

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAFAELA REGINA FANTATTO

**Potencial acaricida, anti-helmíntico e estudos fitoquímicos de derivados vegetais obtidos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae)**

ARARAQUARA-SP

2016

RAFAELA REGINA FANTATTO

**Potencial acaricida, anti-helmíntico e estudos fitoquímicos de extrativos vegetais obtidos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Politi

ARARAQUARA – SP

2016

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**F216p** Fantatto, Rafaela Regina  
Potencial acaricida, anti-helmíntico e estudos fitoquímicos de extrativos vegetais obtidos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae) / Rafaela Regina Fantatto. - Araraquara, 2016.  
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de pesquisa em desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.  
Coorientador: Flávio Politi.

1. *Achyrocline satureioides*. 2. *Haemonchus contortus*. 3. Acaricidas. 4. Anti-helmínticos. 5. *Rhipicephalus sanguineus*. 6. Produtos naturais. 7. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.  
I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Politi, Flávio, coorient. III. Título.

**CAPES: 40500005**

RAFAELA REGINA FANTATTO

"POTENCIAL ACARICIDA, ANTI-HELMÍNTICO E ESTUDOS FITOQUÍMICOS DE DERIVADOS VEGETAIS  
OBTIDOS DE ACHYROCLINE SATUREIÓIDES ( LAM.) D.C. ( ASTERACEAE)"

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade  
de Ciências Farmacêuticas da Universidade  
Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de  
Araraquara como requisito para a obtenção do  
título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 24 de novembro de 2016

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO - Orientador



Prof. Dr. ILÍIO MONTANARI JUNIOR



Prof. Dr. LUIS VITOR DO SACRAMENTO

*"Dedico esse trabalho à minha avó Maria (in memoriam) e ao meu avô Chico (in memoriam) que sempre torceram por mim e não puderam ver a conclusão dessa etapa tão importante da minha vida. Eternas saudades"*

## Agradecimentos

Aos meus pais Luzia e Celso pelo apoio, carinho e todo amor dispensando, agradeço também ao meu irmão Rafael e minha sobrinha Giovanna;

À minha orientadora Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, pela oportunidade concedida, pelo apoio e pelos ensinamentos;

À Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, por ter me aberto as portas para a área da pesquisa, por todo apoio, incentivo, ensinamentos, por sempre estar disposta a me ajudar, só tenho a lhe agradecer muito por chegar até aqui;

Ao meu coorientador Dr. Flávio Politi, por ter me proporcionado essa oportunidade, pelas trocas de experiências e pela amizade;

À Dra. Luciana Ferreira Domingues, responsável por muitos ensinamentos não só na área profissional assim como também na vida, por todo apoio e amizade;

Ao Professor Dr. Ilio Montanari Junior, pelo material vegetal cedido;

Ao Dr. Gustavo Seron Sanches pelos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* cedidos;

Ao Dr. Alexander Alves pelo auxílio com os métodos cromatográficos;

À toda equipe do Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste;

À toda equipe do laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da UNESP;

À banca de qualificação Professor Dr. André Gonzaga dos Santos e Professora Dra. Mara Cristina Pinto;

À banca de defesa Professor Dr. Luis Vitor do Sacramento e Professor Dr. Ilio Montanari Junior;

Aos funcionários e colaboradores de ambas as instituições envolvidas nesse trabalho.

Muito obrigada!

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 <i>Haemonchus contortus</i> .....	16
2.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	18
2.3 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	21
2.4 Métodos e alternativas de controle de endoparasitoses e ectoparasitoses .....	23
2.5 <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. ....	26
3. OBJETIVO.....	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1. Obtenção do material vegetal .....	29
4.2. Obtenção do extrato etanólico .....	29
4.3. Obtenção de óleo essencial.....	30
4.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS .....	31
4.4.1 Flavonóides .....	31
4.4.2 Antraquinonas .....	32
4.4.3 Reações de caracterização de glicosídeos cardiotônicos .....	33
4.4.4 Reação com desoxi-açúcares .....	34
4.4.5 Taninos .....	35
4.4.6 Saponinas .....	35
4.4.7 Alcaloides.....	35
4.4.8. Cumarinas .....	36
4.5. Análise cromatográfica por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) .....	36
4.5.1 Tratamento do extrato – Reação de derivação (Sililação).....	36
4.5.2 Análise por Cromatografía gasosa com detector de ionização por chama (CG-FID) .....	37
4.5.3 Análises CG-EM.....	37

4.5.4 Tratamento e análise de dados .....	38
4.6. Testes <i>in vitro</i> com parasitas .....	39
4.7. Recuperação dos ovos do parasita <i>Haemonchus contortus</i> .....	39
4.8. Teste de desenvolvimento larvar (TDL) .....	40
4.9. Teste de eclosão de ovos (TEO) .....	41
4.10. Teste de imersão com fêmeas de <i>R. (B.) microplus</i> .....	42
4.11. Sensibilidade larvar em teste de contato em papel impregnado .....	43
4.12. Ensaio citotóxicos .....	44
4.12.1 Linhagem celular .....	44
4.12.2 Teste de Citotoxicidade .....	44
4.13. Análises estatísticas .....	45
5. RESULTADOS .....	46
5.1. Produção do extrato e extração do óleo essencial .....	46
5.2. Análises fitoquímicas .....	46
5.3 Análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) .....	47
5.4 Teste de desenvolvimento larvar (TDL) .....	54
5.5 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO) .....	56
5.6. Teste de imersão de fêmeas de <i>R. (B.) microplus</i> .....	57
5.7. Sensibilidade das larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em teste de contato em papel impregnado .....	59
5.8. Sensibilidade das larvas de <i>R. sanguineus</i> em teste de contato em papel impregnado .....	60
5.9 Ensaio de citotoxicidade .....	62
6. DISCUSSÃO .....	64
8. CONCLUSÕES .....	73
REFERÊNCIAS .....	74

## Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Analysis of Variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS <sub>EtOH</sub>	Extrato etanólico de <i>Achyrocline satureioides</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BOD	Biological Oxygen Demand
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal capaz de inibir 50%
CL <sub>90</sub>	Concentração Letal capaz de inibir 90%
CPQBA	Centro Puridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol (álcool etílico)
FAO	Food Agriculture Organization of the United Nations
OE <sub>AS</sub>	Óleo essencial de <i>Achyrocline satureioides</i>
RE	Eficiência reprodutiva
SAS	Statistical Analysis System
TEO	Teste de Eclosão de Ovos
TDL	Teste de Desenvolvimento Larvar
TMS	Trimetilsilil
UV	Ultra Violeta
% Eclo	Porcentagem de eclodibilidade das larvas
% O	Porcentagem de oviposição
% E	Porcentagem de eficácia

## RESUMO

O Brasil é um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo, entre 2003 e 2008 a receita com exportações cresceu de um bilhão para mais de cinco bilhões de dólares. Apesar disso, o setor enfrenta perdas consideráveis devido à ocorrência de infestações massivas de ectoparasitas como os carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ainda dentro do agronegócio, outra produção que se encontra em amplo crescimento e demonstrando grande potencial de ganho de espaço no mercado internacional é a ovinocultura, com rebanho estimado em 14 milhões de animais, colocando o Brasil em 18º lugar no ranking mundial de exportações. Porém, existem grandes perdas econômicas devido à existência de infestações com endoparasitas, como o nematódeo gastrintestinal da espécie *Haemonchus contortus*. Em paralelo à preocupação com os prejuízos financeiros no agronegócio, outra espécie de carrapato, *Rhipicephalus sanguineus*, desperta interesse dos pesquisadores por ser o vetor de microrganismos causadores de importantes doenças em cães nas regiões tropicais e subtropicais. Devido ao mau uso, acaricidas e nematicidas sintéticos tem ocasionado o fenômeno de resistência, com isso a busca por novas substâncias a partir de espécies vegetais configura-se numa alternativa muito promissora para o controle desses parasitas. A espécie *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae), popularmente conhecida como macela, possui em sua composição compostos fenólicos, sobretudo flavonóis e flavanonas, em suas inflorescências, as inflorescências utilizadas no presente trabalho são provenientes do primeiro cultivar brasileiro dessa espécie, possuindo assim um genótipo único. Baseado nesses aspectos, o presente trabalho buscou analisar a eficácia de extrativos do primeiro cultivar brasileiro de *A. satureioides* desenvolvido no CPQBA sobre os carrapatos *R. (B.) microplus* e *R. sanguineus*, bem como sobre o nematódeo *H. contortus*, por meio de ensaios *in vitro*. O óleo essencial e o extrato etanólico das inflorescências de macela demonstraram possuir alta atividade sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e baixa atividade sobre larvas de *R. (B.) microplus* e *R. sanguineus*. Além disso, essa espécie vegetal demonstrou efeito de inibição da eclodibilidade de ovos e desenvolvimento de larvas de *H. contortus*, um nematódeo gastrointestinal de pequenos ruminantes. Sendo assim conclui-se que tanto o extrato etanólico quanto o óleo essencial de Macela possuem efeitos significativos frente ao parasita *H. contortus* e fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

**Palavras-chave:** *Achyrocline satureioides*. *Haemonchus contortus*. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rhipicephalus sanguineus*. produtos naturais. Acaricidas. anti-helmínticos.

## ABSTRACT

Brazil is one of the largest beef exporter in the world and between 2003 and 2008, revenue from exports grew from one billion to more than five billion dollars. Nevertheless, the sector is facing considerable losses due to the occurrence of massive infestations of ectoparasites such as tick species of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In the agribusiness, another production that is in ample growth and showing great potential for space gain in the international market is the sheep industry, with herd estimated at 14 million animals, placing Brazil in 18th position in the world exports ranking. However, there are great economic losses due to the infestations of endoparasites, such as the gastrointestinal nematodes species of *Haemonchus contortus*. In parallel to the concern about the financial losses in agribusiness, other tick species, *Rhipicephalus sanguineus*, arouses interest of researchers for being the vector of microorganisms that causes major diseases to dogs in tropical and subtropical regions. Due to misuse of synthetic antiparasitic, which causes the phenomenon of resistance to them, the search for new substances from plant species sets up a very promising alternative for the biological control. The species *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae), popularly known as macela, has in its composition phenolic compounds, particularly flavonols and flavanones in the inflorescences. Based on the aspects, this study aimed to analyze the effectiveness of extractives of the first Brazilian cultivar of *A. satureioides* developed in the CPQBA on ticks *R. (B.) microplus* and *R. sanguineus*, as well as on the nematode *H. contortus*, using *in vitro* assays. The essential oil and the extracts of inflorescences of macela have shown that this plant has high activity on engorged females of *R. (B.) microplus* and low activity on larval of *R. (B.) microplus* and *R. sanguineus*. By other hand this species presents has inhibitory effect of hatchability of eggs and development of *H. contortus* larvae. Therefore it is concluded that both the ethanol extract and the essential oil of macela have significant effects against *H. contortus* and engorged females of *R. (B.) microplus*.

**Keywords:** *Achyrocline satureioides*. *Haemonchus contortus*. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rhipicephalus sanguineus*. natural product. Acaricide. ant-helminthic.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido ao seu clima tropical e por possuir grandes extensões territoriais, o Brasil destaca-se como uma importante potência agropecuária, porém, a ocorrência de endoparasitas e ectoparasitas nos rebanhos bovinos e ovinos, respectivamente, apresentam-se como um empecilho à atividade, acarretando grandes perdas econômicas.

Estima-se que o rebanho ovino no Brasil possui cerca de 17.614.454 milhões de cabeças sendo 57,5% destes alocados no nordeste e apenas 4,5% no sudeste (IBGE, 2014). O consumo de derivados da ovinocultura ainda é baixo comparado aos da bovinocultura, porém ainda assim o Brasil importa principalmente a carne de outros países como o Uruguai. Um dos fatos que limitam os produtores e que muitas vezes inviabiliza a criação são as doenças parasitárias, com destaque para o de maior prevalência e patogenicidade parasita gastrointestinal, o *Haemonchus contortus*. Devido ao hábito hematófago deste parasita, a haemoncose é a responsável pelas maiores perdas no que se diz respeito à ovinocultura. Durante sua permanência no abomaso esse nematódeo lesiona a mucosa intestinal do animal causando problemas digestivos e de absorção de nutrientes acarretando em anemia (MATTOS et al., 2000). O crescimento retardado, perda de peso, queda na produção de leite, baixa fertilidade, e mortalidade afetam diretamente na economia proveniente dessa atividade agropecuária.

Outra atividade de grande importância, essa por sua já consolidada e considerada a de maior destaque na pecuária nacional, é a bovinocultura. O Brasil possui um dos maiores rebanhos do mundo, estimado em 212,3 milhões de cabeças (IBGE, 2014), nesse segmento o problema está relacionado à alta prevalência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Este carrapato é considerado o mais importante ectoparasito de bovinos, pela intensa espoliação causada, particularmente nas raças mais susceptíveis. O comprometimento sanitário causado pelo carrapato do boi, quando não controlado de forma satisfatória, pode acarretar perdas irreversíveis decorrentes da intensa hematofagia, transmissão de hemoparasitos (complexo carrapato/tristeza parasitária bovina), baixa qualidade do couro devido às lesões e redução da eficiência produtiva. Estima-se que os prejuízos

causados por este carrapato em rebanhos bovinos no Brasil já atingem a cifra de quatro bilhões de dólares/ano (GRISI et al., 2014).

Paralela à preocupação com os prejuízos econômicos no agronegócio, outro parasita que desperta interesse dos pesquisadores pelo seu potencial zoonótico é o carrapato do cão *Rhipicephalus sanguineus*. Essa espécie está envolvida no ciclo epidemiológico de várias doenças animais de relevância para saúde pública, atuando como vetor biológico e mecânico na transmissão de vírus, bactérias, protozoários e filarioses (DANTAS-TORRES, 2008). A presença maciça da linhagem tropical deste carrapato está relacionada ao aumento de cães soropositivos para os protozoários *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* (LABRUNA, 2006; DANTAS-TORRES, 2008). Recentemente *R. sanguineus* vem sendo descrito como vetor de patógenos para humanos, como *Rickettsia rickettsii*, agente causador da febre maculosa das Montanhas Rochosas, com alta taxa de letalidade no México e Estados Unidos e também *Rickettsia conorii*, agente etiológico da febre exantemática do Mediterrâneo (DANTAS-TORRES, 2008; EMEREEVA et al., 2011). Além disso, estudos indicam que este carrapato poderia estar sujeito à infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* (COUTINHO et al., 2005).

Atualmente, o controle dos parasitas citados é predominantemente realizado por meio de compostos sintéticos, entretanto, o uso contínuo e inadequado destes produtos tem provocado o desenvolvimento de resistência parasitária. Os antiparasitários modernos apresentam grande eficácia frente a cepas suscetíveis, entretanto o uso incorreto desses levam ao desenvolvimento da resistência que pode ser influenciada por fatores genéticos, morfológicos e operacionais (JABBAR et al., 2006).

