

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

Paula Barroso Cruz

**Atividade acaricida do extrato metanólico de *Acmella oleracea* (L.)
R.K. Jansen (Asteraceae) e espilantol sobre *Rhipicephalus microplus*
(Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**

Juiz de Fora

2016

Paula Barroso Cruz

**Atividade acaricida do extrato metanólico de *Acmella oleracea* (L.)
R.K. Jansen (Asteraceae) e espilantol sobre *Rhipicephalus microplus*
(Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Erik Daemon

Juiz de Fora
2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cruz, Paula Barroso.

Atividade acaricida do extrato metanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae) e espilantol sobre *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) / Paula Barroso Cruz. -- 2016.

60 p.

Orientador: Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Coorientador: Erik Daemon

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2016.

1. Carrapatos dos bovinos. 2. Carrapato-da-orelha-do-cavalo. 3. Jambu. 4. Tempo letal. 5. N-alquilamida. I. Márcio de Oliveira Monteiro, Caio, orient. II. Daemon, Erik, coorient. III. Título.

Paula Barroso Cruz

**Atividade acaricida do extrato metanólico de *Acmella oleracea* (L.)
R.K. Jansen (Asteraceae) e espilantol sobre *Rhipicephalus microplus*
(Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 29 de julho de 2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes
Universidade Federal de Goiás, GO.

Profa. Dra. Mariana Guedes Camargo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

Dedico essa dissertação a minha família,
ao Roberto, e aos meus amigos.
Sem vocês nada disso seria possível.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas, por sempre guiar os meus passos;

Ao Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro em especial, não apenas por sua orientação, mas por todos os ensinamentos, profissionalismo, apoio, confiança e, principalmente, amizade. Por apoiar-me em cada momento, incentivando-me a quebrar as barreiras impostas tanto na área acadêmica quanto à assuntos inerentes a ela. Um exemplo a ser seguido como pessoa e profissional;

Ao co-orientador Prof. Dr. Erik Daemon por ter me recebido em sua equipe. Por todas as oportunidades oferecidas e da grande confiança depositada. Pela grande inspiração, como pesquisador e profissional permitindo que eu desenvolvesse este trabalho;

Aos amigos de Laboratório de Artrópodes Parasito (LAP), Mariana Oliveira, Cristiane Teixeira Franco, Camila Delmonte, Viviane Zeringota, Diego Melo, Ralph Maturano, Tatiane Novato, Tatiane Senra, Renata da Silva Matos, Bianca Silva Carvalho, Rafael Nascimento, Dionis Teixeira e Natália Muniz por todos os momentos de convivência, aprendizado e descontração;

À Camila Delmonte, amiga e parceira fundamental para a concretização deste estudo;

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho, e ao Doutorando Alan Barbosa por terem proposto essa parceria entre nossos laboratórios (UFRRJ e UFJF). Por permitirem a utilização dos compostos para realização dos bioensaios apresentados neste trabalho e por sempre estarem disponíveis para quaisquer esclarecimentos pertinentes.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri por todo apoio desprendido à confecção deste estudo, por estar sempre aberto em responder as dúvidas relacionadas a parte química e por permitir a utilização dos equipamentos do seu laboratório para a diluição do material.

Aos funcionários da Pós-Graduação, Marlú e Osmar, por toda a paciência e auxílio burocrático;

Aos meus pais, Maria Teresa Barroso Cruz e João Batista da Cruz, por seu amor incondicional, por me apoiarem em todas as minhas decisões e por acreditarem nos meus sonhos;

Ao meu irmão e melhor amigo, Victor Barroso Cruz, pelo companheirismo e amizade, por estar do meu lado em todas as horas;

Aos meus tios, Maria Amélia H. Barroso e José Américo Frade, e primos, Lara Barroso e Igor Barroso, pela acolhida, por acreditarem no meu potencial e torcerem pelo meu sucesso;

Ao Roberto, por todo amor, motivação, inspiração, paciência e incentivo. Essa conquista é nossa.

Aos meus amigos, que compreenderam minha ausência e nunca me abandonaram;
À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPQ e FAPERJ por viabilizarem nossos trabalhos.

E aos membros presentes na banca de qualificação e defesa, pela consideração e por suas contribuições visando o aprimoramento deste trabalho.

“Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar;
porque descobri, no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir”

Cora Coralina

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Resumo.....	12
Abstract.....	13
1 Introdução.....	14
2 Revisão de literatura.....	17
2.1 Importância de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Dermacentor nitens</i>	17
2.2 Controle.....	20
2.2.1 Controle com substâncias sintéticas.....	20
2.2.2 Controle com substâncias de origem vegetal.....	21
2.2.3 Outras formas de controle de carrapatos.....	22
2.3 <i>Acmella oleracea</i>	23
3 Material e métodos.....	27
3.1 Coleta e identificação da planta.....	27
3.2 Preparação do extrato metanólico e espilantol.....	27
3.3 Análises químicas.....	27
3.4 Diluição do material.....	28
3.5 Obtenção dos carrapatos.....	28
3.6 Teste de pacote de larvas.....	30
3.7 Teste de tempo letal sobre larvas.....	32
3.8 Teste de imersão de fêmeas.....	32
3.9 Análise dos dados.....	34
4 Resultados.....	35
5 Discussão.....	41
6 Conclusões gerais.....	45
7 Considerações finais.....	46
8 Referências.....	47
9 Anexo.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Dermacentor nitens</i>	36
Tabela 2 – Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Dermacentor nitens</i> expostas por diferentes períodos ao extrato metanólico de <i>Acmella oleracea</i> , na concentração de 12,5 mg/mL.....	37
Tabela 3 – Tempo letal 50% (TL ₅₀) de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Dermacentor nitens</i> tratadas com o extrato metanólico de <i>Acmella oleracea</i> na concentração de 12,5 mg/mL.....	38
Tabela 4 – Valores referente a média do peso das fêmeas antes da postura (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas e percentuais de eclosão larval e controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> , tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>Acmella oleracea</i>	39

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição mundial de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
Figura 2 – Distribuição de <i>Dermacentor nitens</i>	19
Figura 3 – <i>Acmella oleracea</i>	24
Figura 4 – Estrutura molecular do espilantol.....	24
Figura 5 – Diluição das substâncias.....	29
Figura 6 – Diluição do extrato metanólico de <i>Acmella oleracea</i> e teste de pacotes de larvas.....	31
Figura 7 – Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	33
Figura 8 – Cromatografia da fração diclorometano contendo espilantol. Espectro de massa do espilantol.....	35
Figura 9 – Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> . Observação eclosão das larvas.....	40

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade carrapaticida do extrato metanólico de *Acmella oleracea* e do espilantol sobre *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*. O extrato metanólico foi obtido através de maceração com metanol. Desse extrato, foi obtida uma fração diclorometano com 99% de espilantol (que pode ser considerado um composto puro), que também foi testada sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e larvas de *D. nitens*. Para a avaliação da atividade sobre larvas, foi utilizado o teste de pacote de larvas modificados e o extrato metanólico e a fração diclorometano (99% de espilantol) foram testadas em concentrações de 0,2 a 50,0 mg/mL. No teste de tempo letal, também foi utilizado a técnica de pacote de larvas, o extrato metanólico foi usado na concentração de 12,5 mg/mL e a avaliação do percentual de mortalidade foi feita após 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 minutos e 24 horas. Nesse teste foi feito o cálculo de tempo letal 50% (TL₅₀). O teste com fêmeas ingurgitadas foi feito apenas com *R. microplus*, sendo testadas concentrações de 25 a 200 mg/mL do extrato metanólico e concentrações entre 2,5 a 20,0 mg/mL para o espilantol. O extrato metanólico ocasionou mortalidade de 100% das larvas de *R. microplus* e *D. nitens* a partir de concentrações de 3,1 e 12,5 mg/mL, respectivamente. O espilantol resultou em mortalidade de 100% para larvas de *R. microplus* a partir da concentração 1,6 mg/mL e de 12,5 mg/mL para *D. nitens*. No experimento de tempo letal, a mortalidade foi de 100% para larvas de *R. microplus* e *D. nitens* após 120 minutos e 24 horas, com TL₅₀ de 38 e 57 minutos. No teste com fêmeas, o peso da massa de ovos e percentagem de eclosão dos grupos tratados com concentrações iguais e/ou superiores a 50,0 mg/mL do extrato metanólico apresentaram redução significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle, enquanto o espilantol provocou redução significativa do peso da massa de ovos e percentagem de eclosão em concentrações de 10,0 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente. As fêmeas tratadas com 200,0 mg/mL do extrato morreram antes de iniciar o processo de oviposição, resultando em eficácia de 100%, enquanto a melhor eficácia para espilantol foi de 92,9% na concentração de 20,0 mg/mL. Portanto, é possível concluir que o extrato metanólico da *A. oleracea* e o espilantol apresentam atividade acaricida sobre *R. microplus* e *D. nitens*.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, Carrapato-da-orelha-do-cavalo, Jambu, Tempo letal, *N*-alquilamida.

ABSTRACT

We evaluate the acaricidal activity of *Acmella oleracea* methanol extract and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens*. The methanol extract was made through maceration with methanol. From this extract, a dichloromethane fraction with approximately 100% spilanthol was obtained and tested on *R. microplus* larvae and engorged females and *D. nitens* larvae. For evaluation against larvae, modified larvae test packages were used, and both methanol extract and the dichloromethane fraction were tested at concentrations of 0.2 to 50.0 mg/mL. The larvae package technique was also used in the lethal time (LT) test, with methanol extract at a concentration of 12.5 mg/mL and the mortality percentage assessment was made after 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 minutes and 24 hours. The lethal time calculation 50% (LT₅₀) was performed in this test. The engorged female test was done with *R. microplus* only, at concentrations of 25 to 200 mg/mL for methanol extract and 2.5 to 20.0 mg/mL for spilanthol. The methanol extract caused 100% mortality of the *R. microplus* and *D. nitens* larvae at concentrations from 3.1 and 12.5 mg/mL, respectively. Spilanthol resulted in 100% mortality for *R. microplus* larvae at concentration from 1.6 mg/mL and 12.5 for *D. nitens*. In the lethal time essay using the methanol extract, the mortality rate was 100% for *R. microplus* and *D. nitens* larvae after 120 minutes and 24 hours with LT₅₀ of 38 and 57 minutes. In the test of females, the egg mass weight and the hatching percentage of the groups treated with concentrations equal to and/or higher than 100.0 mg/mL of methanol extract showed significant differences ($p > 0.05$) while spilanthol causes significant reduction of the egg mass weight and hatching percentage at concentrations of 10.0 mg/mL and 2.5 mg/mL, respectively. Females treated with 200.0 mg/mL of extract died before starting the oviposition process, resulting in 100% effectiveness, while the best efficacy for spilanthol was 92.9% at concentration of 20.0 mg/mL. Thus we conclude that the methanol extract of *A. oleracea* and spilanthol present acaricide activity against *R. microplus* and *D. nitens*.

Keywords: cattle tick, tropical horse tick, jambu, lethal time, *N*-alkylamide.

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) é um carrapato da família Ixodidae, que apresenta ampla distribuição geográfica e possui os bovinos como hospedeiros preferenciais, sendo um grande entrave para pecuária bovina (GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA, 2008; MATIAS et al., 2013). No Brasil, estima-se que esse carrapato é responsável por prejuízos econômicos de cerca de 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2014) que decorrem da perda de sangue do animal, diminuição da produtividade, depreciação do couro, propensão a miíses, estresse, além de gastos com aquisição de equipamentos, medicamentos e mão de obra especializada para o tratamento dos animais (FURLONG et al., 2004; FURLONG et al., 2007; PEREIRA, 2008; AMARAL et al. 2011a, b). *R. microplus* também atua como vetor dos protozoários *Babesia bovis* (Babes, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), agentes patogênicos causadores da “Tristeza Parasitária Bovina” (LABRUNA & MACHADO, 2006; MATIAS et al., 2013).

Dermacentor nitens, Neumann, 1897 também é uma espécie da família Ixodidae, que se encontra distribuída desde o sul da Flórida e Texas até o norte da Argentina. Esse ixodídeo é um ectoparasito de equinos, sendo encontrado preferencialmente no pavilhão auricular, contudo, em grandes infestações também pode ser observado em outras regiões do animal (BORGES & LEITE, 1993, GUGLIELMONE et al., 2006). Algumas das consequências de infestações deste carrapato são espoliação sanguínea, stress, predisposição a miíase e infecções bacterianas secundárias, além de aturem como vetor dos protozoários *Babesia caballi*, Nuttall & Strickland 1910 e *Theileria equi* Laveran, 1901, agentes causadores da piroplasmose equina (GUGLIELMONE et al., 2006; LABRUNA & MACHADO 2006).

