, K., Burth, P., Falcão, D.Q., Guerra<sup>f</sup>, M., Gonzalez, M.S., Mello, C.B., Rocha, L., Feder<sup>b</sup>, D., 2017. Effects of nanoemulsion and pure essential oil from leaves of *Ocotea elegans* Mez on the development of the crop pest, *Dysdercus peruvianus*. *Ind. Crops Prod.* submitted.
- Nogueira, J., Mourão, S.C., Dolabela, I.B., Santos, M. G., Brasileiro, C.B., Kelecom, A., Mexas, R., Feder, D., Fernandes, C.P., Gonzales, M.S., Rocha, L., 2014a. *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological effects on *Rhodnius prolixus* nymph. *Parasitol. Res.* 113, 4271–4279.
- Nogueira, J., Vinturelle, R., Mattos, C., Tietbohl, L.A.C., Santos, M.G., Da Silva, I. V. J., Mourão, S.C., Rocha, L., Folly, E., 2014b. Acaricidal properties of the essential oil from *Zanthoxylum caribaeum* against *Rhipicephalus microplus*. *J. Med. Entomol.* 51, 971–975.

- Ozaki, S.K. Efeitos do tratamento da Madeira com Álcool Furfurílico combinado com compostos de boro. 1999. 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.
- Prieto, J.A., Pabón, L.C., Patiño, O.J., Delgado, W.A., Cuca, L.E., 2010. Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *Ocotea* (Lauraceae). *Rev. Colomb. Quím.* 39, 199–209.
- Raynal, J.T., Silva, A.A.B., Sousa, T.J., Bahiense, T.C., Meyer, R., Portela, R.W., 2013. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. *Rev. Bras. Parasitol.* 22, 71–77.
- Rattan, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection.* 29, 913–920.
- Rodrigues, D.C., Leite, R.C., 2013. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 65, 1569–72.
- Roel, A.R., 2001. The use of plants with insecticide properties: a contribution for Sustainable Rural Development. *Interações (Campo Grande).* 1, 43–50.
- Rohwer, J.G., 1993. Lauraceae. In Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich (org.) *The families and genera of vascular plants.* Berlin: Springer-Verlag, 366–391.
- Rossetti, F.C., Leal, S.S., Filho, J.M.B., Oliveira, E.J., Barud, H.S., Horj, J.L., Marquele-Oliveira, F.A., Berreta, A., 2014. Challenges in developing a safe nanomedicine based on *Ocotea duckei* Vattimo to leishmaniasis treatment: Methodology, nanoparticle development and cytotoxicity assays. *Pharm Nanotechnol.* 2, 101–114.
- Santos, L.B., Souza, J.K., Papassoni, B., Borges, D.G.L., Damasceno Junior, G.A., Souza, J.M.E., Carollo, C.A., Borges, F.A., 2013. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 532–538.
- SAS Institute, 2002/2010. SAS/INSIGHT User's Guide, versão 9.1.3, versão para Windows. Cary, NC, USA.
- Tada, M., Kazuhiro, C., Takeshi, H., 1982. Formation of Dendrolasin, Sesquirosefuran, Perillene and Rosefuran by biomimetic auto oxidation. *Agric. Biol. Chem.* 46, 819–820.

- Teles, M.M.R.S. Estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- Yamaguchi, K.K.L., Alcântara, J.M., Veiga Junior, V.F., 2012. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. Acta Amaz. 42, 541–546.

### **CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA HOMEOPATIA NO CONTROLE DE INFESTAÇÕES NATURAIS POR *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* EM BOVINOS DE LEITE**

**Estudo da homeopatia no controle de infestações naturais por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos de leite**

**Amanda Figueiredo<sup>a</sup>, Rafaela Regina Fantatto<sup>b</sup>, Isabela Cabeça Agnolon<sup>c</sup>, Louyse Gabrielli Lopes<sup>c</sup>, Patrícia Rosa de Oliveira<sup>d</sup>, Maria Izabel Camargo Mathias<sup>d</sup>, Teresa Cristina Alves<sup>e</sup>, Waldomiro Barioni Júnior<sup>e</sup> Ana Carolina de Souza Chagas<sup>e\*</sup>**

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal-São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brazil

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3411 5675.

*E-mail address:* carolina.chagas@embrapa.br (A.C.S. Chagas).

#### **RESUMO**

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ocasiona prejuízos econômicos na bovinocultura e seu controle por meio de produtos convencionais enfrenta problemas de resistência aos carrapaticidas sintéticos. Além disso, há evidente preocupação com resíduos nos alimentos e ambiente. A homeopatia pode representar uma opção para a redução do uso indiscriminado de medicamentos veterinários e sua validação é de grande interesse principalmente nos sistemas de produção orgânicos. Dessa forma, o presente estudo avaliou medicamento homeopático no controle de infestações naturais pelo carrapato *R. (B.) microplus* em bovinos de leite. Fêmeas da raça Holandesa e Jersey x Holanda (n=24) foram distribuídas nos grupos controle e tratado (medicamento composto por bioterápico de *R. (B.) microplus* 30 CH + *Sulphur* 30 CH). A

formulação homeopática (5 mL) foi adicionada em 500 g de açúcar que, após homogeneizado, foi acrescentado a 30 kg de sal mineral. Esse preparo foi fornecido junto ao concentrado, sendo 2 kg/animal/dia. A ração do grupo controle foi submetida aos mesmos processos de mistura (sal e açúcar) e administração, porém, sem medicamento. Os grupos ficaram mantidos em piquetes separados durante o período experimental de 12 meses. Realizaram-se mensuração do peso vivo animal (PV), volume globular (VG) e contagens de fêmeas ingurgitadas no corpo dos animais. Temperatura, umidade e pluviosidade média foram registradas. Coletaram-se fêmeas ingurgitadas de cada grupo para comparação dos parâmetros reprodutivos *in vitro* e semi-ingurgitadas para avaliação morfo-histológica. Os resultados médios de PV, VG e n° de carrapatos não foram diferentes estatisticamente para os grupos controle e homeopatia: 616,5 kg e 618,6 kg, 27,9% e 27,3%, 12,19 e 13,58 carrapatos, respectivamente. Nas análises *in vitro*, as médias do peso das fêmeas (0,18 e 0,17 g), peso dos ovos (0,07 e 0,06 g), % de eclosão de larvas (70,1 e 76,6%) e índice de eficiência reprodutiva (54,3 e 60,6%), para os grupos controle e homeopatia, respectivamente, também não tiveram diferença estatística. Além disso, nenhuma alteração nos ovários foi observada em microscopia. Portanto, o medicamento homeopático avaliado não foi eficaz no controle de *R. (B.) microplus*, além de não interferir nos parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas. Talvez a inclusão de práticas agroecológicas propicie condições mais hábeis para que a homeopatia auxilie os animais no combate à doença.

*Palavras-chave:* carrapato, resíduos, resistência, homeopatia, bioterápico, produção orgânica.

## 1. Introdução

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem populações estabelecidas em todas as regiões intertropicais e é considerado um dos principais obstáculos para aumentar a lucratividade da pecuária (Higa et al., 2016), por ser parasita obrigatório de bovinos. Além de provocar danos diretos à produção devido à espoliação sanguínea, causa depreciação comercial do couro e transmite os hemoparasitas que causam a Tristeza Parasitária Bovina, doença que ocasiona elevada taxa de mortalidade entre os animais nos rebanhos (Guerrero et al., 2014). Somente no Brasil, *R. (B.) microplus* é responsável por perdas estimadas em 3,24 bilhões de dólares por ano (Grisi et al 2014).



A principal forma de controle se faz por meio do uso de carrapaticidas químicos convencionais (Kunz e Kemp, 1994; Barros e Pellegrin 2002). Entretanto, de acordo com Baron et al. (2015), os carrapatos adquiriram a capacidade de evadir os efeitos tóxicos dos acaricidas sintéticos, desenvolvendo diferentes mecanismos de resistência. Há décadas ocorrem relatos científicos do desenvolvimento da resistência de *R. (B.) microplus* frente aos carrapaticidas químicos. A resistência múltipla é um fenômeno alarmante, uma vez que não existe opção de moléculas com novo modo de ação disponível no mercado (Raynal et al., 2015; Klafke et al., 2017). Elevado número de propriedades rurais tem enfrentado esse problema de resistência e é evidente a necessidade de novas alternativas para auxiliar no combate dos ectoparasitas (Pazinato et al., 2014).

Cada vez mais ascende a busca por meios alternativos que possam substituir ou ao menos reduzir a utilização de produtos químicos, visando a sustentabilidade dos sistemas de produção. O acúmulo de pesticidas na cadeia alimentar e o conseqüente risco de exposição da população aos pesticidas, por meio do consumo de alimentos de origem animal, levantam graves riscos para a saúde pública. Dessa forma, a utilização de medicamentos veterinários sintéticos convencionais deve ser minimizada, com intuito de reduzir o risco de resíduos de drogas em produtos de origem animal (Braghieri et al., 2007; Bedi et al., 2015).

Em um cenário no qual ainda não existe estimativa de desenvolvimento de novos carrapaticidas em curto prazo, faz-se necessário determinar novas estratégias para retardar o desenvolvimento da resistência aos fármacos comercialmente disponíveis (Chagas, 2004; Klafke et al., 2017). Nesse sentido, a homeopatia pode ser uma alternativa, pois é um método terapêutico considerado seguro, em razão de suas formulações serem baseadas em plantas, animais ou minerais (Braghieri et al., 2007). Ela constitui uma perspectiva para os criadores de bovinos, auxiliando na redução do uso indiscriminado de medicamentos e, conseqüente, diminuindo a pressão de seleção de cepas de carrapatos resistentes, já que suas possibilidades de aplicação na medicina veterinária são grandes (Verdone, 2000; Veríssimo et al., 2016). Contudo, ainda há necessidade de esclarecimentos quanto a sua efetividade.

Sistemas de pecuária orgânica têm como prioridade a busca por métodos fitoterápicos e homeopáticos para o controle de parasitas (Osterroht et al., 2002), entretanto, há carência de produtos e tecnologias que possibilitem a expansão dessa atividade de produção. Por esse motivo, a avaliação de produtos homeopáticos de uso em fazendas orgânicas certificadas é de grande interesse para a elucidação de sua efetividade, possível validação e transferência de

tecnologia. Por ser alvo de questionamentos e ter resultados de pesquisas controversos, mais investigações acerca da homeopatia devem ser realizadas para o respaldo científico de sua eficácia. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar um medicamento homeopático de uso em fazenda de produção de leite orgânico, a fim de verificar sua eficácia no controle de infestações naturais por *R. (B.) microplus*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Local e animais experimentais**

O experimento foi realizado no Sistema de Produção de Leite – CPPSE, município de São Carlos, São Paulo, e teve duração de 12 meses. Foram utilizados dois piquetes (ambos com  $\pm$  3,0 hectares) formados por *Brachiaria* spp. e *Cynodon* spp. (coast-cross), com descanso inicial de aproximadamente 30 dias. Os animais dos dois grupos avaliados foram manejados em sistema de pastejo contínuo. Foram utilizadas fêmeas bovinas (n=24) não lactantes e mestiças (raças: Holandesa e Jersey x Holanda), com idade média de cinco anos, sem tratamento químico há pelo menos 90 dias antes do início do experimento. Este ensaio foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa – Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste (CPPSE), protocolo 02/2014.