Além disso, os resíduos de compostos químicos eliminados com as excreções dos animais representam sérios problemas ao meio ambiente (GILL e LEJAMBRE, 1996). Em algumas situações, estes resíduos podem ser liberados em produtos de origem animal e entrar na cadeia alimentar humana, resultando em problemas de saúde pública.

A principal indicação atual no controle destes parasitas é encontrar alternativas para reduzir o uso dos anti-helmínticos e acaricidas sintéticos comercialmente disponíveis e assim aumentar a vida útil destes produtos. Neste

contexto, dentre outras opções, a fitoterapia apresenta-se como uma nova ferramenta de controle.

O Brasil detém cerca de 20% da flora mundial, e apesar de ter proporcionado à humanidade produtos como o curare, a emetina, a pilocarpina, entre outros com propriedades extraordinárias, continua a ser um país com muitas potencialidades. Visto que menos de 1% das espécies vegetais brasileiras foram analisadas sob o ponto de vista químico e farmacológico, e que 80 % a 85 % da população mundial utiliza medicamentos à base de plantas, estudos que garantam a segurança e eficácia das plantas medicinais são necessários (WHO, 2002).

A biodiversidade brasileira representa uma vasta fonte de produtos naturais que podem ser úteis para a prevenção ou tratamento de doenças, tanto para uso humano como animal. As plantas medicinais podem ser usadas como tratamento alternativo ou complementar na veterinária, empregando-se vegetais frescos sendo eles na maioria das vezes incorporados na alimentação e fitoterápicos (sucos, ceras, exsudatos, tinturas, extratos e óleo dentre outros) (SIMONI, 2011).

Espécies ricas em compostos fenólicos geralmente, característicos da família das Asteraceas são conhecidas pelas suas propriedades farmacológicas. Um exemplo é a espécie dessa família denominada cientificamente *Achyrocline satureioides*. Essa espécie, popularmente conhecida como macela, tem capacidade de crescer em terrenos baldios e pastos abandonados, porém possui diversas utilidades devido as suas propriedades curativas e é muito utilizada na medicina popular de países onde ela está presente que a possui em sua flora como Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (LORENZI, 2000).

A espécie *A. satureioides* encontra-se entre as dez plantas medicinais mais utilizadas na medicina alternativa por pessoas de uma comunidade em Porto Alegre, RS e desde os anos 80 é alvo de estudos farmacológicos visando sua validação. O projeto de lei 224/2001 institui a macela como planta medicinal símbolo do Rio Grande do Sul ressaltando assim sua importância. *A. satureioides* possui diversas atividades relatadas como repelência a simulideos (borrachudo) identificada por Dal Magro et al. (1998), onde o extrato das flores apresentou 98,5% de eficiência. Rojas de Arias et al. (1995) evidenciam a atividade tripanocida (*Trypanossoma cruzi*) e inseticida (*Triatoma infestans*). Hieronymus (1882) e Lorenzi e Matos (2002) sugerem o efeito estimulante e anti-helmíntico, além do uso para o tratamento de

patologias digestivas e intestinais, cólicas e diarreia. Apesar de diversos estudos incluindo essa planta, não há relatos científicos do potencial dessa espécie sobre carrapatos e nematódeos de pequenos ruminantes, o que abre uma vertente para estudos mais detalhados. Outro fato relevante é o estudo com material vegetal proveniente de uma cultivar. O primeiro cultivar da espécie *A. saturoioides* do Brasil foi desenvolvido no CPQBA pertencente à Universidade de Campinas. Segundo artigo terceiro capítulo IV da lei Nº 9.456, de 25 de abril de 1997, um cultivar consiste em uma variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas, deve ser homogênea e estável quanto aos descritores através de gerações sucessivas o que permite assim uma maior reprodutibilidade quanto aos metabólitos secundários produzidos e sendo assim uma maior reprodutibilidade dos resultados farmacológicos

Os primeiros testes para avaliar eficientemente a propriedade anti-helmíntica de uma planta medicinal são os testes *in vitro*, devido à facilidade de execução, baixo custo e rapidez em relação aos testes *in vivo*. As espécies vegetais, frações ou seus compostos são colocados diretamente em contato com os estágios de ovo ou larva do parasito para avaliar seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento ou motilidade de larvas. É essencial que os primeiros testes sejam direcionados contra os helmintos de maior importância sanitária (HAMMOND et al., 1997). Dentre os testes *in vitro*, vários são recomendados e podem ser usados para validação de uma planta anti-helmíntica, destacando-se o teste inibição da eclosão de ovos, desenvolvimento e motilidade larvar. Após a realização dos testes *in vitro*, as substâncias candidatas ao desenvolvimento de um produto, devem ser submetidas a testes farmacológicos que incluem os testes pré-clínicos, realizados com animais de laboratório, toxicológicos e por fim, os testes *in vivo*, utilizando a espécie alvo.

Devido à presença de flavonóides e seu uso potencial demonstrado como anti-inflamatório e contra infecções gastrintestinais, a espécie *A. saturoioides* foi escolhida com o objetivo de encontrar uma possível alternativa no controle desses endo e ectoparasitas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

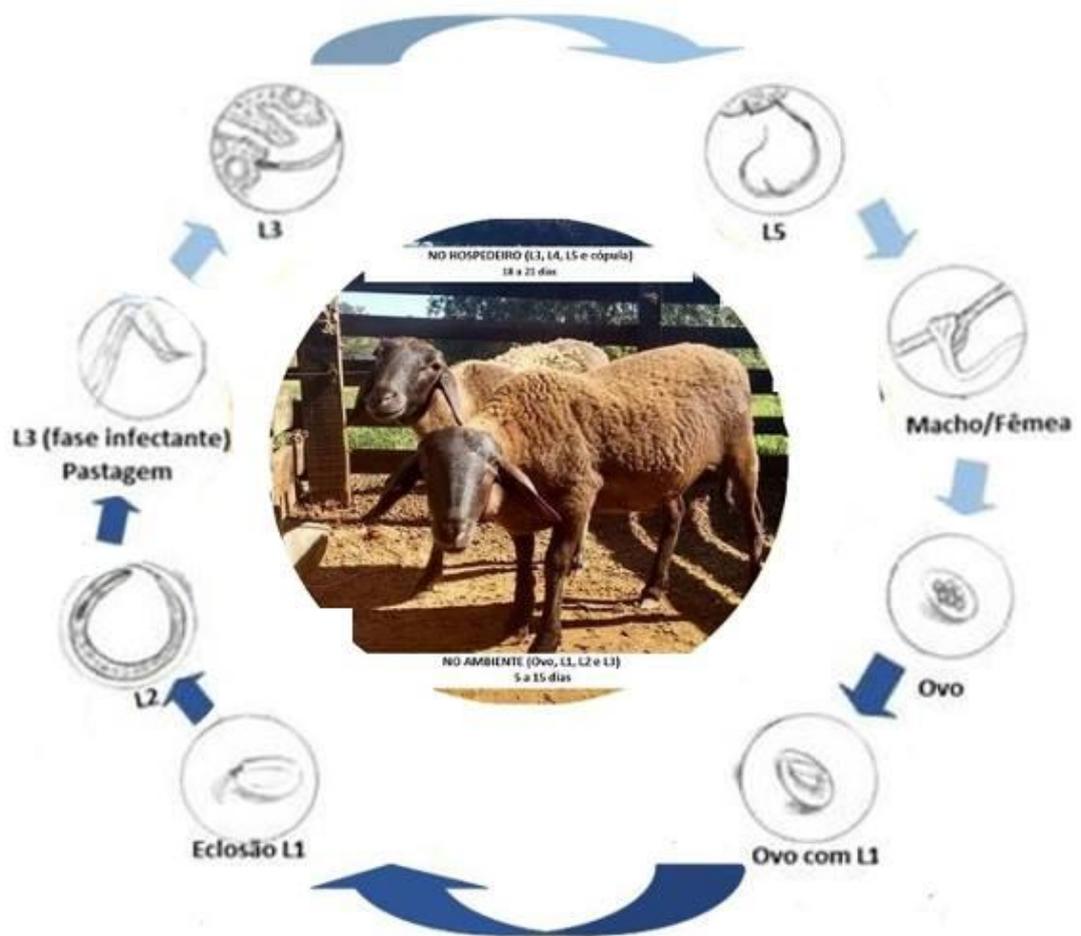
## 2.1 *Haemonchus contortus*

Os nematódeos gastrintestinais estão entre as patologias mais destrutivas que afetam a ovinocultura. No Brasil, o gasto com sanidade animal chega à casa de 600 milhões de dólares ao ano, e 29% destes são gastos com parasiticidas (MOLENTO; VERISSIMO, 2003).

Dentre os nematódeos que prejudicam a ovinocultura, a espécie *H. contortus* é a mais prevalente, o que desperta maior preocupação (AMARANTE, 2009). Segundo a classificação taxonômica esse parasita pertence ao Filo Nematelminthes, Classe Nematoda, ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae, Gênero *Haemonchus* e espécie *Haemonchus contortus* (VIEIRA, 1989).

*H. contortus* é um parasita de hábito hematófago que habita o abomaso de ovinos. Seus principais sinais clínicos são anemia severa caracterizada por palidez das mucosas, perda de peso e edema submandibular, conhecido popularmente como papeira. Em casos de infecções mais intensas, onde a carga parasitária atinge cerca de 30.000 parasitas, ovinos aparentemente saudáveis podem morrer repentinamente de gastrite hemorrágica grave, denominada neste caso de hemoncose hiperaguda (TAYLOR, et al. 2010).

O ciclo de vida dessa espécie envolve uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária (Figura 1). A fase de vida livre é caracterizada pelo desenvolvimento dos ovos até larvas infectantes e ocorre nas pastagens. A fase parasitária ocorre quando o animal ingere larvas infectantes, as quais no abomaso sofrem evolução e ao se tornarem adultos iniciam a reprodução. A fase de vida livre inicia-se com a passagem de ovos nas fezes de animais contaminados e os mesmos são depositados no ambiente. No ambiente a larva de primeiro estágio ( $L_1$ ) se desenvolve dentro do ovo e é liberada após a eclosão. A larva cresce e passa para o segundo estágio ( $L_2$ ) e depois para o terceiro estágio ( $L_3$ ), o qual se torna infectante. Esta larva infectante, após ser ingerida pelo animal chega até o abomaso e passa então para a fase parasitária. A evolução da larva desde o ovo até a fase infectante ocorre geralmente de cinco a sete dias (PADILHA, 1996).



**Figura 1.** Ciclo de vida do parasita gastrointestinal de pequenos ruminantes *Haemonchus contortus*. O animal deposita através das fezes os ovos, os ovos liberam a fase de L<sub>1</sub> na pastagem, passa para a fase de L<sub>2</sub> e atinge a fase de L<sub>3</sub> (fase infectante), após ingerida a fase infectante se aloja no abomaso do ruminante e transforma-se em L<sub>4</sub> e após isso em L<sub>5</sub> fase reprodutiva, recomeçando assim o ciclo.

Como o ciclo de vida desse parasita é rápido e a taxa reprodutiva alta, o controle é dificultado. A principal medida de controle desta nematodiose ainda é a utilização de medicamentos sintéticos associados a práticas de manejo, no entanto, o uso contínuo e inadequado desses produtos tem provocado o fenômeno da resistência parasitária. Com isso, a ocorrência de nematódeos de ovinos resistentes aos medicamentos tem sido relatada em várias regiões do Brasil (RAMOS et al., 2002; SCZESNY-MORAES et al., 2010). Além disso, os resíduos de compostos químicos eliminados com as excreções dos animais apresentam sérios efeitos ao meio ambiente (GILL, 1996; LEJAMBRE, 1993). Frente a essa situação a busca de novas alternativas como a fitoterapia e os produtos biotecnológicos apresentam-se

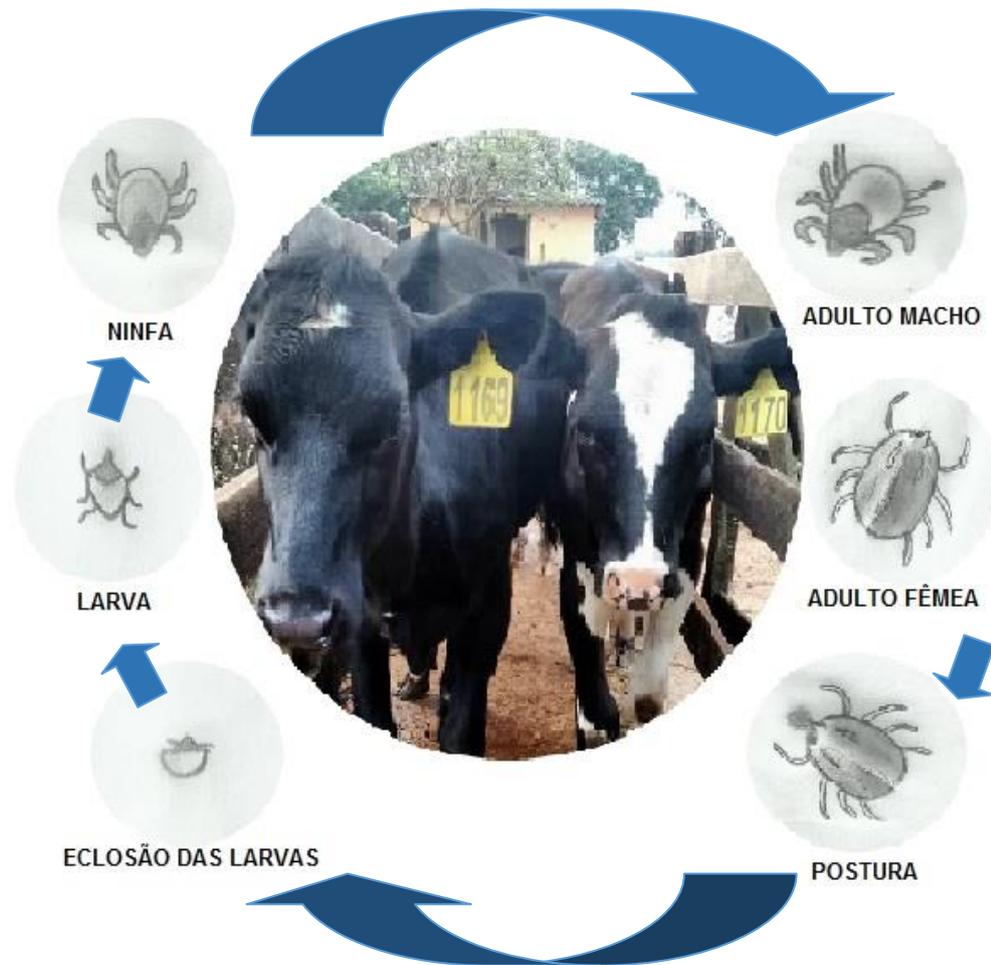
como uma alternativa e desperta o interesse por pesquisas científicas relacionadas a essa área para possível desenvolvimento de produtos.