O uso de carrapaticidas ainda é o método predominante no controle de carrapatos e tem contribuído significativamente para esse fim; no entanto, o uso excessivo e sem critério levou à seleção de populações de *R. microplus* resistentes a quase todas as bases químicas atualmente utilizadas para seu controle (FURLONG et al., 2007; KLAFKE, 2008). Embora não se tenha ainda registro de populações de *D. nitens* resistentes, o desenvolvimento de novas alternativas torna-se importante para minimizar a utilização de produtos carrapaticidas convencionais, que podem ocasionar a intoxicação de animais e humanos e contaminação do ambiente (KOUL et al., 2008). A descoberta de novas moléculas com atividade sobre carrapatos também se faz importante uma vez que existem poucas bases químicas disponíveis para o controle destes artrópodes, e a indústria tem

destinado poucos esforços para o lançamento de novas bases carrapaticidas. Isso, devido ao custo necessário para o desenvolvimento de novas moléculas e a validade comercial do produto no mercado (KISS et al., 2012).

Em vista dos aspectos mencionados anteriormente, nos últimos anos tem crescido o número de pesquisas direcionadas a investigação da atividade de extratos vegetais sobre carrapatos (BORGES, 2011). A obtenção a partir de recursos renováveis, desenvolvimento mais lento de resistência pela presença de mais de um princípio ativo e degradação rápida, apresentando menos riscos para o ambiente são aspectos favoráveis para utilização desses compostos (BORGES, 2011; CATTO, 2013).

Conhecida popularmente como jambu, *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Astereaceae) (sinonímia - *Spilanthes acmella* e *Acmella ciliata*) é uma planta nativa da região Amazônica, ocorrendo também em outras regiões tropicais e subtropicais do planeta. Esse vegetal é usado como condimento em pratos típicos da região Norte do Brasil, além de ter aplicação na medicina popular para o tratamento de estomatites, resfriados e como analgésico e anestésico local (TORRES & CHAVEZ 2001; NASCIMENTO et al., 2013). *A. oleracea* apresenta propriedades químicas importantes que despertam o interesse da indústria farmacêutica, principalmente pela presença do espilantol, uma *N-alquilamida* geralmente abundante nas flores e folhas dessa espécie (RAMSEWAK, 1999).

Uma série de atividades biológicas do extrato de *A. oleracea* e do espilantol já foram documentadas na literatura, como atividade antibacteriana (RATNASOORIYA et al., 2004), antifúngica (SHARMA et al., 2012), antimalárica (PANDEY & AGRAWAL, 2009) e inseticida (RAMSEWAK et al., 1999; AMER & MEHLHORN, 2006). Também já foram conduzidas investigações sobre a atividade do extrato aquoso (CHUNGSAMARNYART, 1993), etanólico (CHUNGSAMARNYART, 1993), clorofórmico (VEERAMANI et al., 2014) e hexânico (CASTRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016) dessa planta sobre larvas e fêmeas de *R. microplus*. Contudo, apenas esse último apresentou atividade elevada, com eficácia superior a 90%. Tal fato evidencia que a atividade é altamente influenciada pelo tipo de solvente utilizado para obtenção do extrato. No estudo com a utilização do extrato hexânico conduzido por Castro et al. (2014), a atividade carrapaticida foi atribuída a presença do espilantol.

Até onde se sabe, ainda não foi reportado na literatura dados a respeito da atividade do extrato metanólico de *A. oleracea* e do espilantol puro sobre carrapatos. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade carrapaticida do

extrato metanólico de *A. oleracea* e do espilantol sobre larvas de *R. microplus* e *D. nitens*, além de investigar a atividade do extrato e espilantol sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância de *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*

Sanidade, nutrição e genética são os três pilares que sustentam a produção animal. Em relação a sanidade, o combate do parasitismo ganha enfoque, tanto por parte dos produtores rurais, como das indústrias farmacêuticas, que, por sua vez, tem investido cada vez menos em novas formulações no controle de parasitos (GEARY & THOMPSON, 2003).

Os carrapatos são ectoparasitos responsáveis por transmitir grande variedade de agentes infecciosos e patogênicos para animais e humanos sendo, portanto, importantes para a saúde pública e sanidade animal (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; ANDREOTTI, 2010). Além de atuar como vetores, estes ectoparasitos apresentam uma grande importância econômica; são considerados uma limitação para o sucesso produtivo do gado, através da redução no ganho de peso, queda na produção de leite e depreciação de pele e couro em até 20-30% (GRAF et al., 2004; GHOSH et al., 2007).

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) é um artrópode pertencente à família Ixodidae. O status taxonômico dessa espécie foi modificado ao longo dos anos. A espécie foi inicialmente descrita como *Haemaphysalis micropla* (Canestrini, 1888), alocada no gênero *Boophilus* (Curtice, 1891) no século XX e, por último, redefinida no gênero *Rhipicephalus* com o auxílio de ferramentas moleculares e estudos filogenéticos no início do século XXI (PEREIRA, 2008; LABRUNA et al., 2009).

Originário da Ásia, ele foi introduzido em regiões tropicais e subtropicais através da importação de gado. Apresenta ampla distribuição geográfica, abrangendo áreas como América do Sul, América Central, Ásia e África. Antigamente, acreditava-se que ele também ocorria na Austrália e em outros países da Oceania, contudo, pesquisas recentes revelaram que o carrapato que parasita bovinos nessa região é uma espécie diferente, denomina *Rhipicephalus australis* Fuller, 1899 (LABRUNA et al., 2009; ESTRADA-PEÑA et al., 2012) (Figura 1). *R. microplus* é conhecido por ter os bovinos como hospedeiros preferenciais, sendo um grande entrave para pecuária bovina, mas também pode parasitar outros hospedeiros como caprinos, ovinos, cervídeos e equinos (GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA, 2008; MATIAS et al., 2013).

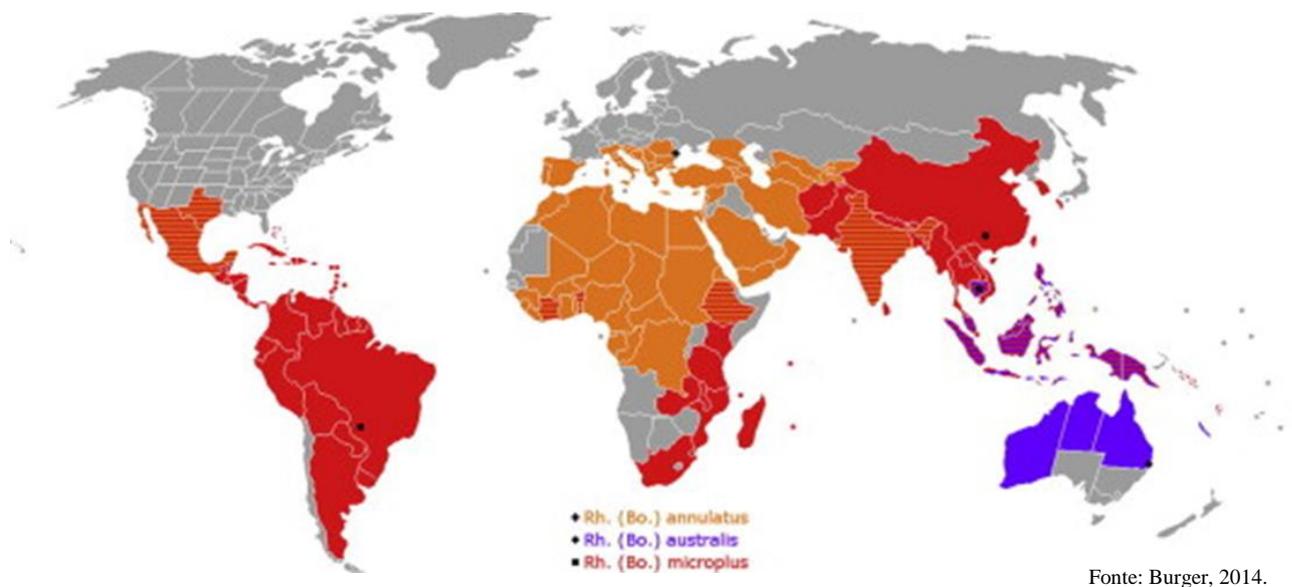


Figura 1 – Distribuição mundial de *Rhipicephalus microplus*

Seu ciclo biológico divide-se em duas fases, a fase parasitária e a não parasitária. A fase parasitária tem início com a fixação das larvas no hospedeiro e dura até a queda das fêmeas ingurgitadas e morte dos machos. Assim, esse carrapato apresenta ciclo monoxeno cujos estágios se completam em apenas um único hospedeiro, onde larvas, ninfas e adultos se desenvolvem. Essa fase tem duração em média de 18-22 dias. A fase não parasitária tem início com a queda das fêmeas no ambiente e compreende o período de postura e incubação dos ovos, até o momento em que as larvas após eclodirem, encontram um hospedeiro susceptível e iniciam o repasto sanguíneo (GUGLIELMONE et al., 2006).

R. microplus é responsável por grandes perdas à pecuária bovina, no Brasil seus prejuízos econômicos são mensurados em 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2014). Como danos diretos ao animal, destacam-se a espoliação sanguínea, predisposição a instalação de miíses, desvalorização do couro, estresse, diminuição na ingestão de alimentos, perda de ganho de peso e diminuição na produção de leite. Os danos indiretos estão relacionados à transmissão de patógenos causadores da Tristeza Parasitária Bovina, e perdas econômicas relacionadas a gastos com mão de obra, instalações e equipamentos para o tratamento dos animais (LABRUNA & MACHADO, 2006; FURLONG et al., 2007; PEREIRA, 2008; MATIAS et al., 2013).

D. nitens também possui no seu ciclo a fase parasitária e a fase não parasitária e assim como *R. microplus*, esta espécie também possui um ciclo monoxeno, ou seja, tem sua fase parasitária em um único hospedeiro, com duração de cerca de 28 dias (CUNHA et al. 2007).

2.2 Controle

2.2.1 Controle com substâncias sintéticas

O uso de carrapaticidas químicos é o principal meio para o controle dos carrapatos. Embora a utilização desses produtos tenha apresentado significativa contribuição para o controle de carrapatos, sabe-se que a sua utilização indiscriminada tem acarretado alguns problemas como o desenvolvimento de resistência a estes princípios ativos, além dos riscos de contaminação ambiental e intoxicação de animais e humanos (CHAGAS, 2004).

A resistência aos acaricidas sintéticos é um problema mundial, atuando progressivamente sobre os mais atuais grupos químicos disponíveis no mercado e sendo extensivamente documentada para o *R. microplus* (FAO, 2004; DAVEY et al., 2006; RECK et al., 2014). Na literatura, ainda não se há registro de resistência de *D. nitens* aos carrapaticidas sintéticos, contudo, até onde se sabe, não existem pesquisas com investigações nesse sentido. Provavelmente já existem populações resistentes no campo e tal fato ainda não foi documentado, por falta de investigações.

A indústria tem cada vez menos investido no desenvolvimento de novas moléculas carrapaticidas, devido aos custos envolvidos nesse processo e às preocupações sobre o curto período de validade comercial, até que populações de carrapato desenvolvam resistência (KISS et al., 2012). Estima-se que o custo de descoberta e desenvolvimento de um novo produto seja em torno de US\$ 100 milhões, com uma duração média de 10 anos (GRAF et al., 2004). O que a indústria tem feito é a associação de princípios ativos existentes buscando formulações que apresentem efeito sinérgico, fato nem sempre alcançado. Além disso, devido também a má utilização, já existe registros de populações resistentes a essas associações (FURLONG et al., 2007).