### **2.2. Formulação Homeopática**

Composta por bioterápico (produzida a partir do próprio carapato) de *R. (B.) microplus* 30 CH (centesimal Hahnemanniana) e *Sulphur* 30 CH, a formulação utilizada neste experimento foi elaborada pela farmácia de manipulação seguindo técnicas preconizadas pela Farmacopeia Homeopática Brasileira (2011). Para a escolha da medicação, ocorreu visita prévia de médico veterinário especialista em homeopatia no sistema de produção da Embrapa Pecuária Sudeste, para conhecimento do rebanho e das condições de manejo dos animais.

### **2.3. Fornecimento do medicamento homeopático**

Foram adicionados 5 mL da formulação homeopática em 500 g de açúcar, que foi homogeneizado e armazenado. Posteriormente, esse preparo era acrescentado a 30 kg de sal mineral (utilizado como veículo) e misturado ao concentrado para ser fornecido aos animais. O grupo tratado com homeopatia recebeu a ração composta por: 80% de milho, 15% de soja, 4,92% de sal mineral e 0,08% de açúcar associado à homeopatia, 2 kg/animal/dia. Para o grupo controle, realizou-se os procedimentos de mistura (açúcar/sal/ração) na mesma proporção. O fornecimento das rações de ambos os grupos era realizado diariamente na parte da manhã.

### **2.4. Avaliação da homeopatia a campo**

Para a randomização dos grupos, foram realizadas três contagens prévias de carrapatos em 24 animais (Agosto/2015). Esses foram inspecionados no seu lado esquerdo, individualmente, para quantificação das fêmeas ingurgitadas acima de 4,5 milímetros (Wharton e Utech, 1970). Os animais foram então distribuídos em dois grupos com número médio de carrapatos similar, pulverizados com Colosso<sup>®</sup> (a fim de zerar o número de carrapatos) e devidamente identificados com brincos numerados e colares coloridos como grupo controle e homeopatia. Os grupos foram mantidos a pasto, rotacionando em piquetes diferentes de Setembro/2015 a Agosto/2016, e submetidos a contagens semanais de fêmeas ingurgitadas (>4,5mm; lado esquerdo), fazendo-se estimativa do número encontrado por animal multiplicado por dois lados. Pretendeu-se avaliar a infestação natural de cada grupo, bem como a reinfestação da pastagem a longo prazo. O peso vivo animal foi mensurado mensalmente e o volume globular verificado bimestralmente. O hemograma foi realizado colhendo-se de 1,5 a 3 mL de sangue por meio de punção da veia coccígea média ou mamária do lado esquerdo, em tubo com anticoagulante EDTA.

### **2.5. Avaliação do desempenho reprodutivo das fêmeas ingurgitadas**

De acordo com a disponibilidade, amostras de fêmeas ingurgitadas de cada grupo (>4,5 mm) foram coletadas manualmente dos animais, sempre no intervalo de 8:00 às 10:00h.

Após cada coleta, com o objetivo de comparar o parâmetro reprodutivo das fêmeas ingurgitadas, elas eram encaminhadas ao laboratório, selecionadas a partir da ausência de desconformidades morfológicas, higienizadas com água corrente e secas com papel absorvente. Mensurou-se o peso das fêmeas ingurgitadas de cada grupo e essas foram acondicionadas em placas de Petri, e mantidas em estufa ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$  e UR  $>80\%$ ) por 18 dias consecutivos para a ocorrência de ovipostura. Após esse período, mensurou-se o peso dos ovos e esses foram acondicionados em seringas adaptadas, mantidas novamente na estufa por mais 15 dias para eclosão das larvas. A eclosão de cada grupo foi verificada por meio de avaliação visual (Drummond et al., 1973), obtendo-se a taxa de eclodibilidade. Comparou-se os parâmetros: porcentagem de eclosão das larvas e índice de eficiência reprodutiva (REI), a partir das fórmulas preconizadas por Drummond et al. (1973), abaixo relacionadas:

$$\text{IO} = \frac{\text{massa dos ovos (g)}}{\text{biomassa das fêmeas (g)}}$$

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

$$\text{REI} = \frac{\text{massas dos ovos (g)} \times \% \text{ eclosão}}{\text{biomassa das fêmeas (g)}} \times 20.000^*$$

\*número estimado de ovos presentes em 1g de postura de *R. (B.) microplus*

## 2.6. Análises morfo-histológicas

A cada 90 dias fêmeas semi-ingurgitadas (n=25) de cada grupo foram submetidas a análises morfo-histológicas. Selecionou-se as que estavam no meio da fase de ingurgitamento, uma vez que as fêmeas ingurgitadas não são a melhor fase para avaliações citotóxicas. No final do processo de ingurgitamento muitos órgãos degeneram naturalmente, dificultando a avaliação. Dessa forma, as amostras foram coletadas manualmente, higienizadas, acondicionadas em recipientes bem aerados e identificados quanto ao grupo e, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia – Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro – SP, para estudos em fotomicroscópio e avaliação de possíveis alterações morfo-histológicas nos ovários.

As amostras foram então mantidas em refrigerador, a fim de que ocorresse anestesia a partir de choque térmico e foram dissecadas em solução tampão fosfato salina – PBS (NaCl

7,5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g/L). Os ovários foram removidos, fixados por 24 horas em paraformaldeído 4%, desidratados em etanol, embutidos em resina Leica por 24 h e transferidos para formas plásticas previamente preenchidas com resina Leica polimerizada. Após polimerização, todos os blocos foram seccionados em fatias de espessura de 3 µm e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas de vidro com os ovários foram examinadas em fotomicroscópio Motic BA300 (Oliveira et al., 2008).

## 2.7. Dados meteorológicos

Índices de precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar, temperatura, radiação solar e velocidade do vento, equivalentes aos 12 meses do período experimental, foram obtidos a partir da Estação Meteorológica da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos. A cidade está situada a 22° 01' Sul de latitude e 47° 54' Oeste de longitude, com altitude de 856 metros, em região de clima tropical de altitude com inverno seco (Classificação climática de Köppen).

## 2.8. Análises estatísticas

Teste *in vivo*: Os dados de peso vivo dos animais, volume globular e n° de carrapatos contados, tiveram delineamento inteiramente casualizado e foram submetidos à análise de variância PROC MIXED (SAS, 2002/2010), considerando-se os efeitos de grupo (H n=12 e C n=12), mês (1 a 12), interação grupo\*mês, em delineamento split-plot no tempo, tendo como medida repetida o mês. Para a comparação múltipla de médias, adotou-se a opção LSEMANS, utilizando-se Teste de Tukey com nível de significância de 5%. A variável n° de carrapatos sofreu transformação raiz quadrada de  $x+0,5$ . As variáveis ambientais de temperatura, umidade e precipitação foram analisadas através de estatística descritiva, ao longo dos meses (1 a 12).

Teste *in vitro*: os dados de peso das fêmeas, peso dos ovos, % de eclosão e índice de eficiência reprodutiva (REI) foram submetidos à análise de variância PROC GLM (SAS, 2002/2010), considerando no modelo os efeitos de grupo, estação e a interação grupo\*estação. Na comparação múltipla entre as médias, foi adotado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

### 3. Resultados

#### *Avaliação do tratamento homeopático a campo*

Apenas oito animais precisaram ser tratados com carrapaticida em meados de Julho/2016, já no final do experimento, sendo cinco pertencentes ao grupo homeopatia e três ao grupo controle. Utilizou-se Colosso<sup>®</sup> pulverização, respeitando-se o período de carência de 10 dias antes de considerar novas contagens ou coletas de carrapatos desses animais.

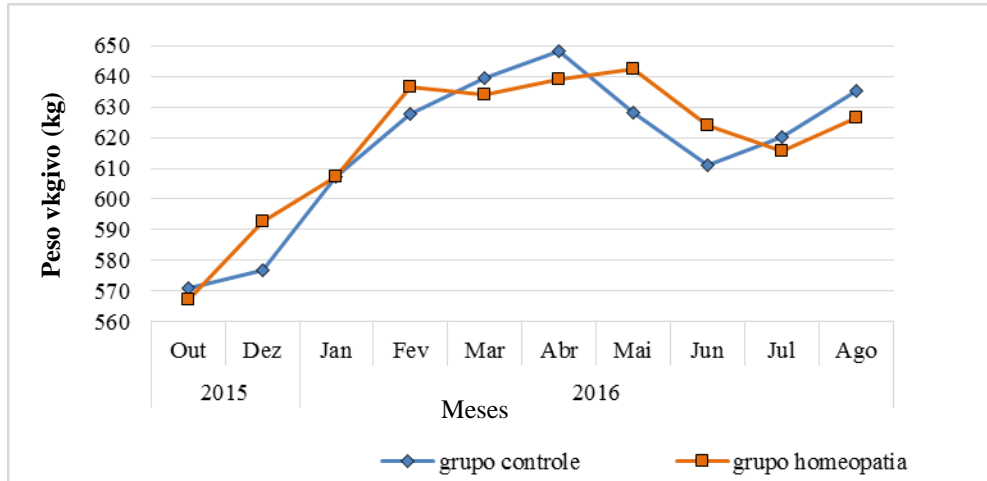
Comparando-se o grupo controle e o que recebeu o medicamento homeopático por 12 meses consecutivos, obtiveram-se valores similares e sem diferenças significativas (**Tabela 1**) para mensurações do peso vivo animal (PV), volume globular (VG) e número médio de carrapato (**Figuras 1, 2 e 3**).

**Tabela 1.** Médias do peso vivo (PV), volume globular (VG) e número de carrapatos das vacas leiteiras dos grupos controle e homeopatia (bioterápico de *R. (B.) microplus* 30 CH + *Sulphur* 30 CH) durante 12 meses na Embrapa Pecuária Sudeste.

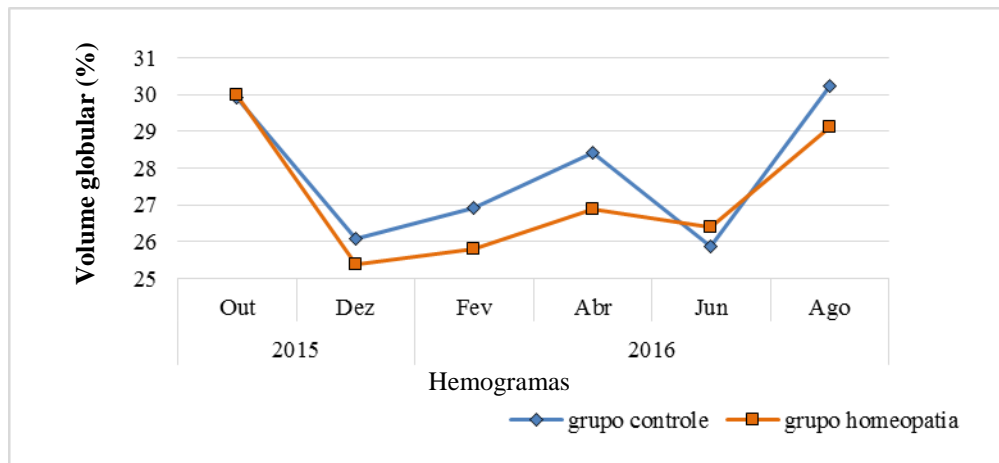
Mês	PV (kg)		VG (%)		n° carrapatos		
	C	H	C	H	C	H	
2015	Set	*	*			35,88±6,75	28,99±6,63
	Out	571,1±25,9	567,1±26,0	30±0,98	30±0,97	30,33±6,10	28,93±5,92
	Nov	*	*			4,31±1,98	9,51±1,91
	Dez	576,7±25,9	592,5±26,0	26±0,98	25±1,00	2,01±0,65	3,35±0,64
2016	Jan	607,5±25,9	607,2±26,0			3,64±1,65	9,43±1,60
	Fev	627,6±25,9	636,7±25,9	27±0,98	26±0,97	20,21±6,24	26,80±6,02
	Mar	639,4±25,9	634,1±25,9			16,13±3,86	20,71±3,79
	Abr	648,1±25,9	639,2±25,9	28±0,98	27±0,97	4,42±0,91	3,68±0,90
	Mai	628,2±25,9	642,3±25,9			10,48±1,77	8,84±1,74
	Jun	611,2±26,0	624,2±25,9	26±1,01	26±0,97	13,62±2,77	16,15±2,68
	Jul	620,2±26,0	615,8±25,9			4,06±1,09	3,97±1,07
	Ago	635,5±26,0	626,7±25,9	30±1,01	29±0,97	1,24±0,67	2,57±0,65
<b>Média Total</b>	<b>616,5±25,4</b>	<b>618,6±25,4</b>	<b>27,9±0,72</b>	<b>27,3±0,70</b>	<b>12,19±2,27</b>	<b>13,58±2,20</b>	