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

*R. (B.) microplus*, conhecido popularmente como carrapato do boi, é classificado taxonomicamente, segundo Canestrini 1887 e modificado por Murrell e Barker (2003) como pertencente ao Filo: Arthropoda, Classe: Arachnida, Subclasse: Acari, Ordem: Ixodida, Família: Ixodidae, Subfamília: Rhipicephalinae, Gênero: *Rhipicephalus*, Sub-gênero: *Boophilus* e Espécie: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Esse ectoparasita foi originado na Ásia e disseminou-se pelo mundo, com maior incidência principalmente em rebanhos da América, África, Ásia e Austrália sendo responsável por grandes prejuízos econômicos (GONZALES et al., 1975; NARI, 1995). Segundo Grisi et al. (2002) os prejuízos estimados por essa espécie no Brasil ficavam na casa dos dois bilhões de dólares ao ano, já no ano de 2014 esse valor dobrou para quatro bilhões de dólares (GRISI et al., 2014). Esses prejuízos ocorrem devido ao seu hábito hematófago, estima-se que apenas um carrapato bovino seja capaz de sugar uma média de 2 a 3 mL de sangue do seu hospedeiro causando perda de peso, anemia e causando quedas na produção de leite e carne (GONZALES et al., 1975), além disso, as marcas causadas por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato diminuem a qualidade do couro afetando diretamente o seu valor comercial (SEIFERT et al., 1968). *R. (B.) microplus* também é um dos principais transmissores de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, que causam a popular tristeza parasitária bovina, podendo levar animais jovens à morte (McKOSKER, 1981).

Durante a fase parasitária uma única fêmea é capaz de ovipor uma grande quantidade de ovos, cerca de 5.000 ovos. O ciclo de vida divide-se em duas etapas uma fase parasitária e uma fase de vida livre no ambiente (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ocorre a cópula entre o macho e a fêmea da espécie, a fêmea se torna ingurgitada e se desprende do animal. No ambiente a teleógina realiza a postura dos ovos, esses ovos eclodem e se tornam larvas e buscam um hospedeiro para se fixar e alimentar-se transformando-se em ninfa até atingir a fase reprodutiva reiniciando o ciclo.

Na fase parasitária, *R. (B.) microplus* permanece por um período médio de 22 dias sobre um único hospedeiro, morfologicamente nessa fase o carrapato possui três variações distintas conhecidas por larva, ninfa e adulto. A larva possui três pares de pernas e apresenta-se muito ativa, pois nessa fase ocorre a busca por um hospedeiro para se fixar e introduzir o hipostômio que será responsável pela alimentação (GONZALES et al., 1974). Após se alimentar a larva inicia o processo de crescimento tegumentário e desenvolvimento, então passa por um período em inércia e, entre o quarto ou quinto dia, atinge a fase de metalarva. No sexto dia adquire uma nova estrutura, mais um par de patas sendo considerada então uma ninfa, que dura de dois a quatro dias. A ninfa sofre alterações no exoesqueleto, se tornando metaninfa. Ao décimo segundo dia o indivíduo é considerado adulto com

seu sexo já definido, ocorre então o início da maturação sexual e em torno do 17º dia já estão aptos à cópula.

As fêmeas, após serem fecundadas, passam de metaninfa para neóquina em um período médio de 17 dias. Em seguida, em um período de três dias, passam a partenógina (parcialmente ingurgitada) e, em mais dois dias, à teleógina (ingurgitamento máximo) (GONZALES et al., 1974). Nota-se um crescimento mais acentuado do tegumento nessa fase, e a alimentação intensifica-se nas últimas horas próximas ao ingurgitamento completo, ao ponto de apresentarem um tamanho cerca de dez vezes superior ao dos machos. Aos 22 dias, a maioria das fêmeas caem ao solo. Os machos podem permanecer no bovino por mais de 38 dias fecundando inúmeras fêmeas (GONZALES et al., 1974).

A fase não parasitária compreende os estádios de fêmea adulta (teleógina), ovo e larva infestante. A fêmea adulta fecundada, ao desprender-se do bovino, procura um local no solo para efetuar a postura. Em condições adequadas de temperatura (26-28°C) e umidade (~80%) a postura se inicia no terceiro dia após a queda. Após a postura, a fêmea apresenta uma coloração mais amarelada chegando à morte após o término da oviposição. A eclosão dos ovos se inicia a partir da quarta semana após o início da postura.

No meio ambiente, este processo pode ser mais longo, sendo uma forma estratégica de sobrevivência do parasita frente às adversidades climáticas. As larvas necessitam de um período de maturação médio de uma semana para estarem aptas a fixarem-se no hospedeiro e continuarem o desenvolvimento. Após esse período, deslocam-se às extremidades da vegetação para alcançarem mais facilmente o bovino. Nessa fase de larva infestante, elas podem sobreviver por até 60 dias (GONZALES et al., 1974). Com tantos prejuízos e alto índice reprodutivo, o controle do carrapato é uma das preocupações dos produtores e esse controle ainda é realizado basicamente por meio de produtos químicos comerciais. No entanto, o uso incorreto dos carrapaticidas (subdose, preparo inadequado e aplicação mal feita) faz com que os carrapatos não morram após o contato com o produto e os sobreviventes transmitem à prole as informações genéticas para a resistência. Sendo assim, a busca de alternativas como extratos vegetais ativos apresenta-se como uma alternativa para o controle e merece estudos mais detalhados.

### 2.3 *Rhipicephalus sanguineus*

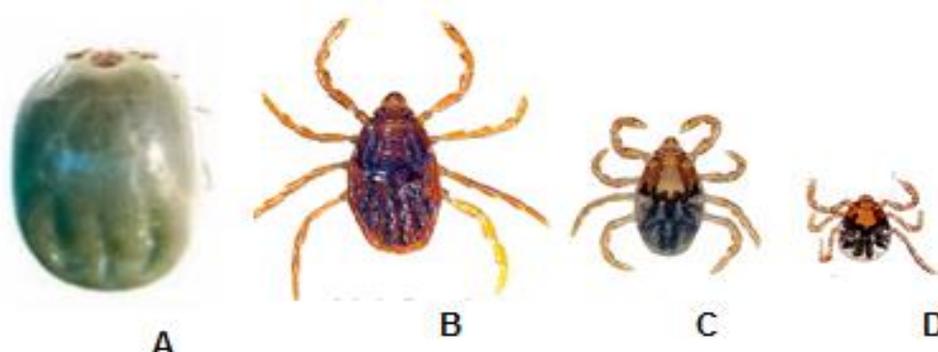
O carrapato *R. sanguineus* está presente em todos os continentes parasitando primariamente o cão doméstico. Originado na região Afrotropical, atualmente possui distribuição cosmopolita devido a ações migratórias humanas que levavam consigo o principal hospedeiro dessa espécie, o cão doméstico (WALKER et al., 2000). Quanto à introdução de *R. sanguineus* nas Américas, acredita-se que tenha ocorrido durante a colonização europeia no final do século XV (LEONARD et al., 2002).

No que se trata de ectoparasitas de cães, *R. sanguineus* e a pulga são considerados como os de maior incidência e importância no Brasil. Isto pode ser observado pela grande atenção com que a indústria farmacêutica veterinária trata esse problema. No mercado podem ser encontrados inúmeros produtos e diversas formulações destinadas ao seu controle, representando uma cifra considerável no faturamento da linha veterinária das indústrias farmacêuticas brasileiras. Embora não seja comum, há relatos em diversos países, inclusive no Brasil, dessa espécie parasitando humanos (GODDARD, 1989; DANTAS-TORRES et al., 2006).

Além dos danos diretos causados pelo parasitismo, tais como anemia, desconforto e lesões, ele também é vetor de patógenos como a bactéria *Ehrlichia canis* e dos protozoários *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* e *Hepatozoon canis* (GROVES et al., 1975; SMITH et al., 1976; GOTHE et al. 1989). Além disto, pode estar envolvido na transmissão de riquetsias para humanos no Velho Mundo (especialmente *Rickettsia conorii*). No México e Estados Unidos tem sido incriminado como vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa das montanhas rochosas (BUSTAMANTE; VARELA, 1947; DEMMA et al., 2006 ou 1998?). Alguns trabalhos também são sugestivos da possibilidade da sua participação na transmissão do agente causador da leishmaniose visceral canina, embora até o presente essa associação não tenha sido confirmada cientificamente (COUTINHO et al., 2005).

Como os outros carrapatos da família Ixodidae, o *R. sanguineus* apresenta três formas parasitárias dentro de seu ciclo de vida: larva, ninfa e adulto, este último é o único estágio com dimorfismo sexual. Cada estágio parasita o hospedeiro por alguns dias (3 a 7 dias para larvas e ninfas, 5 a 10 dias para fêmeas adultas e mais

de 15 dias para machos adultos), quando se alimenta principalmente de sangue, mas também de linfa e restos tissulares da derme e/ou epiderme lesada por diversas enzimas proteolíticas secretadas pela saliva do carrapato. No final do período parasitário, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para fazer, no ambiente, a ecdise para o próximo estágio evolutivo, sendo ninfas e adultos, respectivamente. (LABRUNA, 2004) (Figura 3).



**Figura 3.** Formas de vida do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A) Visão dorsal da fêmea ingurgitada; B) Visão dorsal da fêmea adulta; C) Visão dorsal da ninfa e D) Visão dorsal da larva. (Adaptado a partir de [http:// www.tickcounter.org/tick\\_identification](http://www.tickcounter.org/tick_identification)).

As fêmeas ingurgitadas, que foram fertilizadas pelos machos sobre o hospedeiro, se desprendem deste para fazer a postura de ovos no ambiente. Cada fêmea pode colocar de 1000 a 3000 ovos, que depois de incubados por algumas semanas, darão origem às larvas. Os machos, que ficam sobre o hospedeiro por vários dias ou semanas, não ingurgitam ou não aumentam nitidamente de tamanho, mas podem fertilizar várias fêmeas neste período. A duração das fases de desenvolvimento em vida livre (ecdise, postura e incubação dos ovos) pode variar de poucas semanas a alguns meses, sendo inversamente proporcional à temperatura ambiente. A viabilidade dessas formas de vida livre é influenciada principalmente pelas condições microclimáticas (especialmente umidade relativa) do local onde o carrapato ingurgitado se encontra. Não há estudos que evidenciem com clareza a duração de cada geração de *R. sanguineus* em condições naturais no Brasil (LABRUNA, 2004).

Os estágios ingurgitados de *R. sanguineus* apresentam geotropismo negativo após se desprenderem do hospedeiro, fazendo com que as fases de ecdise, postura

e incubação dos ovos se passem acima do nível do solo onde o cão vive (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Tal comportamento é extremamente diferente de outras espécies de carrapatos do Brasil (ex. *Amblyomma cajennense*, *R. (B.) microplus*, *Dermacentor nitens*), cujas formas ingurgitadas apresentam geotropismo positivo após se desprenderem de seus hospedeiros. O comportamento geotrópico negativo exercido pelos estágios ingurgitados de *R. sanguineus* muito importantes no sentido de favorecer para que uma população de carrapatos colonize residências em uma determinada área, propiciando que os carrapatos atravessem barreiras físicas verticais, tais como muros e paredes (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

#### **2.4 Métodos e alternativas de controle de endoparasitoses e ectoparasitoses**

As endo e ectoparasitoses são responsáveis por elevadas perdas na pecuária mundial, assim como causadoras de sérios problemas sanitários quando se trata de animais domésticos.

Na ovinocultura, atividade em expansão no país e no mundo, o maior problema está relacionado com as endoparasitoses. Esses parasitas limitam consideravelmente o rendimento econômico desses animais e estão presentes durante a vida toda dos mesmos afetando a produção e qualidade da carne e da lã (PINHEIRO, 1979). Assim como os ectoparasitas que apresentam resistência aos acaricidas disponíveis, os nematódeos também possuem relatos e necessitam de métodos alternativos. Os métodos alternativos para controle de nematódeos gastrointestinais são semelhantes aos ectoparasitas como o método de rotação de pastagem, homeopatia, fitoterapia, porém a nutrição e o método famacha nessa atividade também são grandes aliados para os produtores.

Na bovinocultura estima-se que o maior problema sejam os ectoparasitas, que dentre eles destacam-se as moscas, larvas de moscas e principalmente o carrapato *R. (B.) microplus*. (LEITE et al., 2011). Essa espécie segundo Grisi (2014) é responsável por prejuízos estimados de quatro bilhões de dólares ao ano somente no Brasil. Esse prejuízo se dá devido ao hábito hematófago, intensa espoliação, perda de peso, queda da produtividade e baixa imunidade, tornando o animal vulnerável a outras doenças podendo inclusive levar a óbito (HORN et al., 1983). Adicionalmente os gastos são causados pelo custo de produtos químicos

potencialmente tóxicos para quem manipula, ao ambiente e ainda com custos decorrentes de mão de obra e instalações. Rocha (2005) conclui em seu estudo que o uso de produtos carrapaticidas é excessivo e sem base metodológica, o que tem originado indivíduos resistentes. Há uma grande gama de carrapaticidas disponíveis no mercado, entretanto há pouca variedade nas bases químicas fazendo com que quando o parasita apresenta resistência a uma base química, ele será resistente a grande número de produtos disponíveis.

O método de rotação de pastagem consiste na retirada dos animais da pastagem em que comumente vivem até que as larvas sejam eliminadas do ambiente por fatores ambientais. Dependendo da região uma média de 40-60 dias são necessários (GOMES, 2003). Gauss e Furlong (2002) concluíram que, em média, são necessários 60 dias de vedação da pastagem de *Brachiaria decumbens* no verão para que a quantidade de larvas infestantes de *R. B. microplus* na pastagem fosse reduzida a níveis baixos. Estima-se que são necessários 82,6 dias de exposição ao ambiente para que todas as larvas infestantes morram o que concorda com os dados de Furlong (1998) que demonstraram um tempo necessário para redução de infestação, para 10 ou menos larvas, superior a 75 dias, para vedações que iniciaram em janeiro e fevereiro. Estudo realizado na Austrália por Donald et al. (1978) observou que as larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos são capazes de sobreviver nas pastagens por seis meses ou mais, o período preciso depende muito das condições climáticas. Um empecilho encontrado nesse método é que pequenos produtores não possuem piquetes extras para utilizar na rotação tornando-se assim inviável.

Outro ectoparasita que gera preocupação por parasitar cães domésticos e ser o possível transmissor de doenças zoonóticas como a febre maculosa do mediterrâneo é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* que na maioria das vezes parasita cães (RAOULT; ROUX, 1997). A utilização de apenas carrapaticidas comerciais no controle desse aracnídeo está cada dia menos viável em termos práticos e econômicos. O uso inadequado e frequente acaba por originar o fenômeno da resistência, aumentando assim os prejuízos e tornando necessária a busca por métodos alternativos. Para o carrapato do boi, os métodos alternativos existentes são rotação de pastagem, fitoterapia, controle biológico e homeopatia. Já

para o carrapato do cão destaca-se o método de dedetização do ambiente, fitoterapia, vacina e homeopatia.