2.2.2 Controle com substâncias de origem vegetal

A composição química de vegetais é determinada pelas inúmeras reações químicas que compõem o seu metabolismo, e são classificados em primário e secundário (CHAGAS, 2004). Os metabólitos primários são substâncias essenciais à sobrevivência das células e desenvolvimento fisiológico, como as proteínas, lipídios, carboidratos e ácido nucléicos. Os metabólitos secundários não estão diretamente relacionados à conservação da vida da planta, mas garantem benefícios para a sua sobrevivência, atuando nas relações ecológicas dos vegetais com o seu entorno (SIMÕES et al., 2003). Os metabólitos secundários podem apresentar um papel ecológico como atrativo de polinizadores, defesa química contra insetos predadores, herbívoros, microorganismos e ainda são responsáveis por adaptações químicas ao estresse abiótico (LOPEZ-BUCIO et al., 2006).

Os produtos naturais obtidos a partir do metabolismo secundários de plantas são uma excelente alternativa para acaricidas sintéticos (KOUL et al., 2008). Eles apresentam uma grande variedade de atividades biológicas relacionados a toxicidade, repelência, efeitos reguladores de crescimento e alterações no comportamento alimentar do organismo alvo (HANIFAH et al., 2011).

Estudos com extratos de plantas têm ocorrido desde 1950 no intuito de avaliar suas atividades como potenciais acaricidas e inseticidas (KISS et al., 2012). Os extratos são preparações concentradas de partes de plantas obtidas por meio de um solvente apropriado, que é removido totalmente ou parcialmente por evaporação, e o resíduo é ajustado para padrões pré-determinados (KOUL et al., 2009). Há inúmeras metodologias apresentadas para a preparação de extratos vegetais com o intuito de isolar seus principais constituintes químicos. Para um estudo sistemático, o solvente mais indicado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois este solvente permite a extração de um maior número de compostos. Em seguida, este extrato deve ser submetido a processos com solventes de polaridades decrescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila visando isolamento de substâncias de acordo com a afinidade dos solventes (BEGNINI, 2001).

Diversos estudos têm sido realizados na comunidade científica com variadas estruturas de espécies vegetais para a investigação da sua eficácia no controle de carrapatos. Muitos trabalhos comprovam a ação de extratos e de outras substâncias de origem vegetal sobre diferentes espécies e estágios de carrapatos. A ação dessas

substâncias ocorre devido a morte desses artrópodes, redução da quantidade de ovos produzidos, redução da viabilidade dos ovos ou de maneira geral, uma associação desses três fatores (GOMES et al., 2012; LAGE et al., 2013).

Chagas et al. (2002) relataram a eficácia dos óleos essenciais *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus staigeriana*, com 100% de mortalidade de larvas de *R. microplus* a uma concentração de 10%. Pires et al. (2007) utilizando o extrato aquoso de *Simarouba versicolor* na concentração de 1,72%, observaram inibição de postura de 100% de fêmeas de *R. microplus*. Catto et al. (2009) também estudaram extratos da raiz de *S. versicolor* e verificaram percentual de atividade acaricida de 75% na concentração de 2,5% sobre fêmeas de *R. microplus*.

Estudos com extrato de acetado de etila de *Achyranthes aspera*, extrato metanólico de *Anisomeles malabarica*, extrato metanólico de *Gloriosa superba* sobre larvas de *R. microplus* resultaram em elevada eficácia no seu controle, com CL 90 de 1.130,18; 393.88,0 e 1.794,25 ppm, respectivamente. (ZAHIR et al., 2009).

Silva et al. (2009) constataram que o óleo essencial obtido a partir do extrato hexânico de *Piper aduncum* foi tóxico para as larvas de *R. microplus* na concentração de 0,1 mg/mL, induzindo 100% de mortalidade. Chagas et al. (2012) observaram que o extrato de *Piper tuberculatum* a 10% resultou em percentual de controle de 91,66% sobre fêmeas de *R. microplus*, atuando principalmente na viabilidade dos ovos, ocasionando baixos percentuais de eclosão. O mesmo foi observado para o extrato de *Cymbopogon martinii* na concentração de 5%, que ocasionou percentual de controle de 75,81% (Chagas et al., 2012). Estudos do extrato etanólico de *Guarea kunthiana* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* demonstraram eficácia de 99,08% na concentração de 0,2% (Benelli et al., 2016). O extrato não causou a morte das fêmeas ingurgitadas mas promoveu um atraso no início da postura e interferiu no índice de produção de ovos (BARBOSA et al. 2013).

O potencial acaricida destes produtos pode sofrer algumas variações decorrentes de fatores como o método de extração utilizado, a data da colheita, tipo de solvente utilizado na extração, concentração do extrato usada, fase da vida e espécie de carrapato (KISS et al., 2012).

2.2.3 Outras formas de controle de carrapatos

Outros métodos de controle têm sido demonstrados na literatura como alternativas para o controle de ectoparasitos, e a elaboração de um plano de controle integrado ganha

enfoque. Para tal, deve-se levar em conta certas variáveis como: seleção de animais resistentes aos carrapatos; cultivo de pastagens que dificultem a sobrevivência das fases de vida livre dos carrapatos; rotação de pastagens; controle biológico. É essencial que um controle integrado seja adequado a cada situação e adaptado de acordo com as mais variadas condições, principalmente climáticas e econômicas (BRIZUELA et al., 1996; GOMES, 1998).

Dentre esses, o controle biológico destaca-se como uma alternativa promissora. Samish & Rehacek (1999) descreveram uma série de agentes biológicos que podem atuar como predadores ou patógenos de carrapatos. Neste contexto, a utilização de fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos (FERNANDES & BITTENCOURT, 2008; BENJAMIN et al., 2002; GINDIN et al 2002) tem sido muito estudada nos últimos anos, ganhando ênfase pelos resultados alcançados em laboratório. Entretanto, são necessários estudos práticos a fim de viabilizar sua utilização no campo.

2.3 *Acmella oleracea*

Conhecida popularmente como jambu, *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae) (sinonímia - *Spilanthus acmella* e *Acmella ciliata*) é uma planta nativa da região Amazônia, mas especificamente no estado do Pará, que atualmente também é encontrada em diferentes países de regiões tropicais e subtropicais. Esse vegetal é usado como condimento em pratos típicos da região Norte do Brasil, como Tacacá, Pato no Tucupi, torta de Jambu, além de ser utilizada em pizzas e pastéis da região. O Jambu também é frequentemente empregado na medicina popular para o tratamento de estomatites, resfriados e como analgésico e anestésico local (TORRES & CHAVEZ, 2001; NASCIMENTO et al., 2013).

A planta cresce ao longo das margens do lago, tendo preferência por lugares úmidos e se propaga tanto por sementes como por hastes enraizadas. É uma planta herbácea anual, perene, de 20-40 cm de altura. A planta floresce durante todo o ano nos trópicos e durante o início do verão em regiões temperadas. Atualmente a planta é largamente cultivada na região Norte. (REVILLA, 2001) (Figura 3).

Estudos fitoquímicos revelam que a planta *A. oleracea* contém alquilamidas bioativas, cumarina, triterpenóides e compostos fenólicos. Dentre esses, o principal princípio ativo é uma *N*-alquilamida conhecida como espilantol

(PRACHAYASITTIKUL et al. 2009). *A. oleracea* também pode ser considerada uma boa fonte de ácidos graxos (PHRUTIVORAPONGKUL et al., 2008).



Fonte: Google

Figura 3 – *Acmella oleracea*

O espilantol é uma alquilamida abundante nos capítulos florais de *A. oleracea* (FAVORETO & GILBERT, 2010). Ele foi caracterizado como um óleo viscoso, ardente, de tonalidade amarela pálida a amarela clara (CAVALCANTI, 2008) (Figura 4).

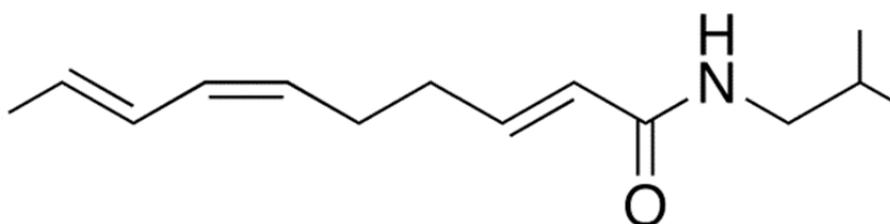


Figura 4 – Estrutura molecular do espilantol.

Fonte: Google

Uma série de atividades biológicas de *A. oleracea* e do espilantol já foram documentadas na literatura. Ratnasooriya et al. (2004) observaram que o extrato aquoso de *A. oleracea* apresentou efeito diurético em ratos nas concentrações de 500,0; 1000,0 e

1500,0 mg/Kg. Por sua vez, Chakraborty et al. (2004) verificaram atividade analgésica do extrato aquoso de *A. oleracea* nas concentrações de 100,0; 200,0; 400,0 mg/kg em ratos. O extrato também foi capaz de inibir predominantemente a dor periférica nesses animais, este mesmo efeito foi observado por WU et al. (2008) nas concentrações de 1,8; 3,6 mg/mL, sendo considerado um útil inibidor dos mediadores inflamatórios. Atividade antipirética foi observada por Chakraborty et al. (2010) usando as concentrações de 100,0; 200,0 e 400,0 mg/kg, sendo observado redução significativa na temperatura de ratos já na primeira hora.

Segundo Rani & Murty (2006), o extrato aquoso das flores de *A. oleracea* apresenta propriedades antifúngicas. Foram testadas concentrações de 0,1 a 2,0 mg/mL em quatro diferentes tipos de fungos, ambas as concentrações inibiram as espécies fúngicas em diferentes graus de sensibilidade. Sharma et al. (2012) também observaram atividade antifúngica dos extratos aquoso e alcoólico de *A. oleracea*.

Com relação a artrópodes, também já foram relatadas atividades inseticidas de extratos dessa planta. Pandey & Agrawal (2009) observaram atividade do extrato hexânico de *A. oleracea* contra mosquitos, com 100% de mortalidade na concentração de 6,25 e 3,125 ppm em larvas de *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, respectivamente.

Para carrapatos, a atividade de *A. oleracea* foi evidenciada apenas para *R. microplus*. Em estudo conduzido por Castro et al. (2014) a concentração de 1,6 mg/mL do extrato hexânico da planta ocasionou 93% de mortalidade em larvas desse ixodídeo. Para fêmeas ingurgitadas ocorreu uma redução significativa na postura de ovos nas concentrações acima de 100,0 mg/mL, a CL50 do extrato foi de 79,7 mg/mL. Esses autores atribuíram a atividade do extrato a presença do espilantol (14%). Em estudo com extrato etanólico a atividade acaricida foi baixa, com 36% de mortalidade de larvas de *R. microplus* (CHUNGSAMARNYART et al., 1991), enquanto com a utilização do extrato aquoso não foi obtida atividade acaricida (CHUNGSAMARNYART & JANSAWAN, 1993).

Saraf & Dixit (2002) isolaram o espilantol e o testaram sobre ovos, larvas e pupas de *Culex*, *Anopheles*, e em ambas foram observados uma mortalidade de 100% das larvas na concentração de 7,5 ppm após 24 horas. Ramsewak et al. (1999) verificaram alta atividade inseticida do espilantol sobre larvas de *Aedes aegypti* na concentração de 250,0 mg/mL. Kadir et al. (1989) avaliaram a atividade do espilantol sobre machos de

Periplaneta americana e observaram uma alta taxa de letalidade devido a sua ação tóxica no sistema nervoso destes insetos, com CL_{50} de 2,46 $\mu\text{g/g}$.

A maioria desses estudos visam a investigação de um potencial efeito inseticida e acaricida de produtos naturais, mas aguardam estudos mais profundos sobre o mecanismo de ação desses compostos no processo de controle dos artrópodes. Sabe-se que os carrapaticidas sintéticos atuam em alvos específicos do sistema nervoso (neutrotóxicos) ou no processo bioquímico de quitina (inibidores do desenvolvimento) (DEKEYSER, 2005).

Um estudo recente analisou os efeitos citotóxicos do extrato hexânico de *A. oleracea* sobre fêmeas de *R. microplus*, submetidas às concentrações de 12,5; 25,0 e 50,0 mg/mL e demonstrou a ação deste extrato por meio de alterações nas células germinativas nas fêmeas. Estas alterações levam a uma diminuição da capacidade de produção de ovos viáveis (OLIEIRA et al., 2016). Tal estudo sinaliza um possível mecanismo de ação do extrato hexânico de *A. oleracea*, evidenciando que os componentes do extrato ocasionam efeitos diretos sobre os ovócitos, sendo eficaz na redução do sucesso reprodutivo de *R. microplus*, o que apresenta grande relevância devido à redução no número de indivíduos da próxima geração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação da planta

Folhas, hastes e inflorescências foram coletadas em Igarapé-Açu, na região de Bragantina, Estado do Pará, Brasil (01°07'33"S e 47°37'27"O). Um exemplar da planta foi identificado como *Acmella oleracea* e depositado (MG205534) no herbário do Museu Emílio Goeldi, Cidade de Belém, Pará, Brasil.