Não houve diferença significativa ( $p \leq 0.05$ )

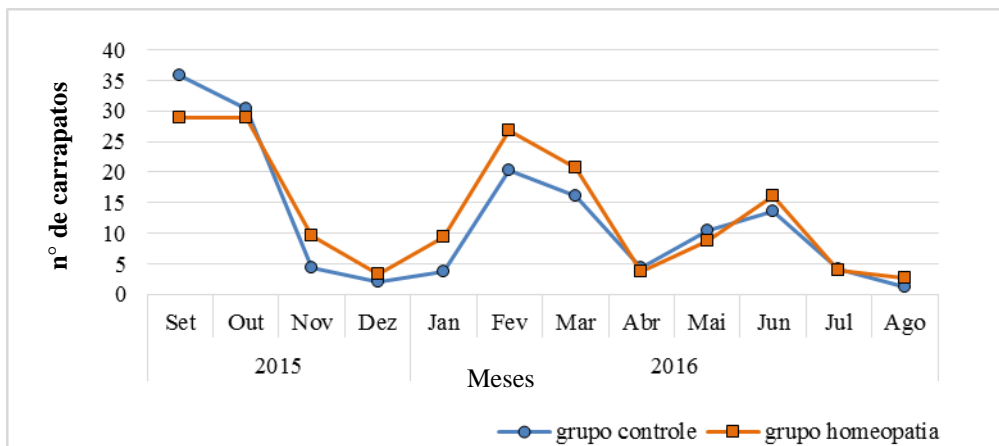
\*Valores não mensurados



**Fig. 1.** Médias do peso vivo dos animais, obtidas a partir da mensuração mensal, durante o período experimental de 12 meses.



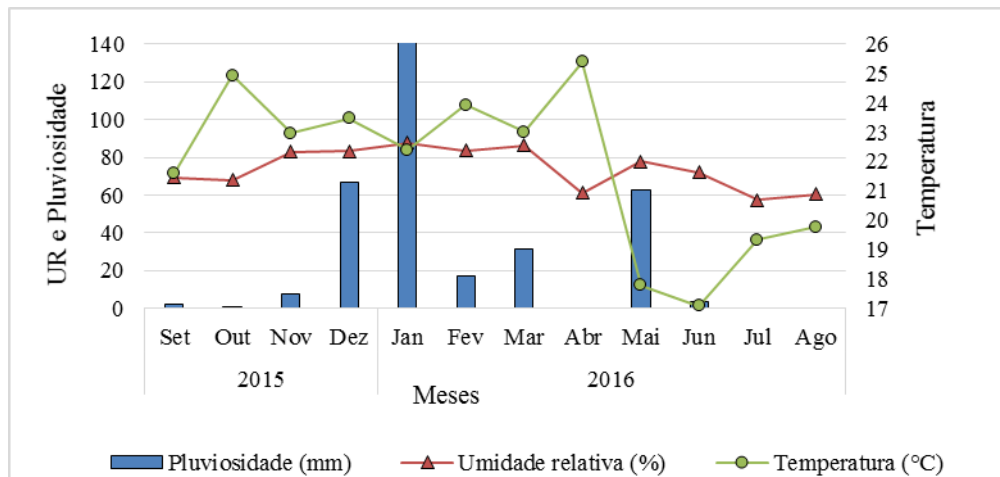
**Fig. 2.** Médias do volume globular, obtidas a partir dos hemogramas dos animais durante o período experimental de 12 meses.



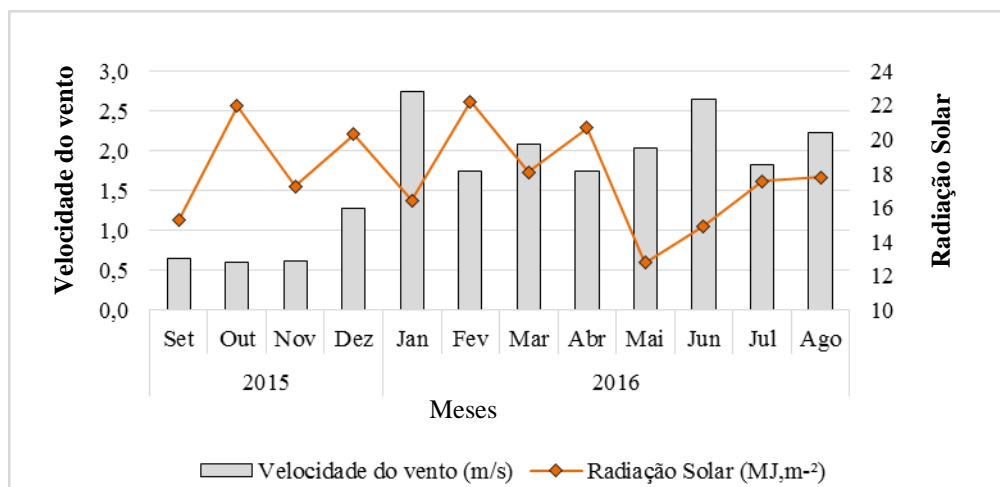
**Fig. 3.** Número médio de carrapatos, obtidos a partir das contagens no corpo dos animais, durante o período experimental de 12 meses.

### Dados Meteorológicos

Em relação às variáveis climáticas (índice de pluviosidade, temperatura e umidade relativa (UR), velocidade do vento e radiação solar), coletadas diariamente durante o período experimental de 12 meses, obtiveram-se resultados detalhados nas **Figuras 4 e 5**:



**Fig. 4.** Médias de temperatura, umidade e pluviosidade total, obtidas a partir do monitoramento meteorológico, durante o período experimental de 12 meses.



**Fig. 5.** Médias da velocidade do vento e intensidade de radiação solar, obtidas a partir do monitoramento meteorológico, durante o período experimental de 12 meses.

O índice de pluviosidade total (**Figura 4**) exibiu picos mais elevados nos meses Dez/2015 (66,6 mm), Jan/2016 (182,6 mm) e Mai/2016 (62,7 mm) (referente às estações verão/outono). Já nos meses Abril, Julho e Agosto de 2016, q não registrou-se chuva. Nos demais meses, Setembro/2015 (2,2 mm); Outubro/2015 (0,2 mm); Novembro/2015 (7,4 mm); Fevereiro/2016 (16,8 mm), Março/2016 (31,2 mm) e Junho/2016 (3,8 mm), registraram-se



menores índices de pluviosidade. As médias de temperatura (**Figura 4**), por sua vez, variaram: de  $\pm 21$  a  $\pm 23$  °C entre os meses Setembro e Novembro de 2015 (primavera), de  $\pm 23$  a  $\pm 24$  °C entre Dezembro de 2015 e Fevereiro de 2016 (verão), de  $\pm 17$  a  $\pm 23$  °C entre Março e Maio de 2016 (outono), e de  $\pm 17$  a  $\pm 19$  °C entre Junho e Agosto de 2016 (inverno). Já os dados referentes a umidade relativa (**Figura 4**) variaram: de  $\pm 69$  a  $\pm 83$  % entre os meses Setembro e Novembro de 2015 (primavera), mantiveram-se em  $\pm 83$  % entre Dezembro de 2015 e Fevereiro de 2016 (verão), variando de  $\pm 77$  a  $\pm 86$  % entre Março e Maio de 2016 (outono), e de  $\pm 60$  a  $\pm 72$  % entre Junho e Agosto de 2016 (inverno). Os dados médios da velocidade do vento (**Figura 5**) variaram: de 0,6 a 0,7 m/s entre os meses Setembro e Novembro de 2015 (primavera), de 1,3 a 1,8 m/s entre Dezembro de 2015 e Fevereiro de 2016 (verão), de 2 a 2,1 m/s entre Março e Maio de 2016 (outono), e de 2,2 a 2,7 m/s entre Junho e Agosto de 2016 (inverno). Os índices de radiação solar (**Figura 5**) variaram: de  $\pm 15$  a  $\pm 17$  MJ,m<sup>-2</sup> entre os meses Setembro e Novembro de 2015 (primavera), de  $\pm 20$  a  $\pm 22$  MJ,m<sup>-2</sup> entre Dezembro de 2015 e Fevereiro de 2016 (verão), de  $\pm 13$  a  $\pm 18$  MJ,m<sup>-2</sup> entre Março e Maio de 2016 (outono), e de  $\pm 15$  a  $\pm 17$  MJ,m<sup>-2</sup> entre Junho e Agosto de 2016 (inverno).

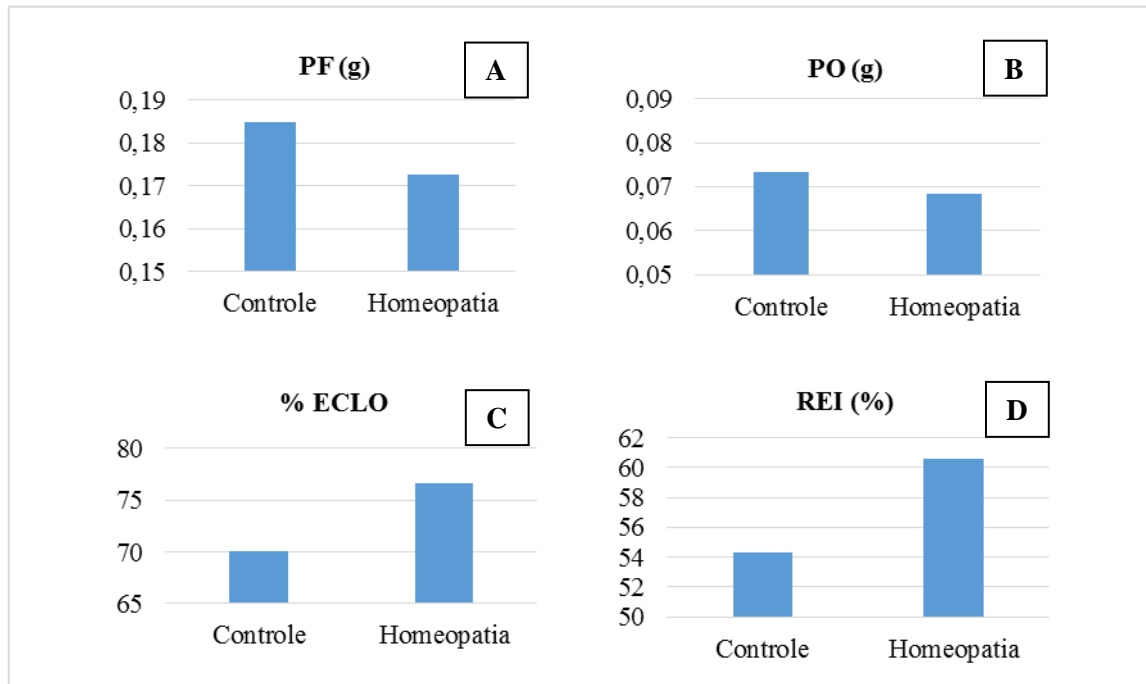
#### *Comparação do desempenho reprodutivo das fêmeas ingurgitadas*

A comparação *in vitro* do desempenho reprodutivo das fêmeas ingurgitadas, coletadas de ambos os grupos, e incubadas no laboratório, geraram os seguintes resultados médios, conforme **Tabela 2** e **Figura 6**.