Buscando métodos mais viáveis economicamente, potencialmente seguros e de baixo dano ambiental, destaca-se a fitoterapia.

A fitoterapia é comumente utilizada pela humanidade e o Brasil conta com uma grande variedade de biodiversidade o que confere um grande potencial nesse segmento, porém no segmento veterinário esse segmento ainda é pouco explorado, sendo ele responsável por apenas 1% do mercado de fitoterápicos, contudo esse setor cresce cerca de 25% ao ano. Hoje, os fitoterápicos de uso veterinário já representam 6,7% do mercado total de medicamentos (QUINTELA, 2004). Diferentemente das estruturas químicas sintéticas que permitem o desenvolvimento de resistência rapidamente, os extratos vegetais têm a vantagem de causar um desenvolvimento lento de resistência. Além disso, podem ser direcionados a espécies-alvo, são biodegradáveis e podem ser inócuos ao ambiente (CHAGAS, 2004).

Outro método alternativo empregado no tratamento de endo e ectoparasitoses é a homeopatia. No Brasil a homeopatia é reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina desde 1980 e tornou-se especialidade a partir de 1990 (MORAES, 2003) e baseia-se no conceito “a cura pelo seu semelhante” quer dizer que o semelhante deve ser curado com o semelhante, ou seja, o organismo doente deve ser curado com o remédio cujos sintomas desenvolvidos no indivíduo sadio sejam idênticos ou o mais semelhante possível com aqueles do indivíduo doente (TIEFENTHALER, 1996). Ainda na homeopatia, Magalhães Neto et al. (2004) testaram a eficiência do medicamento homeopático (C&MC Glóbulos® - Laboratório Arenales) preparado de acordo com as normas da farmacopéia homeopática, possuindo veículo alcoólico contendo agentes parasitários infestantes e infectantes (nosódios) no controle de carrapatos em bovinos de leite mestiços com grau de sangue predominantemente *Bos taurus*. Aliado aos prejuízos causados pelo uso de produtos químicos, tanto para o animal, quanto para o ecossistema, tem-se a relação custo-benefício, o que torna o uso da homeopatia mais vantajoso, não só como método auxiliar, mas como método de escolha para obtenção de produtos sem resíduos, que têm boa aceitação no mercado e agregam valor (MAGALHÃES NETO et al., 2004).

O método Famacha foi um método de controle de verminose em pequenos ruminantes desenvolvido por Van Wyk et al. (1997) a fim de permitir um diagnóstico fácil e sem custos do grau de anemia do animal e assim realizar o tratamento. Existe uma correlação significativa entre a coloração da mucosa aparente e o volume globular que permite identificar os animais capazes de suportar uma infecção por *H. contortus* ou não. Esse método permite que sejam vermifugados apenas os animais que apresentam palidez na mucosa dos olhos e assim proporciona uma economia média de 58,4% nos custos com antihelmínticos, reduzindo a contaminação por resíduos e prolongando a vida útil das moléculas disponíveis (BATH; VAN WYK, 2001). Ainda para *H. contortus*, uma alternativa muito utilizada é a suplementação alimentar, essa têm mostrado bons resultados em animais que receberam alimento concentrado. Bricarello et al. (2005) demonstraram que cordeiros alimentados com concentrado de elevado teor de proteína albergam menor carga parasitária, tem maior Volume Globular (VG) e maior concentração de Proteína Plasmática (PP) que cordeiros alimentados com baixos níveis de proteína, portanto, nutrição favorece animais resistentes ou resilientes a infecção por *H. contortus* assim como auxilia o animal a suportar altas taxas de infestação por ectoparasitos.

## **2.5 *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.**

*A. satureioides*, popularmente conhecida por marcela, marcela-do-campo, marcela-da-terra, macela, camomila nacional e macela amarela (ALMEIDA, 1993; LORENZI 2002), é uma espécie comum no Brasil ocorrendo principalmente de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, sendo uma erva anual pertencente a família Asteraceae (DE SOUZA et al., 2002). Quanto à sua estrutura e morfologia, possui ramificações de até 1,5 m de altura coberta de pilosidades brancas, suas folhas são alternadas, inteiras, sésseis, lanceoladas de até 12 cm de comprimento por 1,8 cm de largura. Possui inflorescências de cor amarelo dourado do tipo capítulo. As flores centrais são hermafroditas e geralmente são de uma a duas, já as flores marginais são quatro ou cinco (Figura 4).



**Figura 4.** Primeiro cultivar de *A. saturoides* do Brasil desenvolvido pelo Professor Dr. Ílio Montanari no Campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) (disponível em [http://www.unicamp.br/unicamp\\_hoje/ju/maio2009/ju430\\_pag03.php](http://www.unicamp.br/unicamp_hoje/ju/maio2009/ju430_pag03.php)).

É muito conhecida na medicina popular brasileira como agente digestivo, antiespasmódico, anti-inflamatório e reduzir os níveis de colesterol sanguíneo (RITTER et al. 2002; SIMÕES, 1984. Em estudo realizado por Vendruscolo et al. (2005) essa espécie aparece entre as 10 plantas medicinais mais utilizadas na forma de chá na medicina popular por pessoas de uma comunidade de Porto Alegre, RS.

Estudos têm demonstrado ações antioxidante (DESMARCHELIER et al., 1998), anti-HIV (ADAMOLI, 1998), anti-proliferativa de células (PESSOA, 2000), anti-herpéticas (GARCIA et al., 1999), analgésicas e sedativa (SIMÕES et al., 1988), antimicrobiana (DUARTE et al., 2004), antiviral (GARCIA et al., 1995), imunomodulatória (SANTOS et al., 1999), colerética e hepatoprotetora (LOPEZ et al., 1996), e anti-inflamatória (FALCÃO et al., 2005). *A. saturoides* também mostrou atividade mutagênica *in vitro* contra *Salmonella* e *Escherichia coli* podendo estar ligado ao seu uso popular na disenteria, diarreia e infecções intestinais (ALMEIDA, 1993). Devido à importância histórica desta planta, ela foi incluída na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (BRANDÃO et al., 2006).

Desde os anos 80 essa espécie é alvo de estudos farmacológicos e clínicos visando a sua validação. Em experiências realizadas com animais foram comprovadas as suas propriedades analgésicas, anti-inflamatória, relaxante muscular e para problemas gastrointestinais, sem efeito tóxico. Análises químicas mostraram que essa espécie vegetal é rica em flavonoides incluindo alguns novos sesquiterpenos e monoterpenos sendo muitas vezes os responsáveis pelas

atividades relatadas (LORENZI; MATOS, 2002). Outros estudos demonstraram que o extrato etanólico das inflorescências de macela tem como constituintes principais os flavonóides quercetina, 3-O- metilquercetina e luteolina sendo também relatadas a presença de clorogênico, isoclorogênico e ácido caféico, sendo esses constituintes de extrema importância para estudos químicos e biológicos (SIMÕES, 1984). O óleo essencial por sua vez possui alfa pineno,  $\delta$ -cadineno, trans-cariofileno, oxido de cariofileno e sesquiterpeno como constituintes principais (LUCAS et. al. 2009), sendo esses os possíveis responsáveis pelos efeitos farmacológicos encontrados.

### 3. OBJETIVO

O estudo buscou avaliar o efeito antiparasitário de derivados vegetais obtidos das inflorescências de *A. satureioides* sobre carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e o parasita gastrointestinal de ruminantes *Haemonchus contortus*.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir extrativos vegetais (extrato e óleo essencial) a partir das inflorescências de *A. satureioides*;
- Analisar fitoquimicamente os extrativos obtidos;
- Avaliar *in vitro* o potencial nematicida dos extrativos frente ao nematódeo gastrointestinal de ruminantes *H. contortus*;
- Avaliar *in vitro* o potencial acaricida dos extrativos frente às espécies de carrapato *R. (B.) microplus* e *R. sanguineus*;
- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial e do extrato etanólico de *A. satureioides* frente à linhagem celular de queratinocitos humanos imortalizados (HaCaT)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção do material vegetal

Inflorescências de *A. saturoioides* foram obtidas por meio de um convênio firmado com o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas sob responsabilidade do Prof. Dr. Ílio Montanari Junior (Figura 5). O plantio foi desenvolvido no campo experimental do CPQBA sob as coordenadas geográficas 22 48' S; 47 07' O, clima (Koeppen) Cwa-tropical com verões úmidos e invernos secos, solo latossolo vermelho típico. Exsicatas depositadas no herbário do CPQBA com os Vouchers nº 10, 146, 783, 784 e 785 os quais representam diferentes genótipos, pois se trata da primeira cultivar brasileira desenvolvida a partir de 15 gerações. Foram selecionadas sementes de diversas regiões do país a fim de promover o melhoramento e domesticação da espécie. Durante o cultivo não foram registrados ataques de insetos nem doenças. O material vegetal foi seco a temperatura de 40° C em estufa com circulação forçada de ar.

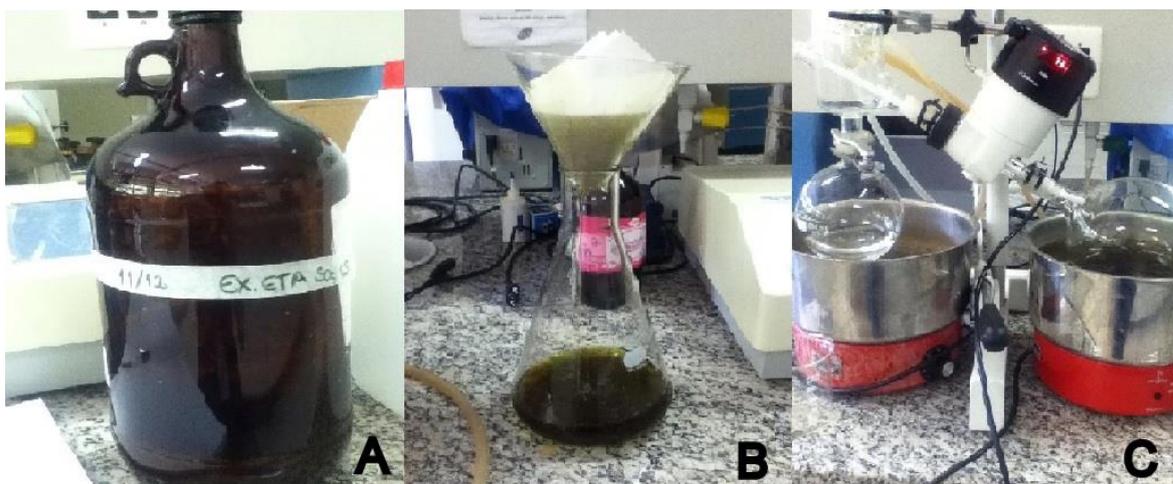


**Figura 5.** Inflorescências de *A. saturoioides* secas a temperatura de 40° C em estufa com circulação de ar fornecidas pelo Professor Dr. Ílio Montanari do CPQBA da UNICAMP

### 4.2. Obtenção do extrato etanólico

Foram preparados extratos etanólicos a partir das inflorescências utilizando-se o método de maceração. Foram pesados 100 gramas de inflorescências obtidas a partir das partes aéreas e em seguida foram trituradas em moinho de facas. O pó foi

colocado em um frasco âmbar onde foram adicionados 2 litros de álcool etílico absoluto. O farmacógeno permaneceu em contato com o solvente por cerca de sete dias. Após, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório à pressão reduzida (Figura 6). Adicionou-se solvente (etanol) para remoção do extrato concentrado, transferindo-se para secagem em capela química de exaustão. O extrato seco foi pesado e acondicionado em frasco âmbar.



**Figura 6.** Produção de extrato etanólico a partir de inflorescências de *A. saturoioides*. A) Frasco âmbar contendo o farmacógeno e etanol absoluto, B) Filtração em papel filtro, C) Concentração em evaporador rotatório.

#### 4.3. Obtenção de óleo essencial

O óleo essencial foi obtido através da técnica de hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger modificado (Unividros®) com manta aquecedora com regulador de temperatura Q321A28 (Quimis®) (WASICK, 1963). A cada extração, 100 g de inflorescências foram colocadas em um balão de fundo redondo juntamente com 500 mL de água, que permaneceu em contato com a manta aquecedora e acoplado ao aparelho de Clevenger por cerca de 4 h. O óleo extraído foi coletado com o auxílio de éter etílico para a remoção total do óleo do aparelho.

O conteúdo recuperado foi colocado em um béquer onde foi seco com sulfato de sódio anidro para a separação do óleo da água residual. O óleo extraído foi mantido em frasco de vidro vedado sob refrigeração (Figura 7).



**Figura 7.** Extração de óleo essencial das inflorescências de *A. saturoioides* A) Pesagem das inflorescências para cálculo do rendimento B) Extração em aparelho Clevenger modificado.

#### 4.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS

Foram realizadas análises fitoquímicas com o intuito de determinar a presença de metabólitos secundários de acordo com metodologias clássicas propostas por Costa (2001).

##### 4.4.1 Flavonóides

Em um béquer adicionou-se 3 g da droga vegetal pulverizada e 20 mL de éter de petróleo. Aqueceu-se em Banho-Maria por 10 minutos. Filtrou-se ainda a quente, evaporando-se posteriormente o filtrado até a secagem. Por fim, ressuspendeu-se com 10 mL de etanol, obtendo-se assim a solução etanólica do extrato.

##### 4.4.1.1. Reação de Shinoda

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL da solução etanólica obtida no procedimento 4.4.1 e juntamente com esse extrato adicionou-se aos poucos fragmentos de magnésio metálico e gotas de HCL concentrado. Determinou-se como resultado positivo o aparecimento de coloração róseo ou vermelha após o

desprendimento de hidrogênio nascente indicativo de presença de flavonas, flavonóis e flavononas.

#### **4.4.1.2 Reação de Taubock**

Em banho-maria evaporou-se 3 mL do extrato até a secagem. O resíduo obtido foi esfriado e umedecido com gotas de acetona, após isso adicionou-se também cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Evaporou-se em banho-maria novamente até a secagem evitando aquecimento prolongado. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e observou-se sob luz UV. Determinou-se como resultado positivo para flavononas, o aparecimento de coloração fluorescente amarelo esverdeada.

#### **4.4.1.3 Reação de Pew**

A partir de 3 mL do extrato final evaporados até a secagem, foram adicionados ao resíduo 3 mL de metanol e uma porção pequena de zinco metálico. Nessa solução colocou-se cerca de três gotas de HCl concentrado. Em caso positivo aparecerá coloração vermelha.