3.2 Preparação do extrato metanólico e espilantol

Esses procedimentos foram feitos de acordo com Barbosa et al. (2014). O material vegetal coletado (folhas, hastes e inflorescências) foi seco com circulação em sala climatizada a 25 °C, triturado em moinho e em seguida submetido a processo de extração por maceração exaustiva com metanol (MeOH) em temperatura ambiente. O solvente foi destilado em um evaporador rotatório a 40°C, sob pressão reduzida. Para obtenção do espilantol, o extrato metanólico de *A. oleracea* foi solubilizado em MeOH/H₂O (8/2) e a solução foi submetida a extrações sucessivas em funil de decantação com o solvente hexano e posteriormente com diclorometano.

3.3 Análises químicas

O extrato metanólico de jambu foi analisado através de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) com ionização elétron spray (ESI⁺), usando um Q-ExactiveTM Orbitrap equipado com sistema aquecido (HESI), operando a 350°C, com gás nitrogênio, coluna Hypersil GOLD C18 (100 x 2.1 mm, 1.9 µm espessura da película) da Thermo Fisher Scientific (Rockville, MD, USA), mantida a 30°C. A curva de calibração foi obtida usando 0.050–5.0 µg/mL de espilantol (Chromadex, Irvine, CA). A fração obtida com diclorometano (espilantol) foi analisada por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM - Shimadzu QP-2010 Plus) equipado com VF-5ms, coluna capilar de sílica fundida (30 mm 0,25 mm x 0,25 µm) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C) em espectrômetro da Bruker (500 MHz), usando MEOD e CDCl₃ (99%, Sigma–Aldrich Inc., USA) como solventes.

3.4 Diluição do material

As amostras obtidas a partir dos métodos descritos anteriormente (extrato metanólico de *A. oleracea* e fração diclorometano) foram diluídas em etanol 50% + DMSO (dimetilsulfóxido) 1% (Figura 5), solventes também utilizados por Castro et al. (2014) para diluição do extrato hexânico de *A. oleracea*. O processo de diluição foi feito com a utilização de uma lavadora ultrassônica (UNIQUE – USC 1400) (Figura 6 - B). Para larvas de *R. microplus* o extrato metanólico de *A. oleracea* foi testado nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0 e 50,0 mg/mL, enquanto para o teste com fêmeas de *R. microplus*, foram utilizadas as concentrações de 25; 50; 100; 150 e 200 mg/mL. Para larvas de *D. nitens* foram testadas as concentrações de 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0 e 50,0 mg/mL do extrato metanólico de *A. oleracea*. No teste para determinar o tempo letal 50 (TL₅₀) sobre larvas, o extrato foi utilizado na concentração de 12,5 mg/mL. Em larvas, o espilantol foi testado em concentrações de 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0 e 50,0 mg/mL para *R. microplus* e nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0 e 50,0 mg/mL para *D. nitens*, e para fêmeas de *R. microplus* foram testadas as concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mg/mL.

3.5 Obtenção dos carrapatos

Para a realização dos experimentos foram utilizadas larvas e fêmeas de *R. microplus* proveniente da cepa sensível Porto Alegre (POA), uma cepa de referência, sensível a carrapaticidas, mantida através de infestações artificiais em bezerros alocados em baias da Fazenda José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de coronel Pacheco, Minas Gerais (Procedimento registrado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa CEUA 11/2013). As larvas de *D. nitens* foram obtidas a partir da postura de fêmeas ingurgitadas coletadas de equinos naturalmente infestados, sem contato recente com acaricidas, no município de São João Nepomuceno, Minas Gerais. Foram utilizadas larvas com idades entre 15 a 21 dias após eclosão e fêmeas recém-desprendidas dos animais.



Figura 5 – Diluição das substâncias. A: Extrato metanólico de *Acmella oleracea*. B: Extrato metanólico de *Acmella oleracea* diluído com o solvente. C: Diferentes concentrações do extrato metanólico de *Acmella oleracea*. D: Fração diclorometano. E: Fração diclorometano diluída com o solvente. F: Diferentes concentrações da fração diclorometano.

3.6 Teste de Pacote de larvas

Para a realização dessa etapa, foi utilizado o teste de pacote de larvas proposto por Stone & Haydoc (1962) e adaptado por Monteiro et al. (2012). Nesse método, aproximadamente 100 larvas não ingurgitadas foram colocadas no centro de papel de filtro com dimensões 6 cm x 6 cm, e em seguida, esse papel foi dobrado ao meio e fechado nas laterais com cliques binder. Posteriormente, cada lado do papel filtro foi umedecido com 90 µL, totalizando 180 µL, das soluções testadas de acordo com o tratamento (concentrações: 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25 e 50 mg/mL) (Figura 6 – C, D, E e G). Também foi formado um grupo controle tratado com o solvente (etanol 50% + DMSO 1%) e para cada tratamento, foram feitas 10 repetições.

Após essa etapa, os envelopes contendo os carrapatos foram condicionados em câmara climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $80\pm 10\%$ por 24 horas. Passado este período, foi feita a contagem do número de larvas vivas e mortas (Figura 6 – H, F e I). A porcentagem de mortalidade de cada pacote foi obtida através da seguinte fórmula: $(\text{N}^{\circ} \text{ de larvas mortas}) / (\text{N total de larvas}) \times 100$. Em seguida foi feito o cálculo da média do percentual de mortalidade obtido em cada tratamento.

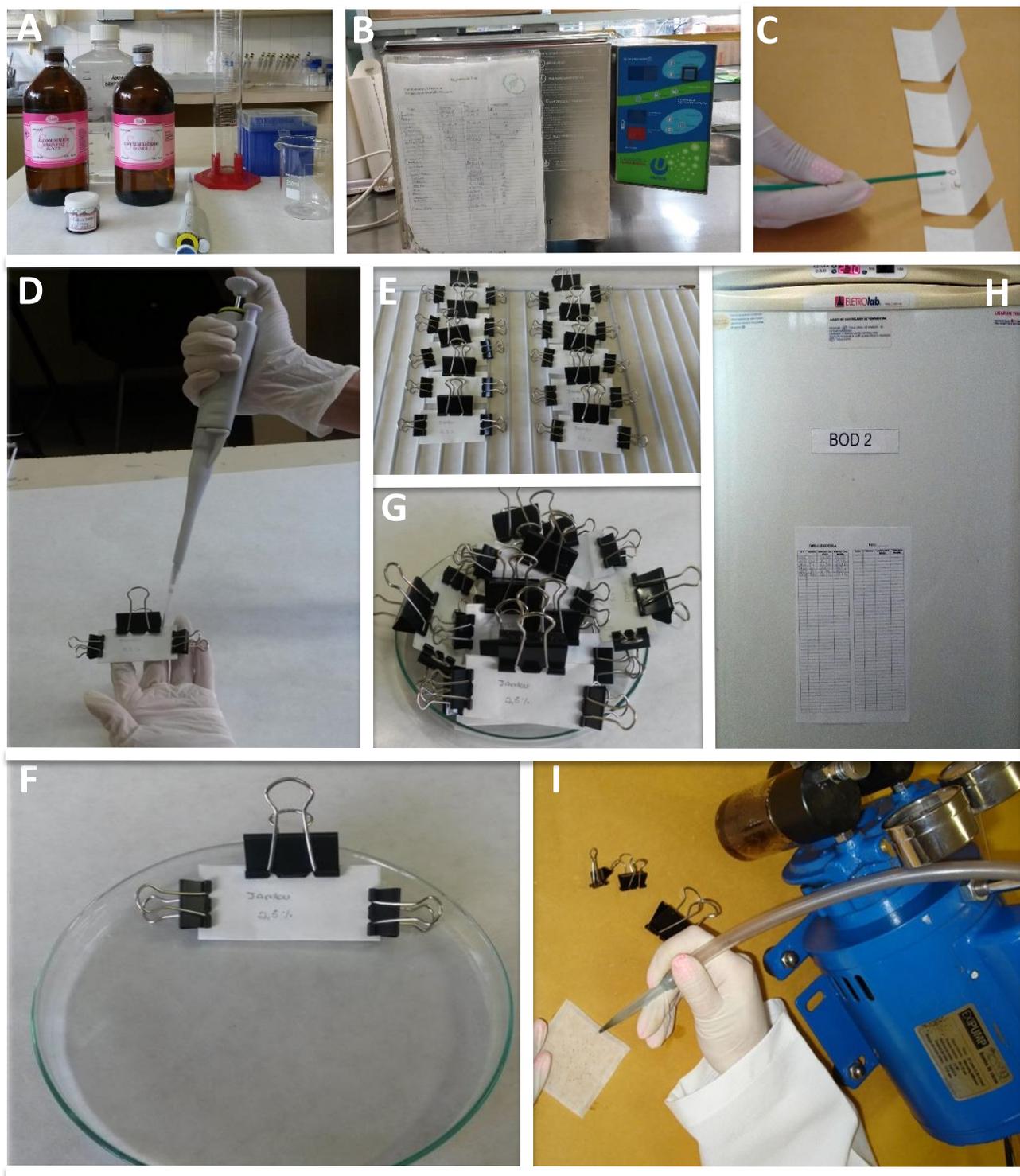


Figura 6 – Diluição do extrato metanólico de *Acmella oleracea* e teste de pacotes de larvas. A: Solventes; B: Lavadora ultrassônica; C: Carrapatos sendo colocados no centro do papel de filtro; D: Papel filtro sendo umedecido com 90 μ l da solução testada em cada lado; E: Espera de 15 minutos para evaporação do solvente; F e G: Alocação dos pacotes em placa de petri; H: Câmara climatizada com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 80 \pm 10\%$; I: Contagem do número de larvas vivas e mortas com a utilização de bomba de vácuo.

3.7 Teste de tempo letal sobre larvas

Para avaliar o tempo letal também foi utilizado o teste de pacote de larvas. No entanto, os carrapatos foram tratados apenas com a primeira concentração capaz de ocasionar 100% de mortalidade para as duas espécies. A mortalidade foi avaliada após os seguintes intervalos de tempo: 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 minutos e 24 horas. Até o transcorrer do período de exposição das larvas ao extrato, os pacotes foram mantidos em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura e umidade anteriormente citadas.

3.8 Teste de imersão de fêmeas

Nesse procedimento foi utilizado o teste proposto por Drummond et al. (1973), sendo feito apenas com fêmeas de *R. microplus*. Fêmeas ingurgitadas foram pesadas em balança analítica (Figura 7 – A) e divididas em seis grupos (cada um contendo 10 carrapatos) com pesos estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Em seguida, as fêmeas foram imersas por cinco minutos nas soluções testadas (25, 50, 100, 150 e 200 mg/mL) (Figura 7 – B). Também foi formado um grupo controle em que os carrapatos foram imersos no solvente (etanol 50% + DMSO 1%). Após a imersão, as fêmeas de cada grupo foram colocadas sobre papel toalha para retirada do excesso da solução e, em seguida, transferidas individualmente para placas de Petri (cada carrapato = uma repetição) para acompanhamento dos parâmetros biológicos (Figura 7 – C e D). Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80 \pm 10\%$).

Após o término da postura e morte das fêmeas ingurgitadas, a massa de ovos produzida por cada carrapato foi pesada em balança analítica, transferida para seringas de plástico e acondicionada em câmara climatizada sobre as mesmas condições citadas anteriormente (Figura 7 E e F).

Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos, peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão, por estimativa visual, e a partir desses valores foi feito o cálculo do percentual de controle de acordo com Drummond et al. (1973) (Figura 7). No teste com espilantol foi usada a mesma metodologia, com as concentrações 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mg/mL.