**Tabela 2.** Médias dos pesos das fêmeas (PF), pesos dos ovos (PO), % de eclosão das larvas (ECLO) e índice de eficiência reprodutiva (REI), obtidas nas fêmeas ingurgitadas dos grupos controle (C) e homeopatia (H) durante as quatro estações do período experimental.

	Grupo	PRI	VER	OUT	INV	Média Total
PF (g)	C	0,21±0,01	0,20±0,02	0,19±0,02	0,14±0,02	<b>0,18</b>
	H	0,14±0,01	0,21±0,02	0,19±0,02	0,15±0,02	<b>0,17</b>
PO (g)	C	0,10±0,00	0,08±0,01	0,07±0,01	0,04±0,01	<b>0,07</b>
	H	0,06±0,01	0,09±0,01	0,07±0,01	0,05±0,01	<b>0,06</b>
ECLO (%)	C	92,43±4,91	84,07±8,51	62,15±9,91	41,86±8,51	<b>70,1</b>
	H	87,70±5,56	85,03±8,90	74,70±10,71	59,04±10,71	<b>76,6</b>
REI	C	90,4±5,67	65,31±9,83	42,68±11,44	18,99±9,83	<b>54,3</b>
	H	72,40±6,42	73,56±10,28	56,61±12,37	39,95±12,37	<b>60,6</b>

Não houve diferença significativa ( $p \leq 0.05$ )

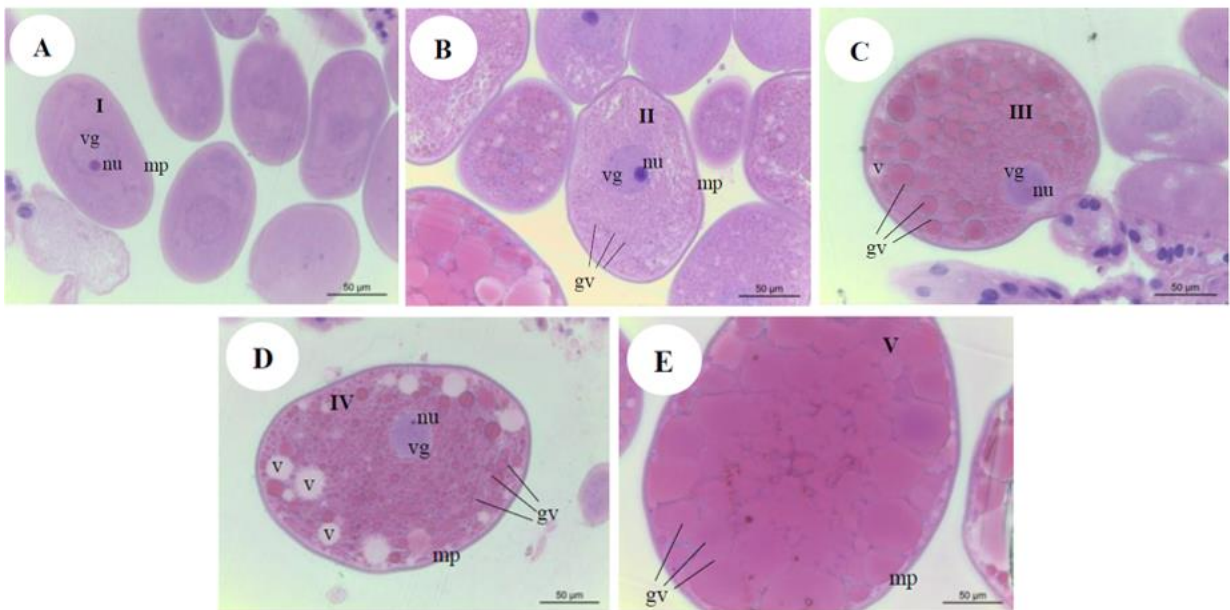


**Fig. 6.** Médias gerais de: **A)** peso das fêmeas ingurgitadas (PF); **B)** peso da ovipostura (PO); **C)** porcentagem de eclosão das larvas (% Eclo); **D)** índice de eficiência reprodutiva (REI) das fêmeas ingurgitadas, durante o período experimental de 12 meses.

#### *Avaliações morfo-histológicas*

Ainda que se tenha priorizado a avaliação do ovário, principal órgão de interesse para esse tipo de ensaio, no momento de dissecação incluiu-se a observação de outros órgãos como glândula salivar, intestino e tegumentos, a fim de detectar possíveis alterações, entretanto, nenhuma alteração foi detectada.

Ovário é um órgão constituído por uma parede de células epiteliais e pelos ovócitos (células germinativas), em cinco diferentes estádios de desenvolvimento (I a V), ligados à sua parede por meio de um pedicelo. Nessa espécie de carrapato, pequenos vacúolos entre os grânulos de vitelo podem ser observados nos ovócitos II, III, IV e V. Dessa forma, a partir das análises dos ovários, nenhuma alteração morfo-histológica das células germinativas femininas (ovócitos I, II, III, IV e V) foi observada. Ambos os grupos apresentaram as mesmas características, estando em conformidade com a fase avaliada do carrapato *R. (B.) microplus* (**Figura 7**).



**Fig. 7.** Secções histológicas de ovários de fêmeas semi-ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus* tratadas com medicamento homeopático (bioterápico 30 CH e *Sulphur* 30 CH), demonstrando que não houve alteração nos ovócitos (estágios de I a V) corados com hematoxilina-eosina (A-E). nu: nucléolo; vg: vesícula germinal; v: vacúolo; gv: grânulos de vitelo.

Conforme **Figura 7**, observaram-se: (A) ovócito I, elíptico, com vesícula germinal central (núcleo) apresentando nucléolo bem evidente, citoplasma homogêneo e sem presença de granulações, envolvidos por fina membrana plasmática; (B) ovócitos II, elípticos, com vesícula germinal central e fina e homogênea granulação citoplasmática; (C) ovócito III, arredondado, vesícula germinal ocupando o polo do ovócito voltado para o pedicelo e citoplasma repleto de grânulos de vitelo de diversos tamanhos, onde os grânulos menores ocupam a região central e os maiores, a periférica; (D) ovócito IV, arredondado, vesícula germinal raramente observada, mas ocupando o pólo do ovócito/pedicelo, citoplasma com muitos grânulos de vitelo (vários tamanhos distribuídos aleatoriamente), além do início da deposição do cório; (E) ovócito V, arredondado, vesícula germinal não mais observada e cório (membrana) espessa e totalmente depositada.

#### 4. Discussão

A redução do uso de carrapaticidas pode resultar na redução das despesas e perdas econômicas, incluindo a diminuição do risco de intoxicação dos animais e empregados, além do risco de resíduos no leite, carne e ambiente (Raynal et al., 2013). Seguindo esses preceitos,

o presente estudo teve a intenção de avaliar um medicamento homeopático (*Sulphur* 30 CH e bioterápico de carrapato 30 CH), sobre vacas naturalmente infestadas por *R. (B.) microplus*. As infestações evidenciadas nesse experimento podem estar associadas às raças bovinas Holandesa e Jersey, visto que são naturalmente suscetíveis ao carrapato bovino (Villares, 1941). Oito animais do grupo homeopatia (n=5) e do controle (n=3) precisaram ser tratados com medicamento alopático para controle dos carrapatos em Julho/2016, devido à infestação individual elevada, porém, o volume globular de todos os animais permaneceu dentro dos valores de referência para bovinos, de 24 a 46%, sem variação significativa entre os grupos (Feldman et al., 2000).

Valente et al. (2017) avaliaram um bioterápico na potência de 6 CH via oral, em bezerras da raça holandesa infestados artificialmente, e obtiveram eficácia média de 13,97% em 42 dias de tratamento, sendo 10,13% e 32,53% na primeira e última semana de tratamento, respectivamente. Entretanto, as contagens de carrapatos não diferiram significativamente entre os grupos avaliados ( $p < 0,05$ ). Da mesma maneira, o bioterápico 30 CH utilizado no presente estudo, resultou em contagens de carrapatos mais baixas, porém, apenas nos dois primeiros meses, não havendo diferença significativa entre os grupos. Equivalente a 30 diluições/dinamizações, 30 CH é considerado mais potente do que 6 CH e, apesar disso, não apresentou resultados satisfatórios para o controle do carrapato. Baixo impacto de tratamentos homeopáticos na infestação de carrapatos também foi observado em outros estudos. Costa-Júnior e Furlong (2011) avaliaram os medicamentos Fator C&MC<sup>®</sup> (0,01 g/animal/dia) e Enxofre-*Allium sativum*<sup>®</sup> (20 g/animal/dia administrados na ração) por cinco meses em bovinos leiteiros confinados, sob infestação artificial de *R. (B.) microplus*, e observaram eficácia de 26% e 64%, respectivamente.

Por outro lado, Müller e Fülber (2013) relataram que a utilização de *Sulphur* e *Staphysagria* promoveu elevada eficácia, ocasionando redução da espoliação sanguínea em três dias, deixando os carrapatos pálidos e flácidos, com cor alterada e facilmente derrubados por contato mecânico. Signoretti et al. (2013) também relataram que as fêmeas ingurgitadas provenientes de bezerras tratadas com Fatores Pró<sup>®</sup>, Estresse<sup>®</sup> e C&MC<sup>®</sup> (5 g/animal/dia adicionados em 4L de leite, além de concentrado à vontade) tiveram tamanho reduzido, coloração anormal, apresentando-se sem brilho e com estrias amareladas dorsalmente.

Gazim et al. (2010) observaram ao final do experimento diferenças significativas no parâmetro reprodutivo de fêmeas ingurgitadas, a partir de vacas holandesas tratadas com

bioterápico (12 CH por seis meses consecutivos e, em seguida, 30 CH em dias alternados até completar 28 meses) no sal mineral. As fêmeas ingurgitadas do grupo tratado com homeopatia apresentaram menores pesos e oviposturas, bem como redução de 50% na eclosão de larvas (30 a 95%) em relação às provenientes do grupo controle (85 a 95%). O grupo tratado com homeopatia também apresentou eficiência reprodutiva 22% mais baixa. Em contrapartida, a partir das avaliações *in vitro* desse mesmo parâmetro no presente estudo, observaram-se menor peso e postura do grupo homeopatia, porém, foi o grupo controle que apresentou menores porcentagens de eclosão de larvas e eficiência reprodutiva. No entanto, as diferenças supracitadas não foram estatisticamente significativas.