#### **4.4.1.4 Reação do cloreto férrico**

Foram adicionadas a 1 mL do extrato final algumas gotas de  $\text{FeCl}_3$  a 2%. O resultado positivo é o surgimento de coloração verde, amarelado ou violáceo dependendo do composto fenólico presente.

#### **4.4.1.5 Reação do cloreto de alumínio**

Gotas de extrato foram adicionadas sobre diferentes áreas de um papel filtro. Colocou-se sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio 5% em etanol. Para o resultado positivo da presença de flavonóides observa-se, sob luz UV, a intensificação da fluorescência verde amarelada.

#### **4.4.2 Antraquinonas**

#### **4.4.2.1 Antraquinonas livres**

Um grama da droga vegetal em pó foi colocado juntamente com 10 mL de éter etílico em um tubo de ensaio e foi agitado. Nessa solução foi adicionado 1 mL de amônia diluída. Em caso de resultado positivo após agitação a camada aquosa deverá tornar-se rósea.

#### **4.4.2.2 Glicosídeos antraquinônicos (reação de Borntraeger)**

Ao pó anterior, seco, adicionou-se 20 mL de água e aqueceu-se à ebulição por 5 min. Após resfriamento, filtrou-se a solução. Ao filtrado juntou-se 10 mL de HCl, 1N, e 3 mL de água oxigenada 30%. Após resfriamento, filtrou-se a solução. Extraíu-se por duas vezes com 5 mL de éter etílico. Juntaram-se as fases etéreas e agitou-se com 3 mL de amônia diluída. A camada aquosa deverá tornar-se rósea em caso positivo.

#### **4.4.2.3 Glicosídeos cardiotônicos**

Em um béquer foram colocados 5 g de droga vegetal moída, adicionou-se 50 mL de etanol 70%. O conteúdo do béquer foi aquecido em baixa temperatura em banho-maria durante 10 minutos. Após isso o conteúdo foi esfriado e filtrado completando o volume até 30 mL, lavando o resíduo e o filtro com etanol 70%. Na purificação, ao filtrado adicionou-se 30 mL de água e 15 mL de acetato de chumbo a 10%. Agitou-se bem e filtrou-se. O filtrado foi transferido para um funil de separação, onde foram realizadas duas extrações sucessivas, com 15 mL de clorofórmio cada vez. Após juntar as fases orgânicas, tratou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se até a metade do volume.

#### **4.4.3 Reações de caracterização de glicosídeos cardiotônicos**

##### **4.4.3.1 Reação de Legal**

O extrato clorofórmico das inflorescências de *A. saturoides* foi evaporado e 2 mL desse extrato reservado em um tubo de ensaio. Dissolveu-se o resíduo em 1 mL de piridina e adicionou-se 0,5 mL de NaOH a 10% e 0,5 mL de nitroprussiato de sódio 10%. Deverá aparecer uma coloração vermelha intensa, se positivo.

#### **4.4.3.2 Reação de Kedde**

O extrato das inflorescências de *A. saturoioides* foi evaporado e 2 mL desse extrato reservado em um tubo de ensaio. Dissolveu-se o resíduo com 0,5 mL de reagente de Kedde (ácido 3-5 dinitrobenzóico 1% em MeOH) e adicionou-se 1 mL de uma mistura de NaOH 10% em MeOH 1:1 (v/v), preparada pouco antes do uso. Quando positivo deverá aparecer uma coloração vermelha violácea até castanho.

#### **4.4.4 Reação com desoxi-açúcares**

##### **4.4.4.1 Reação de Pesez**

Evaporou-se 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. No tubo foi adicionado ao resíduo 1 mL do reagente de Pesez A (Xantidrol 0,5% em MeOH recente) e aqueceu-se aproximadamente 100 °C por 3 minutos. Esfriou-se e colocou-se o reagente de Pesez B (HCl a 2% em ácido acético). Deverá aparecer coloração vermelha quando positivo.

##### **4.4.4.2 Reação de Keller-Kiliani**

O que restou do extrato evaporado no tubo de ensaio foi tratado com 1 mL de ácido acético e adicionou-se 2 gotas e evaporou-se 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Tratou-se o resíduo com 1 mL de ácido acético e adicionou-se 2 gotas de FeCl<sub>3</sub> a 2%. O conteúdo foi transferido para outro tubo contendo 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Quando positivo, a zona de contato dos líquidos deverá apresentar um anel castanho avermelhado, e a camada acética deverá tomar coloração verde-azulada.

##### **4.4.4.3 Reação de Liebermann-Burchard**

Evaporou-se 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Ao resíduo, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Deverá aparecer coloração castanha quando positivo.

#### **4.4.5 Taninos**

Preparou-se um decocto (15 min.) com 5 g da droga vegetal pulverizada e 100 mL de água deionizada. Filtrou-se e deixou-se esfriar. Esta foi denominada solução extrativa A.

##### **4.4.5.1 Reação de Gelatina**

Nessa reação, dois mL da solução A foram misturados com duas gotas de HCL diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. No caso positivo haverá formação de precipitado.

##### **4.4.5.2 Reação de sais de ferro**

Misturou-se 2 mL da solução A, com 10 mL de água deionizada e 2 a 4 gotas de solução de  $\text{FeCl}_3$  a 1% em metanol. No caso positivo aparecerá coloração azul (taninos hidrolisáveis) ou verde (taninos condensados).

##### **4.4.5.3 Reações de acetato de chumbo**

Misturou-se 5 mL da solução A com 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. Em caso positivo aparecerá formação de precipitado esbranquiçado (taninos hidrolisáveis).

#### **4.4.6 Saponinas**

Foram aquecidos 2 g do material vegetal pulverizado por 10 minutos com 10 mL de água destilada. Esfriou-se e filtrou-se para um tubo de ensaio, completando-se para 10 mL o volume final. Agitou-se o tubo no sentido do seu comprimento, vedando com uma rolha, durante 15 seg. Deixou-se em repouso por 15 min. Verificou-se em seguida o aparecimento de um anel de espuma persistente, de aproximadamente 1 cm de altura, e que não desaparece pela adição de 1 mL de HCl 2N quando positivo.

#### **4.4.7 Alcaloides**

Foram utilizados 5 g da droga vegetal pulverizada, sendo homogeneizada e alcalinizada com carbonato de cálcio a 10%. Adicionou-se 25 mL de clorofórmio e filtrou-se a mistura para um funil de separação através de papel previamente

embebido em clorofórmio, agitando o filtrado com 7 mL de HCl 2%. Separou-se a camada superior para a realização das reações de caracterização (precipitação) com os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand, colocando-se uma gota do reagente ao lado de outra da solução ácida em uma lâmina de microscópio, unindo-as posteriormente.

#### **4.4.8. Cumarinas**

Preparou-se uma solução extrativa com 5 g da droga vegetal em 20 mL de água fervida. Após filtração, adicionou-se HCl 1 M, até que fosse alcançado pH 1. A solução acidificada foi submetida à partição líquido-líquido com 10 mL de éter etílico. A fase etérea foi concentrada até metade de seu volume e a mesma foi aplicada em duas manchas sobre um pedaço de papel de filtro. Em uma das manchas foi adicionada uma gota de NaOH 1M, sendo esta observada à luz UV (365 nm); na outra mancha não foi aplicado nada. O aparecimento de fluorescência, no primeiro caso, deverá indicar a presença de cumarinas.

### **4.5. Análise cromatográfica por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)**

As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto localizada na Universidade de São Paulo sob supervisão do Doutor Alexander Alves.

#### **4.5.1 Tratamento do extrato – Reação de derivação (Sililação)**

Por se tratar de uma matriz complexa de baixa volatilidade e alguns constituintes apresentarem instabilidade térmica, o extrato etanólico de *A. saturoioides* passou pelo processo de derivação conhecido também como sililação (PELLATI; BENVENUTI, 2007). Essa etapa de preparação da amostra consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupos –OH, –SH, –NH e –COOH por grupos trimetilsilanos (TMS) ou *tert*-butildimetilsilanos (TBDMS), de modo a obter derivados com maior volatilidade e estabilidade térmica.

Exatamente 3 mg do extrato etanólico bruto proveniente das inflorescências de *A. saturoioides* foi solubilizado em 200 µL de piridina (PA ACS - Tedia), juntamente com 200 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA,

Sigma). Essa reação foi mantida a 37° C por 30 minutos em banho-maria. Em seguir as amostras derivadas foram filtradas em filtros de membranas de nylon de 13 mm x 0,22 µm (ALLCROM). Os filtrados repousaram em temperatura de ~3° C em freezer por 24 horas, sendo então analisadas por GC-FID e GC-MS.

#### 4.5.2 Análise por Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG-FID)

Para analisar o extraído pelo método de CG-FID utilizou-se um Cromatógrafo a Gás Varian CP - 3800, equipado com injetor automático Varian 8200 e detector de ionização em chama (FID). A coluna capilar utilizada foi Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

O método foi programado com as seguintes características: 140 °C (3 min) 3 °C / min 320 °C (10 min). Temperatura do injetor 260 °C. com modo de injeção splitless/split (modo de Grob). Início splitless, 0,75 min split (1/50) e 2 min split 1/20. Temperatura do detector: 320 °C Volume de amostra injetado: 1 µL.

Vazão do gás de arraste (N<sub>2</sub>): 1,0 mL/min, gás de make up (N<sub>2</sub>): 29 mL/min, ar sintético: 10 mL/min e hidrogênio: 1 mL/min. O tratamento dos dados foi efetuado no software Galaxie Chromatography Data System - Version 1.9.302.530.

#### 4.5.3 Análises CG-EM

As análises por GC-EM foram realizadas no cromatógrafo a gás Shimadzu QP- 2010 equipado com injetor automático AOC-5000 Shimadzu e interface com um espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi uma Phenomenex ZB-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm), GCMS solutions Ver. 2.5.

A temperatura do forno foi assim programada: 140°C (3 min) 3°C / min 32°C (10 min). A temperatura do injetor foi 260 °C. Modo de injeção: *splitless/split* (Grob). Início *splitless*, 0,75 min *split* (1/50), 2 min *split* 1/20, gás de arraste hélio (99,999%) a um fluxo constante de 1,3 mL/min, o volume de amostra injetado foi de 1 µL. Pressão: 114.9 kPa, velocidade linear: 43.1 cm/sec., fluxo total: 17.3. Condições MS: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa das massas de aquisição de *m/z* 40-650 Daltons.



**Figura 8.** Cromatógrafo Shimadzu QP- 2010 a gás acoplado á massas utilizado nas análises

#### 4.5.4 Tratamento e análise de dados

Os cromatogramas das análises por GC-MS foram integrados e os tR (tempo de retenção) e áreas dos picos tabulados. O cálculo do índice de retenção linear foi calculado utilizando série homóloga de *n*-alcanos C8-C40 (Sigma-Aldrich). O índice de retenção de um analito é um número, obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do analito de interesse com o tempo de retenção de dois padrões (séries homologas de hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963), Segundo a equação 1:

#### EQUAÇÃO 1

$$IR = 100.n + 100. \frac{tR_x - tR_n}{tR_{n+1} - tR_n}$$

Onde IR é o índice de retenção, n é número de carbonos do *n*-alcano anterior ao analito, tRx é o tempo de retenção do analito de interesse, tRn é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído antes do analito e tRn+1 é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído após o analito. Os índices de retenção do CG-MS, foram comparados com o banco de dados NIST e Golm Metabolome Database (Max Planck Institute). O índice de retenção é o número obtido pela interpolação do tempo de retenção do componente de interesse com os tempos de retenção de dois padrões da série

homóloga de alcanos eluídos imediatamente antes e após o componente de interesse (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

Os índices de retenção foram comparados com o banco de dados NIST.

#### **4.6. Testes *in vitro* com parasitas**

Os ovos de *H. contortus* e os ovos e larvas do carrapato da espécie *R. (B.) microplus* e os ovos do nematoide *H. contortus* foram coletados nas dependências da Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), São Carlos (SP), com supervisão da Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas. A instituição possui autorização do IBAMA SISBIO para a coleta desses parasitas. O uso de ovinos como hospedeiros é aprovado pelo Protocolo CEUA 06/2012, pois as cepas são mantidas desde 2010. Já os carrapatos da espécie *R. sanguineus* foram cedidos pelo Dr. Gustavo Seron Sanches, da Faculdade de Ciências Agronômicas e Veterinárias de Jaboticabal.

#### **4.7. Recuperação dos ovos do parasita *Haemonchus contortus***

As fezes de um animal infectado artificialmente com cepa monoespecífica de *H. contortus* foram coletadas diretamente da ampola retal do animal doador e os ovos recuperados com o uso sequencial de peneiras de acordo com Chagas et al. (2011), que é uma modificação do método de Coles et al. (1992). Foram seguidos os seguintes passos: os ovos retidos na peneira de 25  $\mu\text{m}$  foram lavados com água destilada e centrifugados a 1.100 x g/5 min em tubos de 50 mL. O sobrenadante foi descartado e a solução salina saturada foi adicionada para a ressuspensão do sedimento. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi lavado na peneira de 25  $\mu\text{m}$  e os ovos coletados foram colocados em cálice para sedimentação por duas horas. Os ovos foram quantificados por meio de 5 alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  e calculou-se o volume necessário para atingir cerca de 100 ovos. (Figura 9).



**Figura 9.** A) Coleta de fezes do animal doador. B) Maceração das fezes colhidas sobre a peneira com água aquecida. C) Transferência para a peneira de malha de menor diâmetro. D) Passagem do material para os tubos Falcon. E) Tubos Falcon com solução salina F) Ovos dos nematoides recuperados e lavados em água destilada.

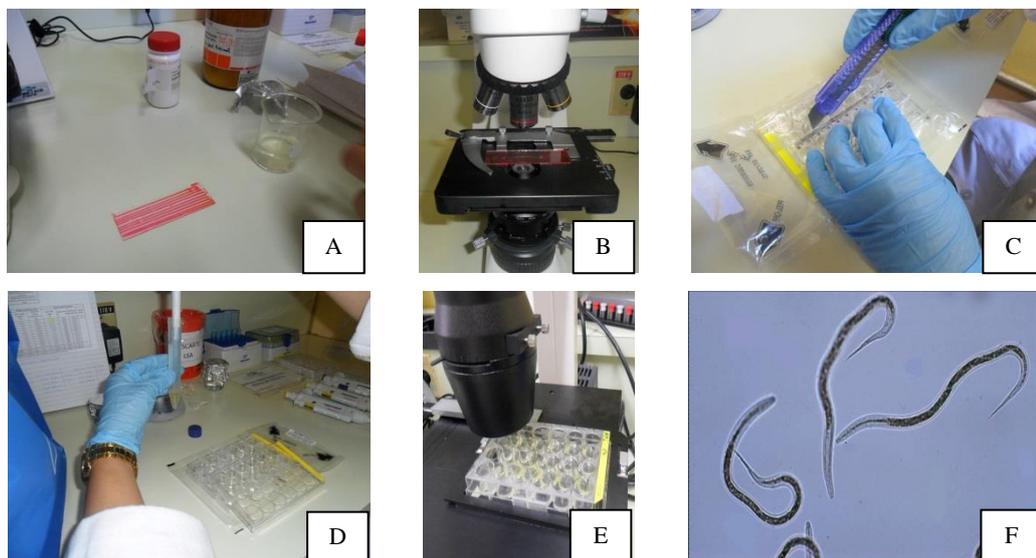
#### 4.8. Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

Este teste utiliza ovos frescos e tem a duração de sete dias. O ensaio mede a capacidade de desenvolvimento das larvas de primeiro estágio ( $L_1$ ) até as larvas de terceiro estágio ( $L_3$ ) na presença da substância-teste, seja um anti-helmíntico, seja um extrato vegetal (CHAGAS et al., 2011).