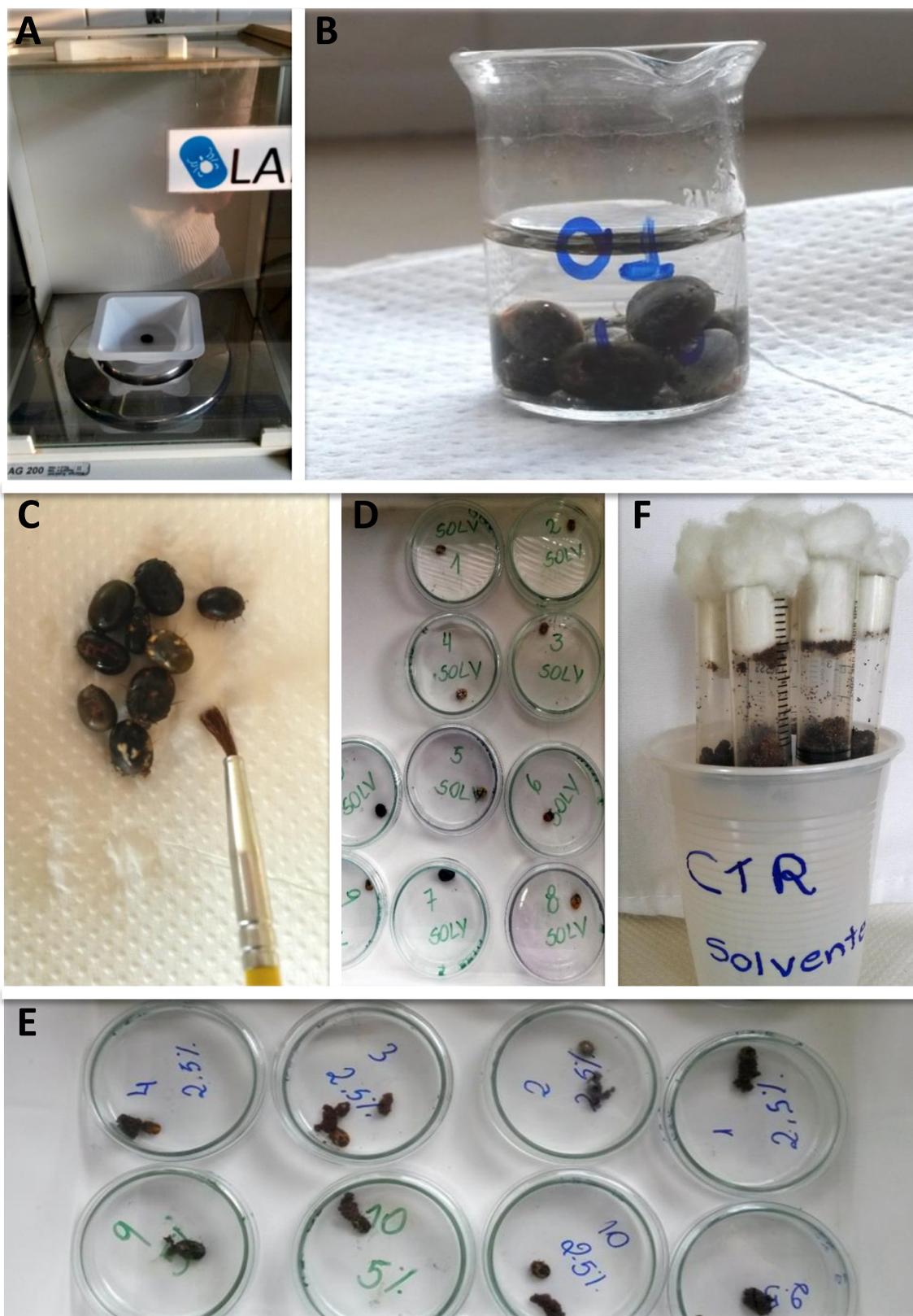


Figura 7 – Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. A: Pesagem individual de cada fêmea; B: Imersão das fêmeas na solução testada; C: Retirada do excesso do extrato em papel toalha; D: Fêmeas acondicionadas em placas de petri; E: Observação dos parâmetros biológicos; F: Observação da taxa de eclosão das larvas.

3.9 Análise dos dados

Para realização da análise estatística foi utilizado o software Biostat versão 5.0 (AYRES ET AL., 2007). Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em arco seno x. Os valores referentes às médias de cada parâmetro de diferentes grupos foram analisados por Análise de variância e Teste de Tukey ($p < 0,05$). No caso de distribuição não paramétrica, os valores foram comparados pelos testes Kruskal Wallis e Student Newman Keulls ($p < 0,05$).

A análise de Probit foi realizada para calcular o tempo letal 50 (TL_{50}) (FINNEY, 1971), utilizando o programa POLOPC[®] (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA, USA).

4 RESULTADOS

A concentração do espilantol no extrato metanólico do jambu foi de 0,187 %, com pico principal em m/z (%): 222 $[M+H]^+$, 141 (M-C₆H₈), que está de acordo com a estrutura do espilantol (Figura 8). A fração diclorometano apresentou 99% de espilantol (podendo ser considerado um composto puro), com pico principal em m/z (%): 221 (M⁺, 2), 141 (M-C₆H₈, 50), 126 ($[C_7H_{12}NO]^+$, 40), 98 ($[C_5H_8NO]^+$, 35), 81 (C₆H₉⁺, 100) (Figura 8). Além desses dados, a estrutura do espilantol foi confirmada pela análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura (NAKATANI & NAGASHIMA, 1992) (Figura 8).

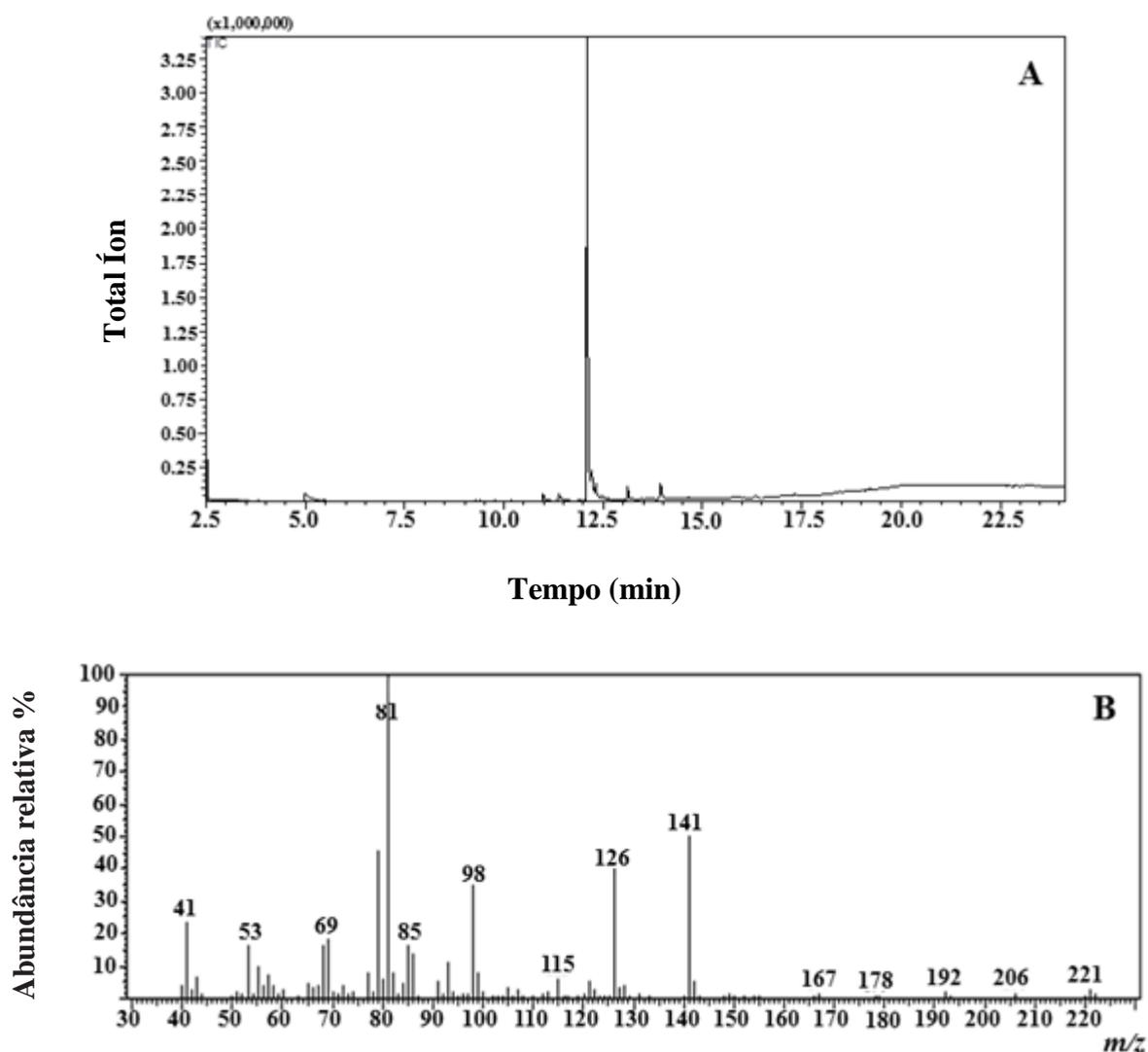


Figura 8 – A: Cromatografia da fração diclorometano contendo espilantol. B: Espectro de massa do espilantol

O extrato metanólico de *A. oleracea* foi altamente eficaz contra larvas de *R. microplus* e *D. nitens*, sendo observado mortalidade superior a 90% a partir da concentração de 1,6 e 6,2 mg/mL ($p < 0,05$) respectivamente, chegando a 100% nos tratamentos com a concentração de 3,1 e 12,5 mg/mL, respectivamente, após 24 horas. (Tabela 1). A fração diclorometano com 99% de espilantol ocasionou mortalidade de larvas de *R. microplus* superior a 80% na concentração de 0,4 mg/mL, chegando a 100% na concentração de 1,6 mg/mL após 24 horas. Em *D. nitens*, após 24 horas, as menores concentrações da fração diclorometano apresentaram baixa taxa de mortalidade, atingindo mortalidade superior a 80% a partir da concentração de 6.2 mg/mL (Tabela1).

Tabela 1 – Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens* tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de *Acmella oleracea* e espilantol em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80 \pm 10\%$) (Média \pm desvio padrão), após 24 horas de exposição.

Tratamentos	<i>Rhipicephalus microplus</i>		<i>Dermacentor nitens</i>	
	<i>Acmella. oleracea</i> ⁺	Espilantol *	<i>Acmella. oleracea</i> ⁺	Espilantol *
Control	2,1 ^a \pm 3,1	2,1 ^a \pm 3,1	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
0,2 mg/mL	0,3 ^a \pm 0,6	6,8 ^a \pm 6,4
0,4 mg/mL	10,7 ^a \pm 4,5	83,2 ^b \pm 8,3	5,9 ^{ab} \pm 2,6	0,0 ^a \pm 0,0
0,8 mg/mL	77,6 ^b \pm 12,6	91,3 ^{bc} \pm 7,8	17,3 ^{abc} \pm 10,7	0,0 ^a \pm 0,0
1,6 mg/mL	98,1 ^b \pm 3,2	100,0 ^c \pm 0,0	42,1 ^{bcd} \pm 14,5	7,51 ^b \pm 5,61
3,1 mg/mL	100,0 ^b \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0	72,8 ^{cd} \pm 18,9	79,56 ^c \pm 10,89
6,2 mg/mL	100,0 ^b \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0	93,1 ^{de} \pm 6,5	93,67 ^c \pm 1,67
12,5 mg/mL	100,0 ^b \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0	100,0 ^e \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0
25,0 mg/mL	100,0 ^b \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0	100,0 ^e \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0
50,0 mg/mL	100,0 ^b \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0	100,0 ^e \pm 0,0	100,0 ^c \pm 0,0

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%.

Controle = etanol 50% + DMSO 1%. ⁺ - Extrato metanólico de *A. oleracea*. * - Fração diclorometano do extrato metanólico com 99% de espilantol.

... – Concentração não testada para *D. nitens*.