Em estudo a campo, Veríssimo et al. (1988) avaliaram bioterápico (6 CH) administrado na água de bezerros mestiços leiteiros por 36 dias, os quais foram submetidos a infestação artificial com 20.000 larvas de *R. (B.) microplus*. Observaram redução do número de carrapatos e evidenciaram menor perda de peso nos animais do grupo tratado. Da mesma forma, Signoretti et al. (2010) avaliaram o desempenho de 40 vacas mestiças, ¼ Gir x ¾ Holandês, que receberam os medicamentos homeopáticos: Fator Pró<sup>®</sup>, Estresse<sup>®</sup>, M&P<sup>®</sup> e C&MC<sup>®</sup>, 5 g/animal/dia no concentrado, por nove meses, e relataram não ter sido necessário tratamento alopático para controlar parasitas durante o período experimental. Também verificaram ganho de peso de 17,5% dos animais que receberam homeopatia. Esses achados divergem dos nossos resultados em dois pontos: ausência do uso de carrapaticida e ganho de peso decorrentes da homeopatia.

No presente estudo, cinco (41,6%) animais do grupo homeopatia tiveram de ser submetidos uma vez a tratamento com carrapaticida sintético, o que vai de encontro com o estudo de Signoretti et al. (2013), que precisaram tratar três (50%) de seis bezerras leiteiras (¾ Holandês x ¼ Gir), avaliadas com Fator Pró<sup>®</sup>, Estresse<sup>®</sup>, M&P<sup>®</sup> e C&MC<sup>®</sup>, 5 g/animal/dia no concentrado por 120 dias. Ao mesmo tempo, animais do grupo homeopatia deste estudo não tiveram ganho de peso consideráveis em relação ao controle ( $P > 0.05$ ). Pinheiro et al. (2009) avaliaram o Fator C&MC<sup>®</sup> fornecido a 24 novilhos (Nelores e ½ Red Angus x Nelore) no sal mineral, por 32 meses. Constataram menor PV ( $P < 0.05$ ) dos animais que receberam homeopatia, em relação àqueles que foram tratados com medicamento alopático. No presente estudo, apesar de não ter sido detectado diferença entre os PV dos grupos, pode-se inferir que, ao menos, a formulação homeopática não interferiu nesse parâmetro, visto que após simultâneo ganho de peso dos animais desde o início do experimento, a queda em Junho/2016

foi evidenciada para ambos os grupos. Isso ocorreu devido ao início do inverno, em que as condições das pastagens condizem com menor disponibilidade de matéria seca vegetal e menor valor nutricional das forrageiras (Labruna e Veríssimo, 2001).

Devido ao clima tropical e subtropical, o Brasil propicia características necessárias ao desenvolvimento de *R. (B.) microplus*, favorecendo sua distribuição por quase todo o país e durante praticamente o ano inteiro, possibilitando, em média, quatro gerações anuais (Pereira et al., 2008; Furlong et al., 2003). Entretanto, as variações entre os estádios dos carrapatos dependem das condições climáticas ambientais (Oliveira et al., 1974).

O clima possui impacto principalmente na sobrevivência dos estádios de vida livre nas pastagens (Estrada-Peña et al., 2006). No presente estudo, as contagens médias de carrapatos foram predominantemente mais altas na primavera (Setembro a Dezembro/2015), seguida pelo verão (Janeiro/Fevereiro/Março/2016), com queda no outono (Abril a Junho/2016) e menores no inverno (Julho a Agosto/2016). No inverno, as infestações tendem a diminuir devido às baixas temperaturas e menor umidade relativa do ar (UR), o que prejudica a fase de vida livre do carrapato (Veríssimo e Machado, 1995; Kasai et al. 2000). Segundo Davey et al. (1991), taxas de UR muito baixas podem resultar na dessecação e infertilidade dos ovos, interferir sobre eclosão das larvas ou ser um fator limitante na sobrevivência dessas, independente da temperatura. Os autores ainda afirmaram que a UR abaixo de 63% foi responsável por baixa eclosão e menor sobrevivência das larvas. Esses achados podem estar relacionados aos do presente estudo, pois nos meses de Abril, Julho e Agosto/2016, em que registraram-se as menores taxas de UR: 61%; 57% e 60%, respectivamente, as médias mensais de contagens de carrapatos foram as mais baixas, não ultrapassando 10 fêmeas ingurgitadas quando somados os valores dos dois grupos. Em todos os demais meses, entretanto, a UR manteve-se acima de 68% e maiores médias de contagens de carrapatos foram evidenciadas.

Os achados de Veríssimo et al. (1997), que avaliaram infestações naturais em São Paulo, corroboram com os resultados no presente estudo, uma vez que os autores também observaram, diminuição das infestações no inverno e aumento significativo na primavera. Esse aumento do parasitismo nas estações de temperaturas mais elevadas e diminuição da carga parasitária no inverno já foi reportado por outros autores (Souza et al., 1988; Fonseca et al., 1999; Kasai et al., 2000). Os resultados de Veríssimo et al. (1997), entretanto, divergem em relação ao pico das infestações, observada por eles no outono e no presente estudo

evidenciadas na primavera. Estas infestações acentuadas nos meses da primavera (Set/Out/Nov/15) podem estar associadas aos baixos índices de pluviosidade, visto que nos meses chuvosos, referentes ao verão e outono (Dez/15 a Fev/16 e Mar/16 a Mai/16, respectivamente), houve menores contagens de carrapato em relação à primavera. Com exceção do mês de Abril/2016, os índices de pluviosidade foram superiores a 15 mm no verão e outono. Isso está de acordo com Rawlins (1979), o qual assegurou que pluviosidade mensal acima de 15 mm tendem a manter baixa a densidade populacional dos carrapatos, devido ao deslocamento e dispersão das larvas promovidos pela chuva, dificultando seu reposicionamento ao local de espera pelo hospedeiro.

O vento também pode atuar na dispersão das larvas dos seus pontos estratégicos da folha, fazendo com que percam energia no processo de reposicionamento, diminuindo sua longevidade. De maneira a evitar o estresse da dessecação, as larvas tendem a se manter agrupadas, migrando no capim, para protegerem-se da ação direta dos raios solares e dos ventos (Wilkinson e Wilson, 1959; Furlong et al., 2002). Lewis (1968) afirma que ventos acima de 30,4 m/s têm capacidade de dispersar as larvas, carregando-as por longas distâncias. Por esse motivo, o presente estudo avaliou essa variável, bem como a radiação solar, as quais possivelmente não influenciaram a dessecação ou deslocamento das larvas, pois os índices médios de velocidade do vento aqui registrados foram inferiores a 2,7 m/s, e a radiação solar *versus* diminuição dos parasitas não pôde ser relacionada, uma vez que essas variações não mantiveram-se inversamente proporcionais durante todo o período experimental.

Algumas limitações deste estudo podem ter influenciado na ineficácia da homeopatia, como a ingestão incorreta da quantidade de ração contendo medicamento homeopático, pois essa era distribuída em cochos-trenó para todo o grupo. Sabe-se que quando vacas leiteiras são agrupadas, seu comportamento social se modifica, tornando-se mais sociais e formando hierarquias de dominância, especialmente nos cochos (Friend e Polan, 1974). Dessa forma, a ausência de canzís para separação dos animais e administração correta pode ter interferido na quantidade ingerida. Apesar dos animais terem ficado em piquetes diferentes, a ausência de distância entre os mesmos também pode ter interferido, uma vez que pode ter havido transição de infestações nas pastagens de ambos os piquetes. De acordo com Costa-Júnior e Furlong (2011), a bovinocultura orgânica implica em grandes modificações no manejo, normalmente acompanhadas por melhorias no tocante a alimentação. Dessa forma, não tem sido possível

dissociar os efeitos dos medicamentos homeopáticos de outros efeitos, como aqueles advindos das alterações no nível nutricional.

Ovários de fêmeas de carrapatos são sensíveis à ação de compostos químicos sintéticos e até mesmo naturais. Valente et al. (2017) demonstraram isso ao avaliarem bioterápico 6 CH sobre *R. (B.) microplus*, relatando efeitos nos ovários de fêmeas ingurgitadas, uma vez que houve desorganização na deposição do exocório de oócitos. No presente estudo, entretanto, não foram observadas alterações morfológicas ou histológicas das células germinativas femininas em ambos os grupos. As características encontradas estão de acordo com os achados do grupo controle de Oliveira et al. (2008), que ilustraram e descreveram as estruturas que compõem ovários de *Rhipicephalus sanguineus*. Os resultados revelaram que as fêmeas de *R. (B.) microplus* apresentam ovário constituído por ovócitos em cinco estádios de desenvolvimento, de acordo com Oliveira et al. (2005). A inexistência de alterações morfo-histológicas corrobora, portanto, com a ausência de efeito da medicação homeopática nos parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas incubadas.

Por outro lado, acredita-se que formulações homeopáticas não agem sobre sintomas isolados da doença (considerada expressão de um desequilíbrio), mas por meio de um processo de liberação de energia dinâmica que irá atuar de maneira geral no organismo, promovendo o retorno ao equilíbrio da energia vital e, conseqüentemente, ao estado de saúde (Hahnemann, 1995). Por conseguinte, o tratamento homeopático não apresenta propriedades diretamente curativas, mas propicia condições para o indivíduo ser capaz de combater condições adversas (Verdone, 2000).

Segundo Real (2008), a homeopatia atua de diferentes maneiras, de acordo com as principais necessidades de cada indivíduo do rebanho ou população tratada. Os níveis de atuação melhores elucidados são: estímulo das defesas do organismo, melhoria da produtividade e qualidade dos produtos finais, drenagem (eliminação de toxinas endógenas e exógenas) e interferência no *quorum sensing*. A terminologia *quorum sensing* foi primeiramente descrita por Fuqua et al. (1994) sendo definida como um fenômeno celular que descreve os mecanismos de comunicação célula-célula bacteriana, por meio de sinais químicos que, geralmente, coordenam a expressão gênica quando a população atinge elevada densidade celular (Williams et al., 2007). Desta forma, possivelmente, o tratamento homeopático atua sobre o *quorum sensing* de maneira a desarranjar o mecanismo de comunicação entre as bactérias, prejudicando essa estratégia de sobrevivência.



A eficiência da utilização de medicamentos homeopáticos em rebanhos foi verificada por Müller e Fülber (2013), que relataram redução acima de 90% nos gastos com medicamentos veterinários, melhorias no estado comportamental dos animais e aumento da qualidade do leite, porém, associada a práticas agroecológicas adotadas pelos pecuaristas, tais como: manejo de criação respeitando o bem-estar animal e sua qualidade de vida, instalações funcionais, confortáveis e com alto nível higiênico em todo o processo criatório (Lignon e Bottecchia, 2005).

De acordo com Verdone (2000), para um tratamento homeopático bem-sucedido é essencial que o ambiente permita ao animal estar em equilíbrio, proporcionando melhoria desses fatores ambientais. Dessa forma, talvez a inserção dessas práticas agroecológicas tivessem sido necessárias no processo de avaliação do medicamento homeopático, pois, de acordo com Lignon e Bottecchia (2005), ainda que a homeopatia possa ser eleita por propriedades convencionais, é necessário que seja empregado um trabalho em paralelo em agroecologia, como a redução de insumos artificiais, aumento ou manutenção da fertilidade do solo a partir recursos locais, introdução de outras criações e cultivo. Tais procedimentos otimizam a reciclagem de nutrientes e melhoram a atividade da cadeia trófica por meio do aumento da biodiversidade.