Aproximadamente 100 ovos obtidos segundo a técnica descrita acima, foram colocados em cada poço da placa de 24 poços. Foram adicionados em cada poço 80  $\mu$ l de meio nutritivo conforme Hubert; Kerboeuf, 1992 (*Escherichia coli* liofilizada (ATCC 9637 Sigma), anfotericina B (Sigma) e meio nutritivo) (e completado o volume para 250  $\mu$ L com água destilada. O material foi homogeneizado manualmente e incubado em BOD a 27°C e umidade relativa >80% por 24h para eclosão da  $L_1$ . Após este período, foram adicionados 250  $\mu$ L das concentrações do extrato etanólicos das inflorescências de *A. saturoioides* (Figura 10). As concentrações testadas do  $AS_{EtOH}$  foram de 3,12 a 0,0012 mg/mL, o  $OE_{as}$  foi testado nas concentrações de 1,25 a 0,0011 mg/mL. O controle negativo foi constituído de DMSO. Todos os testes foram feitos em seis repetições (Figura 10). As placas foram incubadas por cinco dias e após a adição de uma gota de lugol, foi realizada a contagem de  $L_1$ - $L_2$  e  $L_3$  para cálculo da Porcentagem de Inibição (Equação 2):

## EQUAÇÃO 2.

Porcentagem da inibição do desenvolvimento =  $[(\text{Número de } L_3 / \text{Número de } L_1 + L_2 + L_3 \text{ no poço}) \times 100]$



**Figura 10.** A) Lâmina riscada horizontalmente para quantificação dos ovos recuperados. B) Leitura em microscópio óptico de cinco gotas de 10 µL para quantificação. C) Placa de cultura decélulas de 24 poços riscada horizontalmente para orientar a leitura. D) Preparo do teste de desenvolvimento larvar com ovos, água, meio nutritivo e produto a ser testado. E) Leitura do teste após sete dias. F) Larvas em estágio de  $L_3$ .

### 4.9. Teste de eclosão de ovos (TEO)

Nesse teste também foi utilizado o protocolo padronizado no laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste (CHAGAS et al., 2011). Esse ensaio avaliou a eclodibilidade dos ovos do parasita na presença da substância teste. O procedimento realizado foi o mesmo do teste de desenvolvimento larvar, porém nesse teste utilizaram-se concentrações de 100 mg/mL a 1,56mg/mL para  $AS_{EtOH}$  e de 100 a 0.39 mg/mL do  $OE_{as}$ , no controle foi utilizado o solvente Tween. O período de incubação foi de apenas 24 horas nas mesmas condições e na contagem foi feita a diferenciação ovos e larvas eclodidas .

#### 4.10. Teste de imersão com fêmeas de *R. (B.) microplus*

Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* desprendidas foram coletadas de bovinos naturalmente infestados da Embrapa Pecuária Sudeste.

Os testes foram conduzidos seguindo a técnica do biocarrapaticidograma como descrito por Drummond et al. (1973), na qual foram utilizados três grupos homogêneos de 10 teleóginas por tratamento/concentração (Figura 11). O teste também contou com um controle negativo (água destilada) e controle solvente (Tween 2%). As teleóginas dos grupos testes foram imersas em concentrações de 100mg/mL a 1,56mg/mL do extrato etanólico obtido a partir das inflorescências de *A. saturoioides* durante cinco minutos. Em seguida foram secas e colocadas em placa de Petri para posterior postura em estufa á temperatura média de 27° C e umidade relativa superior a 80% durante 18 dias.

Após o décimo oitavo dia foi realizada a avaliação das posturas, sendo os ovos pesados e colocados em seringas descartáveis adaptadas e mantidos em estufa a 27°C por mais 18 dias. O percentual de eclodibilidade dos ovos foi analisado visualmente por meio da contagens de ovos e larvas (percentagem de eclodibilidade). A partir dos resultados obtidos foi calculada a eficiência reprodutiva (inibição da postura e eclosão das larvas) e do produto segundo as equações de porcentagem de oviposição (%O), porcentagem de eclodibilidade das larvas (%Eclo), eficiência reprodutiva (RE) e porcentagem de eficácia do extrato (%E) (Drummond et al. 1973).

#### EQUAÇÃO 3:

$$\%O = \frac{\text{média de peso dos ovos (controle) (g)} - \text{média de peso dos ovos (tratado) (g)}}{\text{média de peso dos ovos (controle) (g)}} \times 100$$

#### EQUAÇÃO 4:

$$\%Eclo = \frac{\text{taxa de eclodibilidade (controle)} - \text{taxa de eclodibilidade (tratado)}}{\text{taxa de eclodibilidade (controle)}} \times 100$$

#### EQUAÇÃO 5:

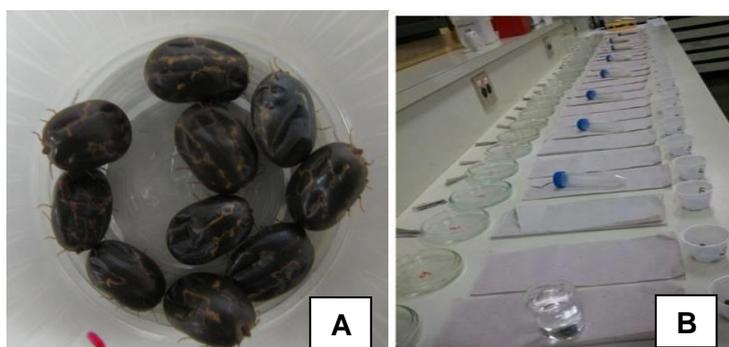
$$RE = \frac{\text{peso dos ovos (g)} \times \% \text{ taxa de eclodibilidade} \times 20000^*}{\text{peso das fêmeas (g)}}$$

\*Constante que indica o número de ovos presente em um grama

#### EQUAÇÃO 6:

$$\%E = \frac{RE_{\text{controle}} - RE_{\text{tratado}} \times 100}{RE_{\text{controle}}}$$

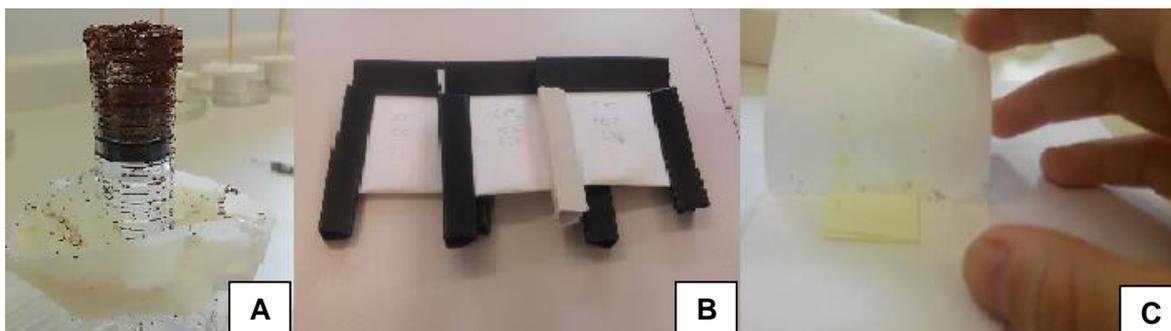
Abaixo estão representadas etapas do Teste de imersão de fêmeas (Figura 11).



**Figura 11.** Etapas do Teste de imersão de fêmeas *R. (B.) microplus* A) Grupo de dez fêmeas ingurgitadas pesadas e prontas para serem imersas B) Placas de Petri onde serão acondicionadas as fêmeas para oviposição após serem secas em papel toalha.

#### 4.11. Sensibilidade larvar em teste de contato em papel impregnado

Os testes de sensibilidade de larvas de *R. (B.) microplus* e *R. (B.) sanguineus* foram realizados de acordo com a técnica desenvolvida por FAO (1971). Nessa metodologia aproximadamente 100 larvas da espécie foram colocadas em papel filtro medindo aproximadamente 10 x 8 cm, impregnados com 0,3 mL das diferentes concentrações de extrato sendo elas de 100 mg/mL a 0,78 mg/mL, sempre caindo pela metade. O teste também contou com controles dos solventes utilizados (etanol no caso do extrato e Tween no caso do óleo). Cada um destes papeis impregnado com os extratos foram dobrados formando um “sanduiche” e vedados com pregadores plásticos. Os envelopes foram acondicionados em estufa a 27° C e umidade relativa de 80%, sendo as triplicatas lidas após 24 horas de incubação com a ajuda de um compressor a vácuo adaptado com uma pipeta diferenciando larvas vivas e mortas (Figura 12).



**Figura 12.** Teste de contato em papel impregnado a) Seringa com larvas de *R. (Boophilus) microplus* para serem utilizadas b) Envelope de papel impregnado com larvas c) Pacote de larvas sendo aberto para contagem das vivas e mortas.

## 4.12. Ensaios citotóxicos

### 4.12.1 Linhagem celular

Nesse ensaio foram utilizados queratinocitos humanos imortalizados (HaCat) obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivados no laboratório de Citologia e Biologia Celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) de responsabilidade da Professora Doutora Christiane Pienna Soares.

### 4.12.2 Teste de Citotoxicidade

A citotoxicidade do óleo essencial e do extrato etanólicos proveniente das inflorescências de *A. saturoioides* foi realizada de acordo com o ensaio da sulforodamina B (SRB) (Skehan et al., 1990).

Para esse ensaio foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços que foram pré-incubadas por 24 horas com meio de cultura meio essencial mínimo Dulbecco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino 10% v/v, 100 uL/poço em condições de 37° C e 5% de CO<sup>2</sup>. Após 24 horas foi observado o crescimento das células e então o meio foi descartado e adicionou-se as amostras-teste (óleo essencial e extrato etanólico). Foram também realizados controles positivos e controle de veiculo (doxorubicina 20 ug/mL como controle positivo e apenas meio como controle de veiculo) empregando a contagem de 1,4 x 10<sup>4</sup> células/mL. Após 24 horas de incubação, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA, 100

$\mu\text{L/poço}$ ) e as placas colocadas em refrigerador por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . O TCA foi removido e adicionou-se  $50\ \mu\text{L/poço}$  de corante SRB 0,4% (v/v).

Após 20 minutos, as placas foram lavadas com ácido acético 1% (v/v) e secas à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). O corante não fixado foi removido com a lavagem e o corante fixado a proteína foi solubilizado em um meio básico (Tris base 10 mM, pH 10,5), precedendo-se a determinação da densidade óptica de 570 nm em leitor de absorvância (iMark, BioRad).

A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a equação 7 abaixo:

**Equação 7.** Cálculo de porcentagem de células viáveis encontradas no ensaio de citotoxicidade.

$$(\%) \text{ CV} = \frac{\text{MabsT} - \text{MabsCN}}{\text{MabsCV} - \text{MabsCN}}$$

Onde: (%) CV = porcentagem de células viáveis; MabsT = valor da absorvância média da amostra testada; MabsCN = valor da absorvância média do controle negativo; MabsCV = valor da absorvância média do controle de veículo.

#### 4.13. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram demonstrados na forma de média e  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos calculado pela ferramenta Excel do Office 2013 e apresentados nas formas de tabela. Análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey – Kramer, com  $p < 0,05$ , utilizando o software Assistat.

O procedimento Probit do Statistical Analysis System (SAS) (SAS, 2002/2003) foi utilizado para calcular as concentrações letais de 50 e 90% ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) dos organismos e seus respectivos intervalos de confiança.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade foram expressos com a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. Os dados foram submetidos a ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software Graphpad Prism (versão 5.01).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Produção do extrato e extração do óleo essencial

A extração de óleo essencial apresentou rendimento de 0,87  $\mu\text{L/g}$ , sendo a cada 150 g da planta obtido 130  $\mu\text{L}$  do óleo. A densidade do óleo essencial foi medida por meio da pesagem de três alíquotas, dessas três retirou-se a média e o cálculo foi massa dividido por volume, a densidade obtida foi de 0,90 mg/mL. A produção de extrato etanólico apresentou um rendimento considerado bom, pois a cada 100 g de material vegetal colocadas em contato com 3 L de álcool etílico absoluto obteve-se 12 g de extrato, com rendimento, portanto, de 12% (m/m).

### 5.2. Análises fitoquímicas

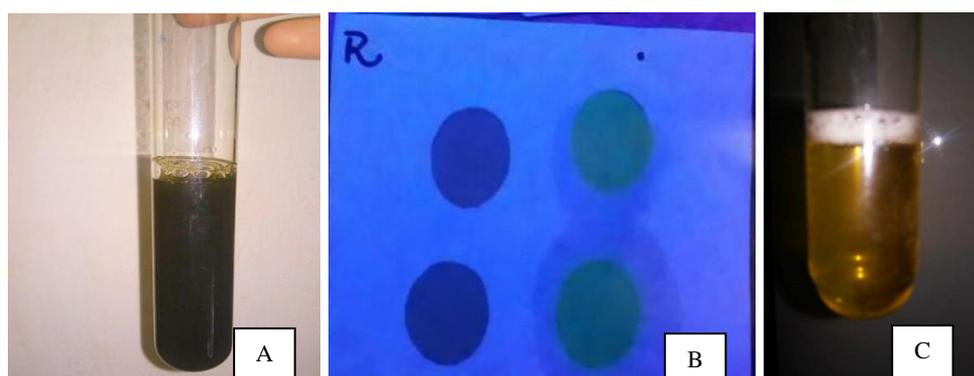
Os resultados da triagem fitoquímica revelaram a presença de flavonóides, taninos e saponinas (Tabela 1).

**TABELA 1.** Análise fitoquímica qualitativa das inflorescências pulverizadas de *Achyrocline satureioides* detectadas por reações químicas positivas ou negativas em diferentes métodos.