No que diz respeito ao tempo letal, a concentração de 12,5 mg/mL ocasionou 100% de mortalidade de larvas de *R. microplus* e *D. nitens*. Curtos períodos de exposição (15 e 30 min.) ocasionaram baixa taxa de mortalidade ($p>0,05$) de larvas de *R. microplus* (7,0 e 11,4%, respectivamente). Mortalidade superior a 90% foi verificada após 60 minutos de exposição ($p<0,05$), chegando a 100% no tratamento com 120 minutos (Tabela 2). Para *D. nitens*, o percentual de mortalidade foi inferior a 10% nos grupos com exposição entre 15 e 45 minutos. Com 120 minutos, a taxa de mortalidade foi de 98,8% ($p<0,05$) e, somente após 24h foi verificada mortalidade de 100% (Tabela 2). O TL_{50} para larvas de *R. microplus* e *D. nitens* foi de 38 e 57 minutos, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2 - Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens* expostas por diferentes períodos ao extrato metanólico de *Acmella oleracea*, na concentração de 12,5 mg/mL, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$) (Média \pm desvio padrão).

Tempos de exposição	<i>R. microplus</i>	<i>D. nitens</i>
Controle – 24h	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
15 min	7,0 ^{ab} \pm 6,5	0,3 ^a \pm 0,7
30 min.	11,4 ^{ab} \pm 5,4	3,3 ^{ab} \pm 4,7
45 min.	66,2 ^{bc} \pm 20,7	9,8 ^{bc} \pm 5,5
60 min.	90,3 ^{cd} \pm 4,7	64,3 ^{cd} \pm 16,5
75 min.	97,5 ^{de} \pm 1,9	84,5 ^{de} \pm 12,6
90 min.	98,7 ^e \pm 1,7	86,7 ^{de} \pm 12,4
120 min.	100,0 ^e \pm 0,0	98,8 ^e \pm 2,2
24 h	100,0 ^e \pm 0,0	100,0 ^e \pm 0,0

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%.

Controle = etanol 50% + DMSO 1%.

Tabela 3 – Tempo letal 50% (TL₅₀ - minutos) de larvas de *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens* tratadas com o extrato metanólico de *Acmella oleracea* na concentração de 12,5 mg/mL em condições de laboratório (27±1°C e UR 80±10%).

Carrapatos	TL ₅₀	Intervalo de confiança	Valor <i>p</i>
<i>Rhipicephalus microplus</i>	38,1	35,1- 41,2	<0,01
<i>Dermacentor nitens</i>	57,9	54,6 – 61,3	<0,01

Os resultados para o teste de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* estão descritos na Tabela 4. O peso inicial das fêmeas, nos diferentes tratamentos, não diferiu estatisticamente ($p>0,05$). Em relação aos parâmetros peso da massa de ovos e percentagem de eclosão (Figura 9), os grupos tratados com concentrações iguais e/ou superiores a 50,0 mg/mL apresentaram diferenças significativas ($p< 0,05$) em relação ao controle, ocorrendo redução nos valores dos grupos tratados. As fêmeas submetidas ao tratamento com 200,0 mg/mL morreram antes de iniciarem o processo de oviposição, ocasionando percentual de controle de 100%. Nas demais concentrações (25,0; 50,0; 100,0; 150,0 mg/mL) o percentual de controle foi de 14,7; 85,2; 81,7 e 99,6%, respectivamente (Tabela 4)

No teste de imersão das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* na fração diclorometano com 99% de espilantol foi observado redução significativa ($p< 0,05$) no peso da massa de ovos em concentrações iguais e/ou superiores a 10,0 mg/mL. A imersão das fêmeas no espilantol levou a um maior número de ovos estéreis se em relação ao controle, uma vez que a taxa de eclosão apresentou diferença significativa ($p> 0,05$) em relação ao controle a partir da concentração de 2,5 mg/mL (Figura 9). O melhor percentual de controle foi obtido na concentração de 20,0 mg/mL (92,9%), enquanto que nas concentrações 2,5; 5,0; 10,0 mg/mL o percentual de controle foi de 55,43; 77,71; 76,54% respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores referente a média do peso das fêmeas antes da postura (mg), peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas e percentuais de eclosão larval e controle de *Rhipicephalus microplus*, tratadas com diferentes concentrações do extrato metanólico de *Acmella oleracea* e do espilantol, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$) (Média \pm desvio padrão).

	Tratamentos	Peso das fêmeas antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão (%)	Percentual de controle (%)
<i>Acmella oleracea</i>	Controle	193,1 ^a \pm 20,4	137,2 ^a \pm 23,6	92,3 ^a \pm 12,4	...
	(n)	(10)	(09)	(09)	
	25,0 mg/mL	190,6 ^a \pm 15,6	113,7 ^a \pm 4	93,6 ^a \pm 9,0	14,7
	(n)	(10)	(09)	(09)	
	50,0 mg/mL	192,8 ^a \pm 13,5	34,1 ^b \pm 45,8	55,0 ^b \pm 39,2	85,2
	(n)	(10)	(05)	(05)	
	100,0 mg/mL	194,6 ^a \pm 13,5	33,1 ^b \pm 39,7	70,5 ^b \pm 24,2	81,8
(n)	(10)	(05)	(04)		
<i>Espilantol</i>	150,0 mg/mL	181,2 ^a \pm 17,1	13,0 [*] \pm 27,5	3,5 [*] \pm 4,9	99,6
	(n)	(10)	(02)	(02)	
	200,0 mg/mL	181,8 ^a \pm 14,2	100,0
(n)	(10)	(0)	(0)		
<i>Espilantol</i>	Controle	243,1 ^a \pm 54,9	95,5 ^a \pm 28,4	89,0 ^a \pm 12,3	...
	(n)	(10)	(09)	(09)	
	2,5 mg/mL	240,1 ^a \pm 14,2	79,3 ^{ab} \pm 27,7	44,0 ^b \pm 39,7	55,4
	(n)	(10)	(10)	(06)	
	5,0 mg/mL	240,6 ^a \pm 12,1	67,2 ^{abc} \pm 21,8	26,9 ^b \pm 24,3	77,7
	(n)	(10)	(10)	(10)	
	10,0 mg/mL	240,4 ^a \pm 31,1	54,1 ^{bc} \pm 30,0	34,3 ^b \pm 33,3	76,5
(n)	(10)	(10)	(07)		
<i>Espilantol</i>	20,0 mg/mL	241,9 ^a \pm 28,5	42,7 ^c \pm 26,0	13,3 ^b \pm 25,3	92,9
	(n)	(10)	(10)	(06)	

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças significativas em nível de 5%.

(n) Tamanho da amostra

Controle = etanol 50% + DMSO 1%.

*Análise estatística não realizada devido ao tamanho insuficiente da amostra

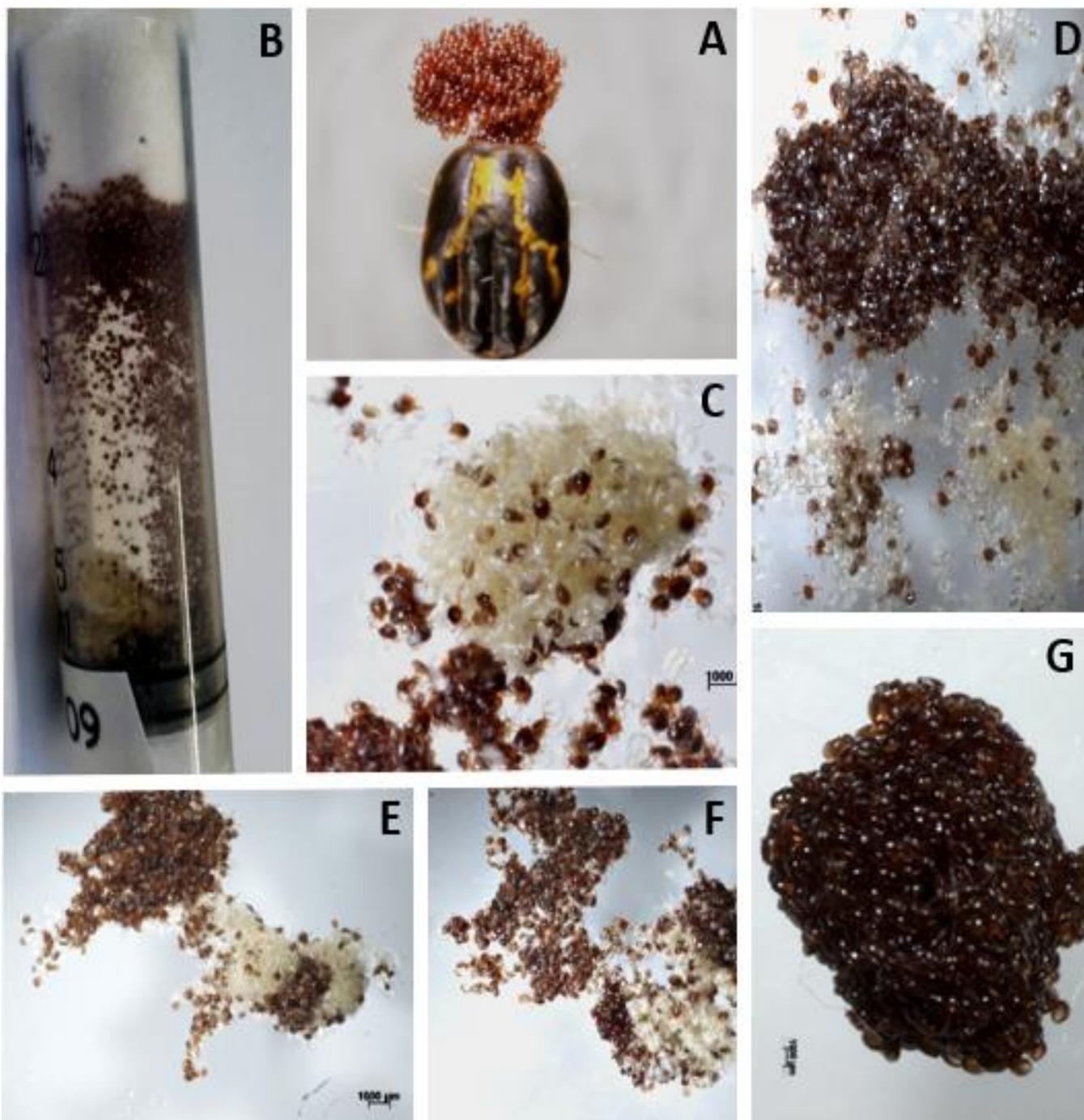


Figura 9 – Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações de epilantol. Observação de eclosão das larvas. A: Fêmea ingurgitada de *R. microplus* realizando postura – grupo controle. B: Ovos depositados em seringa – grupo controle. C: Observação de eclosão das larvas – grupo controle. D: Observação de eclosão das larvas – concentração 2,5 mg/mL. E: Observação de eclosão das larvas – concentração 5,0 mg/mL. F: Observação de eclosão das larvas – concentração 10,0 mg/mL. G: Observação de eclosão das larvas – concentração 20,0 mg/mL.

5 DISCUSSÃO

Nas duas últimas décadas ocorreu considerável aumento no número de estudos sobre a atividade de compostos de origem vegetal para controle de carrapatos, devido a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos e sustentáveis para esse fim (BORGES et al., 2011). A respeito da atividade de *A. oleracea* sobre *R. microplus*, estudos tem evidenciado resultados divergentes de acordo com o tipo de extrato utilizado, sendo que já existe informações sobre o extrato aquoso (CHUNGSAMARNYART & JANSAWAN, 1993), etanólico (CHUNGSAMARNYART et al., 1991), clorofórmico, acetato de etila (VEERAMANI et al., 2014) e hexânico (CASTRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). O presente estudo acrescenta dados a respeito da atividade de *A. oleracea* sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, por meio de testes com o extrato metanólico e espilantol, além de trazer informações sobre a atividade desse extrato e do espilantol para larvas de *D. nitens*.

No teste de larvas, foi observado elevada atividade do extrato metanólico sobre *R. microplus* e *D. nitens*, com mortalidade superior a 90% a partir das concentrações de 1,6 e 6,2 mg/mL, respectivamente. Esses resultados são similares ao obtidos por Castro et al. (2014), que testaram o extrato hexânico de *A. oleracea* e verificaram mortalidade média de 93% das larvas de *R. microplus* no tratamento com a concentração de 1,6 mg/mL. Entretanto, diferem de outros dados disponíveis na literatura com testes com o extrato aquoso e etanólico. Chungsamarnyart et al. (1991) verificaram que o extrato etanólico na concentração de 10% (=100 mg/mL) apresentou atividade moderada sobre larvas de *R. microplus*, com mortalidade de 36% após 48h. Chungsamarnyart & Jansawan (1993) constataram que o extrato aquoso dessa planta não apresentou atividade sobre larvas de *R. microplus*. Castro et al. (2014) atribuíram a maior atividade do extrato hexânico, quando comparado aos extratos aquoso e etanólico (CHUNGSAMARNYART et al., 1991; CHUNGSAMARNYART & JANSAWAN, 1993), devido ao fato do hexano ser um solvente menos polar, apresentando maior afinidade com as substâncias que conferem atividade carrapaticida. Contudo, no presente estudo, foi utilizado metanol, solvente mais polar do que o etanol e o hexano, e a atividade carrapaticida foi elevada. Isso pode estar relacionado com o fato do metanol ser considerado um solvente de ampla extração (SANTOS-BUELGA, 2012), devido a maior polaridade em relação ao etanol e hexano,

sendo capaz de extrair uma maior quantidade de substâncias e essa mistura pode ter resultado em efeito sinérgico.