## **Conclusões**

A avaliação do bioterápico de *R. (B.) microplus* 30 CH + *Sulphur* 30 CH no controle de infestações naturais por *R. (B.) microplus* em bovinos de leite demonstrou que não houve eficácia ao longo dos 12 meses de estudo. Também não foi detectada diferença estatística dos parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas dos animais do grupo tratado com medicamento homeopático em relação aos do grupo controle. A infestação dos animais foi influenciada pelos parâmetros climáticos. Entretanto, tais conclusões não podem ser estendidas a outras formulações homeopáticas, vias de aplicação e condições de manejo, visto que há relatos na literatura comprovando sua eficácia em condições adversas às do presente estudo.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ter concedido bolsa de estudo e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Projeto 02.13.01.001.00-00, pelo financiamento dessa pesquisa. Também estendemos nossos agradecimentos ao médico veterinário especialista em homeopatia veterinária, Dr. Mário Ramos de Paula e Silva, pela consultoria e visitas técnicas realizadas na Embrapa Pecuária Sudeste.

## Referências

- Baron, S., Merwe, N.A., Madder, M., Maritz-Olivier, C., 2015. SNP Analysis Infers that Recombination Is Involved in the Evolution of Amitraz Resistance in *Rhipicephalus microplus*. PLoS One. 10, 1–20.
- Barros, A.T.M., Pellegrin, A.O., 2002. Manejo produtivo. In: Embrapa Pantanal (org). Sistema de produção de gado de corte no Pantanal. 01, 41–45. Disponível em: file:///E:/R%20B%20microplus/Barros%20e%20Pelegrin%202008%20EMBRAPA%20Livre016.pdf.
- Bedi, J.S., Gill, J.P.S., Aulakh, R.S., Kaur, P., 2015. Pesticide Residues in Bovine Milk in Punjab, India: Spatial Variation and Risk Assessment to Human Health. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 230–240.
- Braghieri, A., Pacelli, C., Verdone, M., Girolami, A., Napolitano, F., 2007. Effect of grazing and homeopathy on milk production and immunity of Merino derived ewes. Small Rumin. Res. 69, 95–102.
- Chagas, A.C.S., 2004. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13, 156–160.
- Costa-Júnior, L.M., Furlong, J., 2011. Efficiency of *sulphur* in garlic extract and non-*sulphur* homeopathy in the control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Med. Vet. Entomol. 25, 7–11.
- Davey, R.B., Cooksey, L.M., Despins, J.L., 1991. Survival of larvae of *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus*, and *Boophilus hybrids* (Acari: Ixodidae) in different temperature and humidity regimes in the laboratory. Vet. Parasitol. 40, 305–313.
- Drummond, R.O., Ernest, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests for insecticides. J. Econ. Entomol. 66, 130–133.
- Estrada-Peña, A., Corson, M., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Guglielmone, A., 2006. Changes in climate and habitat suitability for the cattle tick *Boophilus microplus* in its southern Neotropical distribution range. J. Vector. Ecol. 31, 158–167.
- Farmacopeia Homeopática Brasileira, 2011. 3a Ed. Brasília: Comissão da Farmacopeia Brasileira, 364p. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a\\_edicao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf)>.

- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, C.N., 2000. Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1344.
- Fonseca, A.H., Pereira, M.J.S., Fonseca, A.H., Leite, R.C., Mafra, C.L., 1999. Dinâmica populacional do carrapato *Boophilus microplus* em São Miguel do Anta – MG, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet. 21, 31–39.
- Friend, T.H., Polan, C.E., 1974. Social rank, feeding behavior, and free stall utilization by dairy cattle. J. Dairy Sci. 57, 1214–1224.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria – the LuxR–LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. 176, 269–275.
- Furlong, J., Chagas, A.C.S., Nascimento, C.B., 2002. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 39, 213–217.
- Furlong, J., Martins, J.R.S., Prata, M.C.A., 2003. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Comunicado Técnico. 36, 1–5.
- Gazim, Z.C., Ferreira, F.B.P., Silva, A.V., Boognese, K.C., Merlin, E., Messa, V., Jesus, R.A., Coutinho, C.A., Silva, L.C.M., 2010. Efficiency of tick biotherapeutic on the control of infestation by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Dutch dairy cows. J High Dilution Res. 9, 33, 156–164.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cañado, P.H.D., Perez de León, A.A., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol. 23, 150–156.
- Guerrero, F.D., Andreotti, R., Bendele, K.G., Cunha, R.C., Miller, R.J., Yeater, K., León, A.A.P., 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. Parasit. Vectors. 7, 1–12.
- Hahnemann, S. Organon da Arte de Curar, 2º Edição: tradução da 6º edição Alemã. São Paulo: GEHSP “Bernoit Mure”. 1995. 191 p.
- Higa, L.O.S., Garcia, M.V., Barros, J.C., Koller, W.W., Andreotti, R., 2016. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 25, 163–171.

- Kasai, N., Labruna, M.B., Pires, A.V., Louvandini, H., Abadalla, A.L., Genari, S.G., 2000. Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos leiteiros mantidos em manejo de pastejo rotativo de capim-elefante. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52, 453–458.
- Klafke, G., Webster, A., Agnol, B.D., Pradel, E., Silva, J., La Canal, L.H., Becker, M., Osório, M.F., Mansson, M., Barreto, R., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., Santos, J., Reck, J., Martins, J.R., 2017. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 73–80.
- Kunz, S.E., Kemp, D.H., 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Sci. Tech.* 13, 1249–1286.
- Labruna, M.B., Veríssimo, C.J., 2001. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. *Arq. Inst. Biol.* 68, 115–120.
- Lewis, I.J., 1968. Observations on the dispersal of larvae of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bull. Entomol. Res.* 59, 595–604.
- Lignon, G.B., Bottecchia, R.J., 2005. Criação de Animais sob Influência de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica. 15, 342–386. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/AgrobCap15ID-3h1GDfSOyV.pdf>. Acesso em: 19 de Janeiro de 2017.
- Müller, S.F., Fülber, V.M., 2013. A homeopatia na pecuária leiteira: da capacitação aos resultados práticos. *RBA.* 8, 1–5.
- Oliveira, G.P., Costa, R.P., Mello, R.P., Meneguelli, C.A., 1974. Estudo ecológico da fase não parasítica de *Boophilus microplus* no Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rur.* 4, 1–10.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., 2005. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 110, 46–156.
- Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2459–2465.

- Osterroht, M von. Witzler, L., Pimenta, S., Brum, C., 2002. “Passos para conversão à pecuária orgânica” e “Pecuária orgânica no Grupo Independência”. In: Agroecologia Hoje. Botucatu, SP: Agroecológica Eventos e Publicações. 2, 15–20.
- Pazinato, R., Klauck, V., Volpato, A., Tonin, A.A., Santos, R.C., Souza, M.E., Vaucher, R.A., Raffin, R., Gomes, P., Felippi, C.C., Stefani, L.M., Silva, A.S., 2014. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Exp. Appl. Acarol. 63, 77–83.
- Pereira, M.C. Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Klafke, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência, 1º Ed. São Paulo: MedVet. 2008. 174 p.
- Pinheiro, R.M.K., Silva, T.J.P., Viana, J.H.M., 2009. Influência do grupo genético, condição sexual e tratamento antiparasitário nas medidas de área de olho do lombo e espessura de gordura *in vivo* e na carcaça de bovinos de corte. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61, 676–681.
- Rawlins, S.C., 1979. Seasonal variation in the population density of larvae of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodoidea) in Jamaican pastures. Bull Entomol Res., 69, 87–91.
- Raynal, J.T., Silva, A.A.B., Sousa, T.J., Bahiense, T.C., Meyer, R., Portela, R.W., 2013. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. Rev. Bras. Parasitol. 22, 71–77.
- Raynal, J.T., Souza, B.C., Silva, A.B., Bahiense, T.C., Silva, H.C., Meyer, R., Portela, R.W., 2015. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas. Rev. Port. Ciênc. Vet. 110, 23–29.
- Real, C.M., 2008. Homeopatia populacional – Fundamentos Ruptura de um Paradigma. A Hora Veterinária, 28, 13–20.
- SAS Institute, 2002/2010. SAS/INSIGHT User’s Guide, versão 9.1.3, versão para Windows. Cary, NC, USA.
- Signoretti, R.D., Veríssimo, C.J., Souza, F.H.M., Oliveira, E.M., Dib, V., 2010. Aspectos produtivos e sanitários de vacas mestiças leiteiras tratadas com produtos homeopáticos. Arq. Inst. Biol. 77, 625–633.
- Signoretti, R.D., Veríssimo, C.J., Dib, V., Souza, F.H.M., Garcia, T.S., Oliveira, E.M., 2013. Desempenho e aspectos sanitários de bezerras leiteiras que receberam dieta com ou sem medicamentos homeopáticos. Arq. Inst. Biol. 80, 387–392.

- Souza, A.P., Gonzales, J.C., Ramos, C.I., Paloschi, C.G., Moraes, A.N., 1988. Variação sazonal de *Boophilus microplus* no Planalto Catarinense. *Pesq. Agropec. Bras.* 23, 627–30.
- Valente, P.P., Moreira, G.H.F.A., Serafini, M.F., Facury-Filho, E.J., Carvalho, A.U., Faraco, A.A.G., Castilho, R.O., Ribeiro, M.F.B., 2017. *In vivo* efficacy of a biotherapeutic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol. Res.* 1–10.
- Verdone, M., 2000. Omeopatia e produzioni zootecniche biologiche. Workshop Zootecnia Biologica ed Approccio Omeopatico, Milano, 23, maggio.
- Veríssimo, C.J., Machado, S.G., 1995. Fase de vida livre do ciclo evolutivo do carrapato *Boophilus microplus*. *Zootecnia.* 33, 41–53.
- Veríssimo, C.J., Silva, R.G., Oliveira, A.A.D., Ribeiro, W.R., Rocha, U.F., 1997. Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus*. *Bol. Ind. Anim.* 54, 2, 1–10.
- Veríssimo, C.J., 1988. Utilização do nosódio *Carrapatinum* em bovinos sensíveis ao carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). *Pesqui. Homeopática.* 5, 21–25.
- Veríssimo, C.J., Vasques, F., Duarte, K.M.R., Paulino, V.T., Ambrósio, L.A., 2016. Management and control of parasites on dairy farms in northwestern region of São Paulo state. *Vet. Parasitol.* 25, 306–316.
- Villares, J.B., 1941. Climatologia zootécnica III. Contribuição ao estudo da resistência e suscetibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. *Bol. Indústria. Anim.* 4, 60–79.
- Wharton, R.H., Utech, K.B.W., 1970. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. *J. Aust. Entomol. Soc.* 9, 171–82.
- Wilkinson, P.R., Wilson, J.T., 1959. Survival of cattle ticks in central Queensland pastures. *Aust. J. Agric. Res.* 10, 129–143.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Cámara, M., 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362, 1119–1134.

## CAPÍTULO 4 – ALTERNATIVE METHODS FOR EGG HATCH EVALUATION OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

### Alternative methods for egg hatch evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Amanda Figueiredo<sup>a</sup>, Isabela Cabeça Agnolon<sup>b</sup>, Louyse Gabrielli Lopes<sup>b</sup>, Rodrigo Giglioti<sup>a</sup>, Ana Carolina de Souza Chagas<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brazil

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3411 5675.

*E-mail address:* carolina.chagas@embrapa.br (A.C. S. Chagas).