Classes	Reações	Resultados
Flavonoides	Shinoda	+
	Taubock	+
	Pew	+
	Cloreto férrico	+
	Cloreto de alumínio	+
Taninos	Gelatina	+
	Sais de ferro	+
	Acetato de chumbo	+
Saponinas	Formação permanente de espuma	+
Glicosídeos cardiotônicos	Legal	-
	Kedde	+

	Perez	-
	Keller- Kiliane	+
Antraquinona	Livres	-
	Borntrager	-
Alcaloides	Bertrand	-
	Bouchadart	-
	Dradendorff	-
	Mayer	-
Cumarinas	NaOH	-

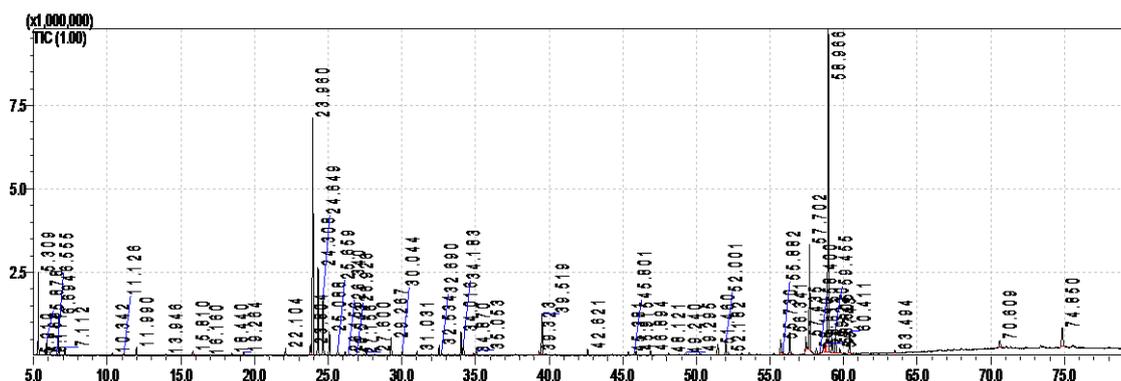
Na figura 13 podem ser observados os resultados positivos para taninos, flavonoides e saponinas. .



**FIGURA 13** a) Reação de sais de ferro (Taninos) b) Reação do cloreto de alumínio (Flavonoides) c) Formação permanente de espuma (Saponinas).

### 5.3 Análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

. O cromatograma obtido para o extrato etanólico de *A. saturoioides* em CG/MS apresentou 63 picos dentre os quais foram caracterizadas 29 substancias com bases nos maiores picos e tempo de retenção em minutos(Figura 14).



**Figura 14.** Cromatograma obtido pelo método CG-MS do extrato etanólicos de *A. saturoioides*. Condições da análise : coluna Phenomenex ZB-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm), GCMS solutions Ver. 2.5. Temperatura do forno: 140°C (3 min) 3°C / min 32°C (10 min); Temperatura do injetor 260 °C; Modo de injeção: *splitless/split* (Grob). Início *splitless*, 0,75 min *split* (1/50), 2 min *split* 1/20, gás de arraste hélio (99,999%) a um fluxo constante de 1,3 mL/min, o volume de amostra injetado foi de 1 µL. Pressão: 114,9 kPa, velocidade linear: 43,1 cm/sec., fluxo total: 17,3. Condições MS: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa das massas de aquisição de *m/z* 40-650 Daltons.

As substâncias identificadas estão descritas na tabela 2:

**Tabela 2.** Substâncias identificadas no extrato etanólico de *A. saturoioides* listados por ordem de eluição da coluna.

Proposta de identificação	tR (min)	Área (%)	IS (%)	IR (calculado)	IR (Literatura)
ácido fosfórico, TMS	5,210	89592	82	-	-
glicerol, TMS	5,309	5121699	95	-	-
isoleucina, TMS	5,769	138776	84	-	-
prolina TMS	5,878	967803	92	-	-
succinato TMS	6,111	175370	89	1305	1314
	6,555	125590	-	1323	-
	6,695	2846369	-	1328	-
	7,112	591768	-	1345	-
ácido Piroglutâmico, bis(trimetilsilil)-	10,342	200475	77	1461	-
ácido málico (3TMS)	11,126	218045	92	1487	1479
-	11,990	776225	-	1515	-
-	13,946	127176	-	1575	-
-	15,810	498842	-	1631	-
xilitol (TMS)	18,440	217282	86	1709	1694

ribitol (TMS)	19,264	343086	90	1733	1727
ácido benzoico , 3,4- dihidroxi, TMS	22,104	732792	91	1819	1813
-	23,804	1196250	-	1871	-
Mioinositol	23,960	27263993	83	1875	2096
-	24,308	10321690	-	1886	-
-	24,649	6608028	92	1897	-
d-glucose	25,088	2677909	96	1910	1897
d-galactose	25,659	651633	90	1928	1897
sorbitol, TMS	26,156	444883	-	1944	1935
-	27,600	402675	-	1990	-
-	29,267	1983817	-	2044	-
-	30,045	549304	-	2070	-
mioinositol TMS	31,031	468833	94	2103	2096
ácido octadecanoico	32,534	1180866	-	2154	-
-	32,690	382061	-	2159	-
ácido linoleico, TMS	34,010	2712165	95	2205	2210
$\alpha$ -ácido linoleico, TMS	34,180	1412801	89	2211	2218
-	34,865	257686	-	2235	-
ácido octadecanoico, TMS	35,045	614287	92	2242	2240
ácido linoleico , TMS	39,320	291173	73	2398	2212
oleamide, N-trimetilsilil-	39,515	4844857	83	2405	2427
ácido ftálico	42,621	688049	93	2526	2741
ácidotetradecanoicoTMS	45,385	449612	79	2638	1843
Farnesol	45,801	384226	84	2655	1800
-	45,915	388754	88	2660	-
heptacosano	46,894	562377	93	2700	-
ácido octadecenoico , 1,3-bis-(OTMS)-2-propyl ester	48,121	230255	78	2753	2744
-	49,240	116057	-	2801	-
-	49,295	321515	-	2804	-
-	51,460	1213223	-	2900	-
-	52,182	301925	-	2925	-
-	55,730	1718380	-	2934	-
-	55,882	245707	-	3100	-
-	56,341	2666806	-	3108	-

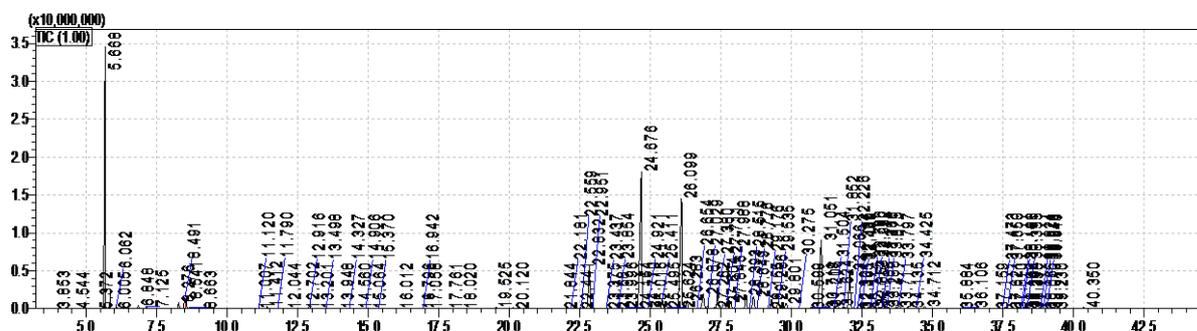
-	57,435	1536269	-	3131	-
-	57,702	13224534	-	3184	-
quercetina TMS	58,140	695970	92	3198	3174
-	58,400	279168	-	3220	-
-	58,615	1268701	-	3233	-
ácido tetracosanoico TMS	58,805	777151	84	3244	2848
-	58,966	42434399	-	3253	-
-	59,220	1989779	-	3262	-
-	59,455	3424708	-	3275	-
estigmasterol TMS	59,743	565220	92	3286	3274
-	60,412	3057080	-	3301	-
-	63,494	328759	83	3500	3356
-	70,609	1205581	-	3908	-
-	74,850	3636825	-	3997	-

TMS = trimetilsilil

tR=tempo de retenção em minutos; IS= índice de similaridade; IR= índice de retenção; (-) representa composto não identificado.

Para identificação dos componentes presentes no óleo essencial o procedimento realizado foi o mesmo. Porém devido ao fato do óleo essencial já ser uma matriz bastante volátil não foi necessário o processo de silição.

O cromatograma obtido para o óleo essencial de *A. satureioides* em CG/MS apresentou 122 picos dentre os quais foram caracterizadas 58 substâncias com bases nos maiores picos e tempo de retenção em minutos, sendo eles os seguintes (Figura 15):



íons e interface de 250 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa das massas de aquisição de  $m/z$  40-650 Daltons.

As substâncias identificadas estão descritas na tabela 3:

**Tabela 3.** Substâncias identificadas óleo essencial de *A. saturoioides* listados por ordem de eluição da coluna.

Proposta de identificação	tR (min)	Área (%)	IS (%)	IR (calculado)	IR (Literatura)
dimetil butano	3.853	121137	91	-	474,2
Octano	4.544	45641	91	-	786
alfa pineno	5.372	51607	81	-	948,55
alfa pineno	5.668	63748568	97	-	948,55
biciclo [2.2.1]heptano, 2,2-dimetil-3-metileno-, (1R)	6.005	112832	81	-	935,2
beta mirceno	6.062	806071	97	-	1056
Benzeno	6.848	816876	97	1.323	1119
d-limoneno	7.125	515844	96	1.334	1173
Eucaliptol	8.276	2188093	97	1.379	1266
beta ocimeno	8.491	3003501	93	1.387	1204
3oxatriciclo[4.1.1.0(2,4)]ocano, 2,7,7-trimetil	8.541	3341050	87	1.389	1215
Nonal	8.663	321303	94	1.394	1240
cis limoneno oxido	11.007	260031	93	1.471	-
-	11.120	93261	86	1.475	-
$\alpha$ -campholeno aldeído	11.412	869110	85	1.484	1384
biciclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimetil-2-metileno-	11.790	105599	-	1.497	-
$\alpha$ -campholeno aldeído	12.044	121697	84	1.505	1486
biciclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimetil-2-metileno-	12.702	316037	92	1.525	1615
Verbenol	12.916	1227261	91	1.531	1665
biciclo[2.2.1]heptan-2-ol, 2,3,3-trimetil-	13.201	65429	81	1.540	1540
--	13.498	52862	-	1.549	-

Borneol	13.948	249212	92	1.562	1652
Terpineol	14.327	176388	85	1.574	1585
Benzenemetanol	14.560	126305	-	1.581	-
-	14.906	267697	-	1.591	-
biciclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-	15.064	80579	84	1.596	1202
-	15.369	409420	-	1.605	-
trans carveol	16.012	78153	78	1.624	1225
-	16.796	41550		1.647	-
Carvone	16.942	23028	80	1.651	1705
Nonyne	17.058	50490	94	1.655	1134
-	17.761	64510	-	1.676	-
--	18.020	142648	-	1.683	-
óxido de limoneno	19.525	567157	94	1.728	1468
Verbenol	20.120	355314	84	1.745	1680
-	21.844	50614	-	1.797	-
-	22.181	50708	-	1.807	-
alfa muuroleno	22.441	375249	86	1.815	-
Copaeno	22.559	1283759	90	1.818	1487
alfa copaeno	22.832	22021156	96	1.827	1533
-	22.951	245759	-	1.830	-
-	23.375	38428	-	1.843	-
Metanol	23.437	116884	-	1.845	-
-	23.681	146267	-	1.853	-
-	23.854	85009	-	1.858	-
Cariofileno	23.996	467100	90	1.862	1632
alfa gurgunene	24.154	486222	92	1.867	1549
beta cariofileno	24.676	88485233	97	1.883	1612
-	24.770	714210	-	1.886	-
-	24.921	730373	-	1.890	-
germacrene D	25.016	493124	83	1.893	1739
aromadendrene	25.411	4903702	95	1.905	1643
-	25.495	340545	-	1.908	-
-	25.624	712939	-	1.912	-
Humuleno	26.099	67048398	97	1.927	1671
-	26.283	3826502	-	1.933	-
-	26.654	274165	-	1.945	-

alfa moruleno	26.878	8775615	-	1.952	-
Naftaleno	27.029	1189497	96	1.957	1815
-	27.262	622482	-	1.964	-
-	27.380	7066326	-	1.968	-
-	27.604	3554394	-	1.975	-
Cicloprop	27.711	3411429	94	1.978	1719
Naftaleno	27.846	3656600	91	1.982	1746
Naftaleno	27.988	362880		1.987	
Azuleno	28.393	6999597	93	2.000	1664
-	28.515	285943	-	2.004	-
ciclodecadieno	28.649	7396568	86	2.008	1854
delta cadineno	28.776	318952	88	2.012	1752
Patchouli	29.155	83682	83	2.025	1793
beta selineno	29.176	114700	82	2.025	1727
-	29.286	5925880	-	2.029	-
-	29.534	3950099	-	2.037	-
-	29.801	3549680	-	2.046	-
Cariofileno	30.275	550433	90	2.062	2032
oxido cis limoneno	31.852	1376176	87	2.114	-
-	32.066	20988632	-	2.121	-
Nerodiol	32.226	414492	55	2.127	-
-	32.301	158004	-	2.129	-
-	32.335	259947	-	2.130	-
-	32.365	55056	-	2.132	-
Cedrol	32.470	860640	82	2.135	-
-	32.715	200820	-	2.143	-
-	32.790	605586	-	2.146	-
-	32.853	1720421	-	2.148	-
-	32.952	1244320	-	2.152	-
-	33.105	804926	-	2.157	-
-	33.205	61692	-	2.160	-
Butanona	33.288	1221586	71	2.163	1854
2-naftalenomatanol	33.375	508516	83	2.166	2226
alfa calacoreno	33.797	1808840	77	2.180	-
naphtaleno tms	34.135	561124	67	2.192	2203
-	34.425	1303748	-	2.202	-
hexadecanal	34.712	1338546	86	2.212	2119
-	38.865	56389	-	2.362	-

#### 5.4 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

O teste de desenvolvimento larvar avaliou a capacidade de desenvolvimento das larvas do nematódeo *H. contortus* em contato com as diferentes concentrações do extrato etanólico e do óleo essencial de *A. saturoioides*. O propósito desse teste é inibir o desenvolvimento para que as larvas não atinjam a fase infectante (L<sub>3</sub>). Os resultados de inibição do extrato etanólico estão demonstrados na Tabela 4.

**TABELA 4.** Porcentagem de inibição do desenvolvimento de larvas de *H. contortus* na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de *A. saturoioides* e média de L1+L2 e L3 encontradas nos poços.