A avaliação da atividade carrapaticida de compostos de origem vegetal sobre larvas de carrapatos geralmente é realizada 24 ou 48 horas após a exposição (FERNANDES & FREITAS, 2007; RIBEIRO et al. 2008; FERRARINI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2012; GOMES et al., 2012; LAGE et al., 2013), existindo poucos relatos na literatura sobre avaliação de tempo letal. No presente estudo, foi verificado que o extrato metanólico de *A. oleracea* apresentou elevada atividade carrapaticida em um curto período, com mortalidade superior a 90% a partir de 60 e 120 minutos para *R. microplus* (TL₅₀ = 38,1) e *D. nitens* (TL₅₀ = 57,9), respectivamente. No entanto, esses resultados são inferiores ao verificado por Monteiro et al. (2012), que constaram mortalidade de 100% das larvas de *R. microplus* e *D. nitens* expostas ao eugenol por 60 minutos.

Estudos com compostos de origem vegetal geralmente tem revelado que larvas de *R. microplus* são mais sensíveis do que outros ixodídeos de importância médica e veterinária. Comparando as mortalidades obtidas para as duas espécies de carrapatos nos testes com larva, é possível verificar que *R. microplus* apresenta maior sensibilidade ao extrato metanólico de *A. oleracea*, uma vez que foi observado mortalidade de 100% a partir da concentração de 3,1 mg/mL e TL₅₀ de 38 minutos, enquanto para *D. nitens*, mortalidade de 100% foi verificado a partir da concentração de 12,5 mg/mL e TL₅₀ de 57 minutos. Gomes et al. (2012) demonstraram que larvas de *R. microplus* apresentam maior sensibilidade ao óleo essencial de *L. sidoides* do que larvas de *D. nitens*. Araújo et al. (2016) avaliaram a atividade do timol, carvacrol e eugenol sobre larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) e verificaram maior sensibilidade da primeira espécie. Por meio de comparação dos resultados de Araújo et al. (2016) e Novato et al. (2015), é possível concluir que larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *D. nitens* foram mais resistentes ao timol e carvacrol do que larvas de *R. microplus*. A maior sensibilidade pode estar relacionada a conduzido por (Mauleon et al., 1993), que verificaram que fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* apresentam cutícula mais delgada do que fêmeas de *Rhipicephalus anulatus*, Say, 1821 e *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794). Contudo, é necessária a realização de estudos específicos sobre larvas para possível confirmação de tal hipótese.

No teste com fêmeas ingurgitadas expostas em diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. oleracea*, foi observado redução na quantidade e viabilidade dos ovos

produzidos por *R. microplus* a partir da concentração de 50 mg/mL, com percentual de controle de 85,2%. Esses resultados são importantes pois levam à redução do número de indivíduos da próxima geração, e superam os valores obtidos por Castro et al. (2014), que utilizando o extrato hexânico na mesma concentração (50 mg/mL), verificaram viabilidade dos ovos similares ao observado para o grupo controle e percentual de controle de 59%. Contudo, na maior concentração (200 mg/mL), os resultados foram similares, sendo verificado percentual de controle de 100% no presente estudo e 97% no estudo de Castro et al. (2014). O extrato hexânico utilizado por Castro et al. (2014) apresentou 14% de espilantol, valor superior ao encontrado no extrato metanólico utilizado no presente estudo (0,187%). As atividades biológicas de *A. oleracea* em muitos casos se deve a presença do espilantol, contudo, o extrato metanólico utilizado no presente estudo, com baixa concentração de espilantol, apresentou elevada atividade carrapaticida, indicando provável existência de outras moléculas bioativas.

Veeramani et al. (2014) também avaliaram a eficácia de extratos de *A. oleracea* sobre fêmeas, realizando testes com extrato hexânico, clorifórmico e de acetato de etila na concentração de 5% (= 50 mg/mL). Diferente do observado no presente estudo, os extratos testados por esses autores não apresentaram boa atividade, sendo verificado mortalidade de 30, 26 e 20%, respectivamente. Contudo, é difícil realizar comparação direta entre os resultados, devido a diferença das metodologias utilizadas. Veeramani et al. (2014) avaliaram a eficácia dos extratos por meio da mortalidade das fêmeas ingurgitadas, enquanto no presente estudo, a eficácia foi avaliada por meio da interferência do extrato na biologia reprodutiva das fêmeas ingurgitadas, método preconizado pela Food and Agriculture Organization (FAO, 2004) e pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA, 1990).

Além disso, cabe mencionar que a diferença entre os resultados deste estudo e outros quanto a atividade acaricida de *A. oleracea* também pode estar relacionada com as diferenças na susceptibilidade entre as cepas de carrapatos usadas nos diferentes testes e diferenças nos níveis de espilantol e outras substâncias bioativas que podem estar presentes no extrato utilizado em cada estudo.

As atividades biológicas de *A. oleracea* têm sido atribuídas constantemente a metabólitos secundários como o espilantol, uma *N*-alquilamida que ocorre na planta, desempenhando o papel de defesa contra predadores e patógenos (DIAS et al., 2012). No presente estudo, foi obtido uma fração diclorometano com 99% de espilantol, que foi testada sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e larvas de *D. nitens*, sendo a

primeira investigação da atividade do espilantol puro sobre carrapatos. Para *R. microplus*, o espilantol mostrou atividade mais elevada do que a observada para o extrato metanólico, com uma eficácia superior a 90% para as larvas e fêmeas na concentração de 0,8 mg/mL e de 20,0 mg/mL, respectivamente, enquanto que nos testes com extrato, valores similares de eficácia foram encontrados em concentrações de 1,6 (larvas) e 150 mg/mL (fêmeas). Este fato demonstra o potencial desta *N*-alquilamida para o controle de carrapatos bovinos. No entanto, para larvas de *D. nitens*, o extrato e o espilantol apresentaram eficácia semelhante, com taxas de mortalidade acima de 90% em concentrações de 6,2 mg/mL.

Apesar da elevada atividade, existem fatores que dificultam a obtenção do espilantol para a realização de testes biológicos, como preço em que essa amida é comercializada e custo de execução das técnicas existentes para purificação, como CO₂ supercrítico (DIAS et al., 2012) e micro-ondas (COSTA et al., 2013). Assim, em princípio, tais fatos dificultam a utilização dessa substância para o desenvolvimento de formulações carrapaticidas. No entanto, recentemente foi descrito um método de extração por Barbosa et al. (2014), utilizando apenas solventes orgânicos. Tal método permite uma extração simples, eficiente e de baixo custo quando comparado a outros métodos. Os autores conseguiram isolar frações com cerca de 84% a 100% de pureza de espilantol. Tal método foi empregado para a obtenção da fração diclorometano utilizado no presente estudo e futuramente pode ser utilizado como forma de reduzir os custos para obtenção de frações ricas em espilantol.

6 CONCLUSÕES

- O extrato metanólico de *A. oleracea* apresenta atividade acaricida sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e larvas de *D. nitens*;
- Larvas de *R. microplus* apresentam maior sensibilidade ao extrato metanólico de *A. oleracea* do que larvas de *D. nitens*;
- A fração diclorometano com 99% de espilantol apresenta atividade acaricida sobre sobre larvas e fêmeas de *R. microplus* e larvas de *D. nitens*;
- O espilantol apresenta atividade superior ao extrato metanólico de *A. oleracea*, quando testado sobre larvas e fêmeas de *R. microplus* e atividade similar sobre larvas de *D. nitens*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato metanólico de *A. oleracea* e o espilantol apresentam eficácia *in vitro* sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e larvas de *D. nitens*, evidenciando o potencial dessa planta e *N*-alquilamida para o controle de carrapatos. Fato reforçado por esse vegetal ser cultivado em larga escala na região Norte do Brasil, proporcionando a essa espécie, real potencial para produção de extrato em escala comercial (CASTRO et al., 2014). Futuras investigações devem ser conduzidas para verificar por meio de testes *in vivo*, sobre essas e outras espécies de carrapatos, estudos sobre o desenvolvimento de formulações, testes para verificar a toxicidade desse extrato sobre mamíferos e outros organismos não alvo, além de investigar quais são as outras possíveis moléculas bioativas presentes no extrato metanólico de *A. oleracea* e a atividade das mesmas, isoladamente, sobre carrapatos.

8 REFERÊNCIAS

AMARAL, M. A. Z.; ROCHA, C. M. B. M.; FACCINI, J. L. H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20: 148-154, 2001a.

AMARAL, M. A. Z.; ROCHA, C. M. B. M.; FACCINI, J. L. H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A. Perceptions and attitudes among milk producers in Minas Gerais regarding cattle tick biology and control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20: 194-201, 2001b.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**, 99: 466-472, 2006.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande: Embrapa: pp. 36, 2010.

ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D.; SILVA, B.C.; DAEMON, E.; CARVALHO, M.G.; MONTEIRO, C.M.O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol on larvae of cattle tick, *Rhipicephalus microplus* and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, XXX, 2016

AYRES, M.; AYRES J. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. Bioestat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas, Belém, 2007.

BARBOSA, C. S.; BORGES, L. M. F.; NICÁCIO, J.; ALVES R. D.; MIGUITA, C.R.; VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F.R. In vitro activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, 60:421-430, 2013.

BARBOSA, A. F.; SILVA, R. M. O. FIDELIS, Q. C.; RIBEIRO, L. de O.; CARVALHO, M. G.; SABAA-SRUR, A. U. O. Nueva metodología de extracción de espilantol y actividad antioxidante de jambu (*Spilanthes oleracea* L.). Anais... In: Anais do II Congresso Latinoamericano de Plantas Medicinales, Santiago-Chile, 2014. CD-ROM

BEGNINI, M. L. Potencial do uso, produção de extratos de plantas brasileiras e desenvolvimento de produtos para o controle de pragas e ectoparasitos em animais e seres humanos: plantas inseticidas. In: practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control. 2001, Uberaba. **Proceedings of the 2. Workshop Neem & Pheromones**, Universidade de Uberaba, Uberaba: Reginerio S. de Faria e H. klebeergs Eds. p. 59-61. 2001

BENJAMIN, M. A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** 39:723-728, 2002.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, 115(7):2545-60, 2016.

BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C. Aspectos biológicos do *Dermacentor nitens* (Neuman,1897) em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**, 45: 586-591, 1993.

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**, 20: 89-96, 2011.

BOTTEON, P. T. L.; MACHADO, R. C. C.; REIS, T. P.; MASSARD, C. L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural, Santa Maria**, 35: 1136-1140, 2005.

BRIZUELA, C. M.; ORTELLADO, C. A.; SANCHEZ, T. I.; OSORIO, O.; WALKER, A. R. Formulation of integrated control of *Boophilus microplus* in Paraguay: analysis of natural infestations. **Veterinary Parasitology**, 63: 95-108, 1996.

BURGER, T. D.; SHAO, R.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, in press, 2014.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, 113: 3697-3701, 2014.

CATTO, J. B.; BIANCHIN, I; SAITO, M. L. Efeito acaricida in vitro de extratos de plantas do Pantanal no carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Campo Grande: Embrapa. pp. 1-25, 2009.

CATTO, J.B. Potencial acaricida de plantas como componente de sistema integrado para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas. Campo Grande: Embrapa. pp. 119-135, 2013.