#### ABSTRACT

Reproductive parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* are often evaluated in the laboratory because they are good indicators of tick resistance to commercial acaricides and of plant extracts' efficacy. The objective of this study was to compare the techniques of visual estimation and quantification by sampling used in the adult immersion test (AIT) to calculate the hatching rate of eggs laid by engorged females. Engorged females collected from cattle were subjected to the AIT with plant extracts and kept in an incubator ( $\pm 27$  °C; RH > 80%) to perform oviposition. Eggs were weighed, transferred to syringes and kept in the incubator for 15 days. The egg hatching was evaluated in 210 syringes by visual estimation (%). Then larvae were killed 50 °C and eggs and larvae were counted until 100, in three repetitions, with the help of a stereoscope. Significant differences were found between the two tests ( $p \leq 0.05$ ). The average visual estimate of egg hatching was higher than in the quantification by sampling, 56.8 to 48.0, respectively, with a correlation of 0.85. We found that the visual assessment leads to a higher estimate of larvae in relation to eggs because the infertile eggs can stay hidden in the center of the syringe. In quantification by sampling, no statistical differences ( $p = 0.99$ ) were observed in the pairwise counts between the three samples



(48.1±26.6%, 47.8±26.9%, 48.1±26.5%) and the correlation of repetitions was 0.96. This suggests that the count of one sample is sufficient and the result should not differ much, regardless of the evaluator. In the cutoff point of tick resistance status (95%), both methods are reliable. This study contributes to the improvement of the AIT, the only method available with engorged females. The information reported here can stimulate researchers to opt for more reliable techniques in the assessment of egg hatching.

*Keywords:* ticks, methods, adult immersion test, egg hatching, *in vitro*.

## 1. Introduction

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an ectoparasite considered of extreme importance in world livestock breeding because of the damage it causes. In addition to compromising the well-being of animals due to blood spoliation and disease transmission, it also causes reduction in productive performance in tropical and subtropical regions (Raynal et al., 2013). As a result, economic losses are high and aggravated by the transmission of agents of cattle tick fever. In Brazil, the losses are estimated at around \$3.24 billion per year from lower meat and milk production, hide damage and costs for purchase and application of acaricides (Grisi et al., 2014).

The development of resistance to major classes of acaricides widely used has been extensively reported (Raynal et al., 2013). Recently the first case was documented in Brazil of fluazuron resistance in *R. (B.) microplus*, the only active ingredient with no previous reports of resistance. The first tick population resistant to six classes of acaricides was also recently reported (Reck et al., 2014). The frequent and indiscriminate use of acaricides increases the presence of residues, which invariably can harm the environment as well as animal and human health (Schwarzenbach et al., 2010). So, the demand for organic food is increasing, improving expectations for growth in this sector (Gottschalk and Leistner, 2013).

According to Gaur et al. (2016), the Food and Agriculture Organization (FAO) and World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) have recommended and provided standardized protocols for bioassays to evaluate resistance, namely the larval packet test (LPT) and the adult immersion test (AIT), originally developed by Drummond et al. (1973). The larval immersion test (LIT) has also proved better at

discriminating between resistant and susceptible strains against macrocyclic lactones (Klafke et al., 2012).

In the AIT, engorged female ticks are immersed in technical or commercial grade acaricides and the assay is interpreted based on the rate of oviposition between females of two groups (treated and control). For decades the AIT also has been used as a tool for screening new active molecules present in plant extracts, including fractions, isolated and synthesized substances, with potential for tick control (Habeeb, 2010). Experiments carried out with plant extracts usually use a solvent and limits on concentrations were established for *R. (B.) microplus* in the AIT (Chagas et al., 2003). In this test, the percentage of egg hatching is estimated visually and applied in a formula for calculating the estimated reproduction (ER) of the engorged females, and consequently the efficacy of the substance evaluated. However, Amaral (1993) suggested that the visual assessment of egg hatching is subjective and can vary when carried out by different technicians. Thus, since hatching percentage is a parameter routinely used in the AIT, the purpose of this study was to compare the techniques of visual estimation and quantification by sampling for calculation of the hatching rate of eggs laid by engorged females incubated in the laboratory.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Adult immersion test (AIT)*

To reach egg hatching rates ranging between 0% and 100%, engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* were previously submitted to trials with essential oils from plants in different concentrations and controls (Chagas et al., 2016). Briefly, engorged females ( $\geq 4,5$  mm) were collected from naturally infested cattle at the experimental farm of Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE). According to a resistance test performed in 2016, the ticks from this herd are resistant to pyrethroids, organophosphates and amidines. Engorged females were divided into three groups of 10, weighed to establish uniformity among the different experimental groups, and placed in disposable cups to perform the immersion test with essential oils from plants in different concentrations. For each oil, seven dilutions were tested in triplicate: 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 and 0.39 mg/mL. Distilled water and 2% Tween 80 were used as control treatments, also in triplicate. The females were immersed in 5

mL of solutions for 5 min, dried and placed in Petri dishes in an incubator ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $\text{RH} \geq 80\%$ ) for oviposition. After 18 days, eggs were weighed and transferred to adapted transparent plastic syringes (10 mL), identified, and sealed with cotton. They were then placed back in the incubator under the same conditions for egg hatching. After 18 days, the hatching rate was evaluated in 210 syringes. The visual reading was performed by a single trained technician, while the quantification by sampling was done by three.

In the present study we were used the egg hatching rates of the concentrations from 25 to 1.56 mg/mL of *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Lippia alba*, *Lippia gracilis*, *Lippia organoides*, *Lippia sidoides*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita*, *Croton sakaquina* essential oils, and control groups evaluated by Chagas et al. (2016). We also included egg hatching rates of *Spilanthes acmella* and *Piper aduncum* essential oils (**Table 1**).

**Table 1.** Estimated egg hatching percentage (average of triplicate) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged females submitted to essential oils of 11 plant species at five concentrations (mg/mL) and controls (C1= distilled water, C2= distilled water with 2% Tween 80), by means of adult immersion test (AIT).

Plant species	Essential oil concentrations						
	C1	C2	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0
<i>Curcuma longa</i>	100.0	90.0	48.3	46.7	23.0	18.3	6.7
<i>Zingiber officinale</i>	95.0	90.0	73.3	70.0	73.3	48.3	32.7
<i>Lippia alba</i>	90.0	83.3	74.7	40.0	43.3	23.3	13.3
<i>Lippia gracilis</i>	86.7	70.0	90.0	72.5	75.0	70.0	41.7
<i>Lippia organoides</i>	96.7	90.0	70.5	73.3	73.7	73.3	3.3
<i>Lippia sidoides</i>	91.7	86.7	93.3	70.7	71.7	56.7	35.0
<i>Mentha arvensis</i>	93.3	74.7	45.0	50.0	43.3	16.7	14.0
<i>Mentha piperita</i>	91.7	86.7	83.3	75.0	70.0	70.7	42.0
<i>Spilanthes acmella</i>	100.0	83.3	45.7	43.3	20.3	3.7	5.3
<i>Piper aduncum</i>	100.0	70.0	41.7	36.7	16.7	6.7	8.3
<i>Croton sakaquina</i>	96.7	75.0	75.0	70.0	46.7	46.7	25.0

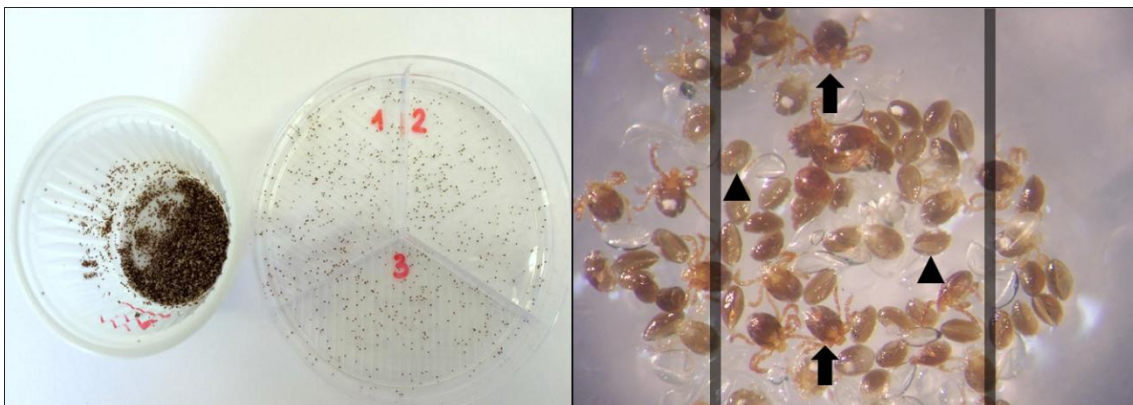
Data obtained from the study of Chagas et al. (2016)

## 2.2 Visual estimation

The egg hatching rate of each syringe was first evaluated by visual estimation, given as a percentage, by observing the proportion of larvae in relation to eggs not hatched. This was done by just one visual observation according to the technique described by Drummond et al. (1973). The trained technician had no knowledge about the treatment of the syringes, to avoid biased estimation.

## 2.3 Quantification by sampling

After the visual reading, the syringes containing larvae were kept in an oven, with controlled temperature (50° C, Solab SL-100) for 24 hours to kill them and allow the counting. The contents of each syringe (hatched larvae, egg shells and infertile eggs) were homogenized in a disposable cup using a spatula. Randomly collected samples were distributed in disposable Petri dishes (90x15 cm with three partitions) scratched at the base to facilitate the counting (**Fig. 1**). In this way, there were three counts (eggs or larvae) until 100, with the aid of a cell counter and a stereoscope (Coleman - 1.25 magnification) (Giglioti et al., 2011).



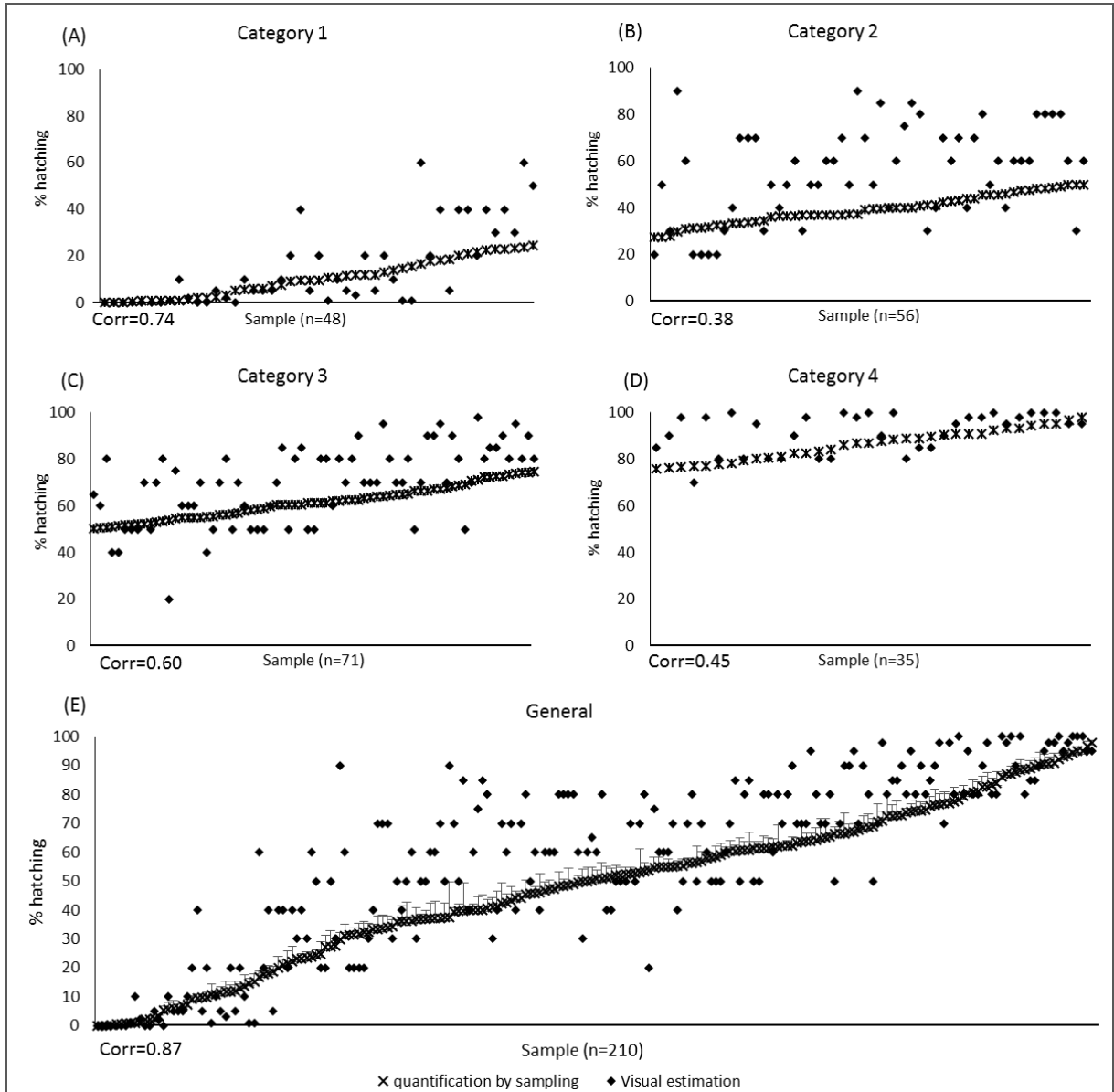
**Fig. 1.** The content of a syringe was homogenized and distributed in 3 areas of a disposable Petri dish (90 x 15 cm) to count larvae and infertile eggs under a stereoscope (Coleman-1.25 magnification). Black arrow: eggs, black arrowheads: larvae.