CAVALCANTI, V. M. S. Extração de espilantol de *Spilanthes acmella* var. *oleracea* com dióxido de carbono supercítico. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de *Eucalyptus* em *Boophilus microplus*: óleos essenciais e concentrados emulsionáveis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 39:247-253, 2002.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13: 156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; DE BARROS, L. D.; CONTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; BIZZO, H. R. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 110:295-303, 2012.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; RITA, S.; SHARATCHANDRA, K.; SINGHT, T. I. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian Journal Pharmacology**, 46: 148-150, 2004.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; SANJEBAM, R.; KHUMBONG, S.; THOKCHOM, I. S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animals models. **Indian Journal Pharmacology**, 42: 277-279, 2010.

CHUNGSAMARNYART, N.; JIWAJINDA, S.; JANSAWAN, W. Acaricidal effect of plant crude-extracts on the tropical cattle tick (*Boophilus microplus*). **Kasetsart Journal**, 25: 90-100, 1991.

CHUNGSAMARNYART, N.; JANSAWAN, W. Acaricidal effect of practical crude-extracts of plants against tropical cattle tick (*Boophilus microplus*). **Kasetsart Journal**, 27: 57-64, 1993.

COSTA, S. S.; ARUMUGAM, D.; GARIEPY, Y.; ROCHA, S. C. S.; RAGHAVAN, V. Spilanthol extraction using microwave: calibration curve for gas chromatography. **Chemical Engineering Transactions**, 32: 1783-1788, 2013.

CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P.; LEITE, R. C.; BASTIANETTO, E.; RIBEIRO, A. C. C. L.; FREITAS, C. M. V.; OLIVEIRA, P. R. Efeito do controle estratégico de *Amblyomma ajennense* (fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) sobre a população de *Anocentor nitens* (neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 16(4): 215-219, 2007.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M; BECHARA, G. H. (Eds.). **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, pp.115-124, 2006.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; MILLER, R. J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 139: 211-220, 2006.

DEKEYSER, M.A. Acaricide: mode of action. **Pest Management Science**, v.61, n.2,p.103–110, 2005.

DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; JÚNIOR, R. N. C.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H. C. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, 61: 62-70, 2012.

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GRADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**, 66:30-133, 1973.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J.M.; NAVA, S.; MANGOLD, ATILIO.; GUGLIELMONE, A.A. ; LABRUNA, M.B.; DE LA FUENTE, J. Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. **Journal of Medical Entomology**. v. 49, p. 794-802, 2012.

FAO. **Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines**. Module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. pp. 25-77, 2004.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.)R.K. Jansen (Asteracea) – Jambu. **Revista Fitos**, 5: 83-90, 2010.

FERNANDES, É.K.K., BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, 46, 71-93, 2008.

FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. P. S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 147 (1-2): 150-154, 2007.

FERRARINI, S. R. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and [beta]-amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, 15 (91-2): 149-153, 2008.

FINNEY, D. S. Probit Analysis, third ed. Cambridge University Press. Cambridge, 1971.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, 23: 53-56, 2004

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

GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. 2003. Development of antiparasitic drugs in the 21st Century. **Veterinary Parasitology**, 11: 167-184, 2003.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; YADAV, M. P.; Upcoming and future strategies of tick control: a review. **Journal of Vector Borne Diseases**, 44: 79-89, 2007.

GOMES, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias. Gado de Corte Divulga. Campo Grande: Embrapa, 1998.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; GOIS, R. W. S.; DAEMON, E.; SANTIAGO, G. M. P. ; CARVALHO, M. G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) on larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 111: 2423-2430, 2012.

GRAF, J. F.; GOGOLEWSK, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G. A.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G. J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, 129:427-442, 2004.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; CANCADO, P. H. D. Reassessment of economic impact by cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Veterinary Parasitology*, 23: 150-156, 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-battesti, D. M.; Arzua, M; Bechara, G. H. (Eds.). **Carrapatos de importância médica veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, pp.115-124, 2006.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATESTI, D. M. Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP, São Paulo, 2001.

HANIFAH, A. L., AWANG, S. H., MING, H. T., ABIDIN, S. Z., OMAR, M. H. Aca-ricidal activity of *Cymbopogon citratus* and *Azadirachta indica* against house dust mites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 1 (5): 365-369, 2011.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, 129: 3-14, 2004.

Kadir, H. A.; Zakaria, M. B.; Kechi, A. A.; Azirum, M. S. Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes acmella* (Murr.). **Pesticide Science**, 25: 329-335, 1989;

KISS, T.; CADAR, D.; SPÎNU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Veterinary Parasitology**, 187: 357-366, 2012.

KLAFKE, G. M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: Pereira, M.C.; Labruna, M.B.; Szabo, M.P.J.; Klafke, G.M. (Eds.). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET. pp. 81-105, 2008.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. **Biopesticides International**, 4 (1): 63-84, 2008.

KOUL, O.; WALIA, S. Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 4(49): 1-30, 2009.

LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti, D.M.B.; Arzua, M.; Bechara, G.H (eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan. pp. 155-164, 2006.

LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PENA, A.; GUGLIELMONE, A.; JONGEJAN, F.; FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Boophilus microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, 9: 46, 2009.

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 112: 863-869, 2013.

LÓPEZ-BUCIO, J.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G.; RAMIREZ-CHÁVEZ, E. MOLINA-TORRES, J. HERRERA-ESTRELA, L. Novel signals for plant development. **Plant Biology**, 9: 523-529, 2006.

MAPA. **Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura. Diário Oficial de 22.01.90, pp. 1506-1509, 1990.

MATIAS, J.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. Classificação, distribuição geográfica, ciclo biológico e importância econômica das principais espécies de carrapatos no Brasil.

In: Andreotti, R.; Koller, W.W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas**. Campo Grande: Embrapa, 2013.

MAULÉON, H.; BARRÉ, N.; PANOMA, S. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). **Experimental and Applied Acarology**, 17:831-838, 1993.

MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JR, F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. O. S.; FAZZA, A. P.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, 111: 1295-1300, 2012.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. 1992. Pungent alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 56: 759-762, 1992.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, 85: 137-142, 2013.

NOVATO, T. P. L., ARAÚJO, L. X., MONTEIRO, C. M. O., MATURANO, R., SENRA, T. O. S., MATOS, R. S., GOMES, G. A., CARVALHO, M. G., DAEMON, E., 2015. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, 212 (3-4): 331-335, 2015.

OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A. CAMARGO-MATHIAS, M. I. Cytotoxic Effects of Extract of *Acmella Oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus Microplus* Females Ticks. **Microscopy Research and Technique**, XXX, 2016.

PANDEY, V.; AGRAWAL, V. Efficient micropropagation protocol of *Spilanthes acmella* L. possessing strong antimalarial activity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 45: 491-499, 2009.

PIRES, J. E. P.; FERNANDES, R. M.; FERNANDES, M. Z. L. C. M.; VIANA, G. E. N.; DOURADO, J. C. L.; SOUSA, S. A. A. Determinação da concentração inibitória média (CI50) do extrato aquoso de *Simarouba versicolor*, St. Hill sobre a ovipostura do carrapato bovino (*Boophilus microplus*, Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 9: 23-26, 2007.

PEREIRA, M. C. Introdução. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência*. São Paulo: MEDVET. pp.1-5, 2008.

PHRUTIVORAPONGKUL, A.; CHAIWON, A.; VEJABHIKUL, S.; NETISINGHA, W. CHANSAKAOW, S. An anesthetic alkamide and fixed oil from *Acmella oleracea*. **Journal of Health Research**, 22: 97-99, 2008.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R., RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules** 14:850-867, 2009.

RAMSEWAK, R.S.; ERIKSON, A.J.; NAIR, M.G. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, 51: 729-732, 1999.

RANI, S. A.; MURTY, S. U. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. **African Journal of Biomedical Research**, 9: 67-69, 2006.

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J.R.A.C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 91: 317-320, 2004.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S.

First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, 201(1-2): 128-136, 2014.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas sustentáveis. Manaus: INPA, 405p, 2001.

RIBEIRO, V. L. S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; VON POSER, G. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, 151: 351-354, 2008.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, 44:159-182, 1999.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In: Sarker, S. D.; Nahar, L. (Eds.). **Natural Products Isolation**. 3o. ed. [S.l.]: Humana Press, 864, pp. 427-464, 2012.

SARAF, D. K.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* Murr.: study on its extract spilanthol as larvicidal compound. **Asian Journal of Experimental Sciences**, 16: 9-19, 2002.

SILVA, W. C.; DE SOUZA MARTINS, J. R.; DE SOUZA, H. E. M.; HEINZEN, H.; CESIO, M. V.; MATO, M.; ALBRECHT, F.; DE AZEVEDO, J. L.; DE BARROS, N. M. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 164: 267-274, 2009.

SILVA, V. C.; PINHEIRO, N. L.; RIBEIRO, V. R.; DE CARVALHO, R. W.; SCHERER, P. O.; DOS SANTOS, M. A.; DOS SANTOS-MALLET, J. R. Structural study of the salivary glands of *Anocentor nitens* (Acari : Ixodidae) during the feeding cycle **MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE**, 73 (1): 45-50, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, p. 403, 498, 2003.

SHARMA, S.; SHAHZAD, A.; SHAHID, M.; JAHAN, N. An efficient in vitro production of shoots from shoot tips and antifungal activity of *Spilanthes acmella* (L.) *Murr.* **International Journal Plant Developmental Biology**, 6: 40-45, 2012.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). **Bulletin of Entomology Research**, 53: 563-578, 1962.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas em plantas: distribuição e importância. **Avance y Perspectiva**, 20: 377-387, 2001.

VEERAMANI, V., SAKTHIVELKUMAR, S., TAMILARASAN, K., AISHA, S.O.; JANARTHANAN, S. Acaricidal activity of *Ocimum basilicum* and *Spilanthes acmella* against the ectoparasitic tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Arachinida: Ixodidae). **Tropical Biomedicine**, 31 (3), 414–421, 2014.

WU, L.; FAN, N.; LIN, M.; CHU, I.; HUANG, S.; HU, C.; HAN, S. A. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 2341-2349, 2008

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

9 ANEXO I



Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary
Parasitology

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Acaricide activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L.
(Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)
and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)

Article Type: Research paper

Keywords: cattle tick, tropical horse tick, jambu, lethal time

Corresponding Author: Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro, M

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Goiás

First Author: Paula B Cruz

Order of Authors: Paula B Cruz; Viviane Zeringóta; Diego Melo; Tatiane Novato; Queli Fidelis; Rodrigo Fabri; Mario Geraldo Carvalho; Armando Sabaa-Srur; Erik Daemon; Caio Márcio de Oliveira Monteiro, M

Abstract: We evaluate the acaricidal activity of *Acmella oleracea* methanol extract and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens*. The methanol extract was made through maceration with methanol. From this extract, a dichloromethane fraction with approximately 100% spilanthol, was obtained and tested on *R. microplus* larvae and engorged females and *D. nitens* larvae. For evaluation against larvae, modified larvae test packages were used, and both methanol extract and the dichloromethane fraction were tested at concentrations of 0.2 to 50 mg/mL. The larvae package technique was also used in the lethal time (LT) test, with methanol extract at a concentration of 12.5 mg/mL and the mortality percentage assessment was made after 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 minutes and 24 hours. The lethal time calculation 50% (LT50) was performed in this test. The engorged female test was done with *R. microplus* only, at concentrations of 25 to 200 mg/mL for methanol extract and 2.5 to 20.0 mg/mL for spilanthol. The methanol extract caused 100% mortality of the *R. microplus* and *D. nitens* larvae at concentrations from 3.1 and 12.5 mg/mL, respectively. Spilanthol resulted in 100% mortality for *R. microplus* larvae at concentration from 1.6 mg/mL and 12.5 for *D. nitens*. In the lethal time essay using the methanol extract, the mortality rate was 100% for *R. microplus* and *D. nitens* larvae after 120 minutes and 24 hours with LT50 of 38 and 57 minutes, respectively. In the test of females, the egg mass weight and the hatching percentage of the groups treated with concentrations equal to and/or higher than 100.0 mg/mL of methanol extract showed significant differences ($p > 0.05$) while spilanthol causes significant reduction of the egg mass weight and hatching percentage at concentrations of 10.0 mg/mL and 2.5 mg/mL, respectively. Females treated with 200.0 mg/mL of extract died before starting the oviposition process, resulting in 100% effectiveness, while the best efficacy for spilanthol was 92.9% at concentration of 20.0 mg/mL. Thus we conclude that the methanol extract of *A. oleracea* and spilanthol present acaricide activity against *R. microplus* and *D. nitens*.