## 2.4 Statistical analysis

For statistical analysis, the average of the quantification by sampling (performed in triplicate) of 210 syringes was calculated, since the technique of visual estimation was performed in only one observation, according to the original method of Drummond et al. (1973). The averages of the quantification by sampling and visual estimation were categorized by scales of hatchability (1=0–25%, 2=26–50%, 3=51–75%, and 4=76–100%). Results were checked for normal distribution by PROC UNIVARIATE and for homogeneity of variances by Bartlett's test. Data were analyzed by the nonparametric model PROC NPAR1WAY. The averages of the scores between both techniques were compared by the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The general scores and by scale of both techniques were associated/correlated by the Pearson correlation coefficient. All statistical analyses were performed with the SAS packet (SAS, 2002/2010).

## 3. Results and discussion

The analysis demonstrated the data were not normally distributed and the variances were heterogeneous, so a nonparametric model for the analysis was used. The correlation analysis between the two techniques indicated high correlation (0.87), which was expected, since the same syringe was used for the two evaluations. The correlations between the two techniques separated by categories were significant ( $p \leq 0.05$ ) and were as follows: category 1: 0.74; 2: 0.38; 3: 0.60 and 4: 0.45 (**Fig. 2**). When associated by scales, there was a reduction in the value found in the general association between the two techniques. These findings show that the differences between the two techniques may be even greater, and can depend on the hatching rates of the larvae. The strongest correlation was found when the hatching rates were lower (category 1).



**Fig. 2.** Scattergram showing the correlation (Pearson  $r$ ) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* egg hatching between visual estimation and quantification by sampling, in each category (A: 1=0–25%, B: 2=26–50%, C: 3=51–75%, D: 4=76–100%) and in general (E: the standard deviation bars (grey bars) are related to the three counts in the quantification by sampling).

The differences found in correlation analyses can be explained by the use of the nonparametric statistical model. A statistically significant difference was found ( $p < 0.05$ ) between the two tests, indicating that the average of the visual estimate (56.8) was higher than the average of the quantification by sampling (48.0). This demonstrates that in visual estimation, the number of hatched larvae can be overestimated, since the larvae tend to adhere to the wall and the infertile eggs can stay hidden in the center of the syringe. Such findings are

in accordance with the discussion of Amaral (1993), who stated that the visual assessment is subjective.

In relation to the quantification by sampling technique, statistical difference was not verified ( $p = 0.99$ ) between the values obtained in the three-count sampling syringes. The correlation of repetitions was 0.96, demonstrating that the number obtained by one count repetition is very close to the others (averages of  $48.1 \pm 26.6\%$ ,  $47.8 \pm 26.9\%$ ,  $48.1 \pm 26.5\%$ ). So, it can be assumed that only one count is necessary, provided the material is well homogenized. These analyses also suggest that the result of a syringe should not differ much if several evaluations are performed by different analysts. Some authors who have performed AIT by quantification have used other egg hatching evaluation techniques. In the study of Terassani et al. (2012), all larvae from 10 engorged females (in triplicate) submitted to plant extracts were killed in sulfuric ether and counted under a stereoscope. Vasconcelos et al. (2014) reported that all the syringe contents were counted under a stereoscopic microscope. On the other hand, Barbosa et al. (2013) reported that when less than 50% of the larvae hatched, eggs and larvae were mixed in 4 mL of a 1:1 solution of aqueous ethanol at 96% and glycerin. Then larvae and eggs were counted in 1 mL of the solution. In the study of Lopez-Arias et al. (2014), the egg mass of each tick was weighed, and then 12 mg of eggs that were laid within the first 3–4 days from every tick were transferred into 5-mL sterile vacutainer tubes. Hatchability was based on the number of larvae emerging from 12 mg of eggs (it had been previously determined that 300 eggs weighed 12 mg). All larvae were removed from the tubes with distilled water, and then counted manually by immobilizing them with sticky tape. As can be noted, these researchers performed the quantification of all syringe contents or used some laborious process for larval count. However, our results show that a single sample of 100 larvae/eggs is reliable.

The results found here can have a serious impact on the AIT performed to detect resistance status of tick populations, because when the efficacy of a commercial acaricide is <95% by the AIT, this means tick resistance exists in the farm, requiring changing to a new chemical group. This evaluation criterion was established according to the guidelines of WAAVP (Holdsworth et al., 2006). However, when the results obtained in the quantification by sampling technique were split by category and compared, it was clear that in the extreme results, i.e., low hatching (0 – 25%) or high hatching (76 – 100%), there was no statistical difference (**Table 2**). So, at the cutoff point of tick resistance status (95%), both methods are

reliable, because it is necessary to have a low egg hatching (probably 0 – 25%) to reach a low estimated reproduction of the engorged females, and a good efficacy of the acaricide. Statistical difference was seen in the intermediate categories (26 – 50% and 51 – 75%) and the overestimation of egg hatching by the visual estimation in both categories can have an impact on the calculation of the resistance status.

**Table 2.** Averages of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* egg hatching evaluated by visual estimation (56.8%) and quantification by sampling (48.0%), organized by categories.

Category	Egg hatching	Visual estimation	Quantification by sampling
1	0 – 25%	14.8±17.3A	10.7±8.2A
2	26 – 50%	55.4±20.0B	39.2±6.4A
3	51 – 75%	69.2±16.5B	61.4±7.1A
4	76 – 100%	91.6±8.5A	86.2±6.6A
<b>General</b>	100%	56.8±30.6B	48.0±26.4A

\*Different upper-case letters in the same line indicate significant differences according to Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

## Conclusions

We can conclude that the quantification by sampling proved to be a more reliable technique in relation to visual estimation, which tends to overestimate the number of hatched larvae. At the extremes of egg hatching (0 – 25% or 76 – 100%), there was not statistical difference. In turn, for the cutoff point of tick resistance status, both methods are reliable. Therefore, in studies that require greater scientific accuracy, the count by sampling technique is recommended, leading to the same result by evaluating only one sample. We believe that this finding is of interest to other laboratories that perform the AIT routinely, because questions related to the reliability of visual estimation are relatively frequent, including by referees of peer reviewed journals.

## Acknowledgments

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarships granted and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Project 02.13.01.001.00-00, for funding this research.



## References

- Amaral, N.K., 1993. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2, 144–151.
- Barbosa, C.S., Borges, L.M.F., Nicácio, J., Alves, R.D., Miguita, C.H., Violante, I.M.P., Hamerski, L., Garcez, W.S., Garcez, F.R., 2013. In vitro activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 60, 421–430.
- Chagas, A.C.S., Leite, R.C., Furlong, J., Prates, H.T., Passos, W.M., 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciê. Rural* 33, 109–114.
- Chagas, A.C.S., Oliveira, M.C.S., Giglioti, R., Santana, R.C.M., Bizzo, H.R., Gama, P.E., Chaves, F.C.M., 2016. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 427–432.
- Drummond, R.O., Ernest, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests for insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66, 130–133.
- Gaur, R.S., Sangwan, A.K., Sangwan, N., Kumar, S., 2016. Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Hyalomma anatolicum* collected from Haryana and Rajasthan states of India. *Exp. Appl. Acarol.* 69, 487–500.
- Giglioti, R., Forim, M.R., Oliveira, H.N., Chagas, A.C.S., Ferrezini, J., Brito, L.G., Falcoski, T.O.R.S., Albuquerque, L.G., Oliveira, M.C.S., 2011. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 181, 309 – 315.
- Gottschalk, I., Leistner, T., 2013. Consumer reactions to the availability of organic food in discount supermarkets. *Int. J. Consum. Stud.* 37, 136–142.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., Perez de León, A.A., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23, 150–156.
- Habeeb, S.M., 2010. Ethno-veterinary and medical knowledge of crude plant extracts and its methods of application (traditional and modern) for tick control. *World Appl. Sci. J.* 9, 1047– 1054.

- Holdsworth, P.A., Kemp, D., Green, P., Peter, R.J., De Bruin, C., Jonsson, N.N., Letonja, N. N., Rehbein, S., Vercruyse, J., 2006. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Vet. Parasitol.* 136(1), 29-43.
- Klafke, G.M., Castro-Janer, E., Mendes, M.C., Namindome, A., Schumaker, T.T., 2012. Applicability of *in vitro* bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 184, 212–220.
- Lopez-Arias, A., Villar-Argaiz, D., Chaparro-Gutierrez, J.J., Miller, R.J., Leon, A.A.P., 2014. reduced efficacy of commercial acaricides against populations of resistant cattle tick *Rhipicephalus microplus* from two municipalities of Antioquia, Colombia. *Environ. Health Perspect.* 8, 71–80.
- Raynal, J.T., Silva, A.A.B., Sousa, T.J., Bahiense, T.C., Meyer, R., Portela, R.W., 2013. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. *Rev. Bras. Parasitol.* 22, 71–77.
- Reck, J., Klafke, G.M., Webster, A., Dall’Agnol, B., Scheffer, R., Souza, A.U., Coraqqssini, B.V., Vargas, R., dos Santos, S.J., Martins, J.R., 2014. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201, 128–136.
- SAS Institute, 2002/2010. SAS/INSIGHT User’s Guide, versão 9.1.3, versão para Windows. Cary, NC, USA.
- Schwarzenbach, R.P., Egli, P., Hofstetter, T.B., Gunten, U., Wehrli, B., 2010. Global water pollution and human health. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35, 109–136.
- Terassani, E., Santos, H.J., Silva, I.D., Cardoso, B.K., Souza, S.G.H., Gazim, Z.C., 2012. Efeito do extrato de *Azadirachta indica* em carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* 15, 197–200.
- Vasconcelos, V.O., Martins, M.A.D., Oliveira, N.J.F., Duarte, E.R., 2014. Effect of ethanolic extract of *Capsicum frutescens* L. on adult female of *Rhipicephalus microplus* (Ixodidae). *Parasitol. Res.* 113, 1389–1394.