Concentração (mg/mL)	M L1+L2	M L3	(%) inibição ± DP
3,12	138,77	5	95,2 <sup>a</sup> ± 12,6
1,56	140,5	4,7	96,9 <sup>a</sup> ± 0
0,78	102,27	15,84	87,8 <sup>a</sup> ± 11,9
0,39	99,6	25,82	82,1 <sup>a</sup> ± 1,9
0,19	65,27	67,77	51,5 <sup>b</sup> ± 6,9
0,09	40,2	86,11	38,2 <sup>bc</sup> ± 10,2
0,04	39,27	63,77	46,0 <sup>b</sup> ± 15,5
0,02	27,77	82,5	23,7 <sup>cd</sup> ± 47,9
0,01	14,05	101,61	12,7 <sup>d</sup> ± 16,2
0,005	12,38	91,33	11,8 <sup>d</sup> ± 4,8
0,0025	11,94	94,38	9,95 <sup>d</sup> ± 1,9
0,0012	10,31	104,25	9,5 <sup>d</sup> ± 10
Controle DMSO 0,5%	12,83	96,33	11,8 <sup>d</sup> ± 2,4

(M L1+L2) Média de larvas em estágio de L1 e L2 nos poços, (M L3) média de larvas de terceiro estágio encontradas nos poços. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Podemos notar que mesmo em baixas concentrações, o extrato etanólico foi capaz de inibir cerca de 96,9% do desenvolvimento larvar. Pelo procedimento Probit

do SAS foi calculada as CLs. A CL<sub>50</sub> encontrada foi de 0,13 mg/mL (0,12 a 0,13 mg/mL) e a CL<sub>90</sub> foi de 1,29 mg/mL (1,18 a 1,40 mg/mL).

Na tabela 5 estão apresentados a porcentagem de inibição do desenvolvimento de larvas de *H. contortus* frente a varias concentrações do óleo essencial de *A. saturoioides*.

**TABELA 5.** Porcentagem de inibição do desenvolvimento de larvas de *H. contortus* na presença de diferentes concentrações de óleo essencial de *A. saturoioides* e média de L1+L2 e L3 encontradas nos poços.

Concentração (mg/mL)	M L1+L2	M L3	(%) inibição ± DP
1,25	104,5	0	100 <sup>a</sup> ± 0
0,62	121,33	0	100 <sup>a</sup> ± 0
0,31	78,75	1,58	98,23 <sup>a</sup> ± 1,18
0,15	73,91	9,08	88,67 <sup>a</sup> ± 1,70
0,078	51,58	30,35	60,67 <sup>b</sup> ± 1,12
0,039	38,57	40,71	55,63 <sup>bc</sup> ± 34,40
0,019	30,5	61,25	34,70 <sup>cd</sup> ± 0,82
0,0091	17	68,8	17,64 <sup>de</sup> ± 0,01
0,0045	13,83	57	20,64 <sup>de</sup> ± 5,30
0,0022	11,2	110,8	9,37 <sup>e</sup> ± 1,52
0,0011	7,66	92	7,76 <sup>e</sup> ± 2,56
DMSO 0,5%	12,83	48,72	11,77 <sup>e</sup> ± 2,39

(M L1+L2) Média de larvas em estágio de L1 e L2 nos poços, (M L3) média de larvas de terceiro estágio encontradas nos poços. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Notamos que baixas concentrações do óleo foram capazes de inibir 100% do desenvolvimento larvar. As CLs 50 e 90 encontradas para o óleo essencial de *A. saturoioides* foram respectivamente 0,021 mg/mL (0,020 a 0,023 mg/mL) e 0,12 mg/mL (0,11 a 0,13 mg/mL).

### 5.5 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

O teste avaliou a eclodibilidade dos ovos do parasita *H. contortus* após 24 horas exposto a diferentes concentrações do extrato etanólicos e do óleo essencial de *A. saturoioides*. Na avaliação do extrato, a maior porcentagem de inibição foi a encontrada na concentração de 100 mg/mL ficando em 68,9 % como pode ser observado na Tabela 6.

**TABELA 6.** Porcentagem de inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. saturoioides*, média de ovos e larvas por poço.

Concentração (mg/mL)	M Ovos	M L1	(%) inibição ± DP
100	60,41	29,61	68,9 <sup>a</sup> ± 34,6
50	47,05	48,47	49,5 <sup>b</sup> ± 11,2
25	38,11	72,5	36,9 <sup>bc</sup> ± 27,2
12,5	35,55	95,33	25,5 <sup>cd</sup> ± 21,2
6,25	29,94	103,55	29,5 <sup>cd</sup> ± 19,9
3,12	20,72	70,5	27,1 <sup>cd</sup> ± 26,2
1,56	20,72	88,05	19,3 <sup>d</sup> ± 30,1
Tween 2%	8,7	163,5	5,4 <sup>e</sup> ± 1,55

(**M ovos**) média de ovos por poço e (**M L1**) média de larvas por poço. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para determinar as concentrações do extrato capaz de inibir a eclosão de 50% e 90% dos ovos foram calculadas as CLs. A CL<sub>50</sub> encontrada foi de 37,7 mg/mL (31,47 mg/mL a 46,26 mg/mL), já a CL<sub>90</sub> foi de 706,6 (588,52 mg/mL a 862,94 mg/mL).

O teste de eclodibilidade de ovos realizado frente ao óleo essencial de *A. saturoioides* apresentou inibição de 100% da eclodibilidade nas concentrações de 100 e 50 mg/mL como pode ser observado na tabela 7.

**Tabela 7.** Porcentagem de inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* na presença de diferentes concentrações do óleo de *A. saturoioides*.

Concentração (mg/mL)	M	M L1	(%) inibição ± DP
<b>Ovos</b>			
100	48,25	0	100 <sup>a</sup> ± 0
50	60	0	100 <sup>a</sup> ± 0
25	33,75	2	92,6 <sup>a</sup> ± 5,9
12,5	23,25	10,25	69,1 <sup>b</sup> ± 4,9
6,25	21,5	52,25	27,7 <sup>c</sup> ± 20,3
3,12	13,5	58,75	18,8 <sup>cd</sup> ± 1,1
1,56	7,25	58	11,4 <sup>de</sup> ± 9,1
0,78	3,75	42,75	8,3 <sup>de</sup> ± 2,1
0,39	4,75	90,95	4,9 <sup>e</sup> ± 1,1
Tween 2%	1,66	68,16	2,2 <sup>e</sup> ± 1,0

(M ovos) média de ovos por poço e (M L1) média de larvas por poço. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As concentrações de 100 e 50 mg/mL apresentaram 100% de inibição. As CLs encontradas foram: CL<sub>50</sub> 6,71 mg/mL (6,11 a 7,37 mg/mL) e CL<sub>90</sub> 28,10 mg/mL (24,10 a 33,53 mg/mL).

### 5.6. Teste de imersão de fêmeas de *R. (B.) microplus*

No teste de imersão de fêmeas foram avaliados os parâmetros de porcentagem de eficácia, redução de postura e redução de eclodibilidade. No teste realizado com o extrato etanólico de *A. saturoioides* observou-se eficácia sobre as fêmeas ingurgitadas do carrapato (Tabela 8) enquanto o controle realizado somente com água não apresentou efeito.

**TABELA 8.** Índice de eficiência reprodutiva de teleóginas de *R. (B.) microplus* submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico de *A. saturoioides*

(mg/mL) e porcentagem de eficácia. Os valores representam a média +/- os desvios padrões.

<b>C</b> <b>(mg/mL)</b>	<b>M<sub>F</sub></b>	<b>M<sub>O</sub></b>	<b>(%)</b> <b>Eclo</b>	<b>(%)RE</b>	<b>(%) EP</b>
100	2,142 ± 0,01	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0
50	2,162 ± 0,04	0,094 ± 0,001	93,33 ± 2,88	55,55 ± 3	92,3 <sup>a</sup> ± 0,76
25	2,202 ± 0,02	0,150 ± 0,07	96,66 ± 2,88	10,48 ± 3	85,47 <sup>ab</sup> ± 8,42
12,5	2,182 ± 0,03	0,333 ± 0,05	95 ± 2,88	23,43 ± 3	67,52 <sup>bc</sup> ± 3,69
6,25	2,166 ± 0,02	0,349 ± 0,10	88,33 ± 2,88	26,32 ± 3	63,52 <sup>bc</sup> ± 12,71
3,12	2,135 ± 0,05	0,342 ± 0,001	93,33 ± 5	27,30 ± 5,2	62,16 <sup>c</sup> ± 0,71
1,56	2,085 ± 0,01	0,451 ± 0,201	91,66 ± 2,88	36,11 ± 3	49,95 <sup>c</sup> ± 23,77
Controle Tween 2%	2,147 ± 0,02	0,662 ± 0,043	94 ± 2,88	57,58 ± 3	20,18 <sup>d</sup> ± 4,63

(**M<sub>F</sub>**) média do peso das fêmeas, (**M<sub>O</sub>**) média do peso dos ovos, (**% Eclo**) eclodibilidade das larvas, (**RE**) eficiência reprodutiva e (**%E**) eficácia. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Na tabela 8 observa-se que a concentração de 100 mg/mL inibiu totalmente a postura de ovos, já a concentração de 50 mg/mL apresentou postura bastante reduzida. As CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> encontradas para eficácia final do extrato foram de 2,1 mg/mL e 39,7 mg/mL, respectivamente.

Na tabela 9 observa-se que a concentração de 50 mg/mL inibiu totalmente a postura de ovos, enquanto as concentrações de 25 mg/mL e 12,5 mg/mL apresentaram postura bastante reduzida.

As CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> encontradas para eficácia final do óleo foram de 2,41 mg/mL e 14,09 mg/mL, respectivamente.

**TABELA 9.** Índice de eficiência reprodutiva de teleóginas de *R. (B.) microplus* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *A. saturoioides* (mg/mL) e porcentagem de eficácia. Os valores representam a média +/- os desvios padrões.

C (mg/mL)	M <sub>F</sub>	M <sub>O</sub>	(%) Eclo	RE	(%) EP
50	1,637±0,0366	0,003 ± 0,005	0± 0	0±0	100 <sup>a</sup> ± 0
25	1,630±0,0316	0,266 ± 0,054	7,5±3,53	24,53±3,68	97,4 <sup>a</sup> ± 3,68
12,5	1,629 ± 0,002	0,432 ± 0,050	12,5±10,6	66,35±11,04	92,9 <sup>a</sup> ± 11,04
6,25	1,636 ± 0,005	0,733 ± 0,131	45±7,07	40,32±7,36	56,8 <sup>b</sup> ± 7,36
3,12	1,601 ± 0,001	0,599 ± 0,010	50±3,53	37,28±14,73	59,9 <sup>b</sup> ± 14,75
1,56	1,637 ± 0,025	0,616 ± 0,078	75±3,53	56,475±7,36	39,5 <sup>bc</sup> ± 7,36
Controle Tween 2%	1,614 ±	0,694 ± 0,034	92,5±0	79,58±3,68	14,7 <sup>c</sup> ± 3,68

(M<sub>F</sub>) média do peso das fêmeas, (M<sub>O</sub>) média do peso dos ovos, (% Eclo) eclodibilidade das larvas, (RE) eficiência reprodutiva e (%E) eficácia.

Foi aplicado Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

### 5.7. Sensibilidade das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em teste de contato em papel impregnado

O teste de sensibilidade larvar em teste de contato em papel impregnado foi realizado com o extrato etanólico e o óleo essencial obtido a partir das inflorescências da *A. satureioides* frente a *R. (B.) microplus*. A Tabela 10 mostra a porcentagem de mortalidade das larvas.

**TABELA 10.** Porcentagem de mortalidade (%) e desvio padrão de larvas de *R. (B.) microplus* em contato com papel impregnado com o extrato etanólico (AS<sub>EtOH</sub>) e óleo essencial (OE<sub>AS</sub>) de *A. satureioides*.

Concentração (mg/mL)	AS <sub>EtOH</sub> (%)	OE <sub>AS</sub> (%)
100,0	67,34 <sup>a</sup> ± 24,47	18,5 <sup>a</sup> ± 13,59
50,0	9,95 <sup>b</sup> ± 0,67	5,05 <sup>b</sup> ± 2,14

25,0	$0^b \pm 0$	$6,14^{ab} \pm 1,42$
12,5	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
6,25	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
3,12	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
1,56	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
0,78	$0^b \pm 0$	$0^b \pm 0$
Controle*	$0,65^b \pm 1,4$	$0^b \pm 0$

(**AS<sub>EtOH</sub>**) extrato etanólico de *Achyrocline satureioides*, (**OE<sub>As</sub>**) Óleo essencial de *Achyrocline satureioides*. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.\* Controle com etanol a 50% no teste com o extrato e Tween 2% no teste com o óleo essencial.

Pode ser observado que a menor concentração do óleo solubilizado em Tween 2% começou a apresentar mortalidade na concentração de 25,0 mg/mL, porem muito baixa, a máxima concentração avaliada apresentou apenas 18,5 % de mortalidade. Foram calculadas as concentrações letais dos extrativos capazes de causar mortalidade em 50 e 90% das larvas. A CL<sub>50</sub> ficou em 260,78 mg/mL, com intervalo de confiança entre 194,78 a 400,52 mg/mL, já a CL<sub>90</sub> foi de 1. 141,0 mg/mL, com intervalo de confiança entre 670,15 a 2.536,0 mg/mL.

O extrato etanólico obtido solubilizado em Tween 2% não causou mortalidade, entretanto, quando solubilizado em etanol 50%, o extrato etanólico apresentou maior porcentagem de mortalidade (67,34%) na máxima concentração de 100 mg/mL. Esse valor foi 3,64 vezes superior ao resultado obtido com o óleo essencial. As CLs 50 e 90 foram respectivamente 90,64 mg/mL (86,06 a 96,00 mg/mL) e 158,46 mg/mL (143,71 a 179,56 mg/mL), seguidas pelo seus intervalos de confiança, respectivamente.

### 5.8. Sensibilidade das larvas de *Rhipicephalus sanguineus* em teste de contato em papel impregnado

O teste de contato em papel impregnado com o óleo essencial e extrato etanólico de *A. satureioides* também foi realizado com a espécie *R. sanguineus*, conhecido popularmente como carrapato do cão (Tabela 11).

**TABELA 11.** Porcentagem de mortalidade (%) e desvio padrão de larvas de *R. sanguineus* em contato com papel impregnado com o extrato etanólico (**AS<sub>EtOH</sub>**) e óleo essencial (**OE<sub>AS</sub>**) de *A. saturoioides*.

Concentração (mg/mL)	AS <sub>EtOH</sub> (%)	OE <sub>AS</sub> (%)
100,0	32,2 <sup>a</sup> ± 4,87	56,55 <sup>a</sup> ± 0,06
50,0	1,28 <sup>b</sup> ± 0	36,91 <sup>ab</sup> ± 2,14
25,0	0 <sup>b</sup> ± 0	20,04 <sup>ab</sup> ± 1,39
12,5	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
6,25	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
3,12	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
1,56	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
0,78	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
Controle*	1,30 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0

(**AS<sub>EtOH</sub>**) extrato etanólico de *Achyrocline saturoioides*, (**OE<sub>AS</sub>**) Óleo essencial de *Achyrocline saturoioides*. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

\* Controle com etanol a 50% no teste com o extrato e Tween 2% no teste com o óleo essencial.

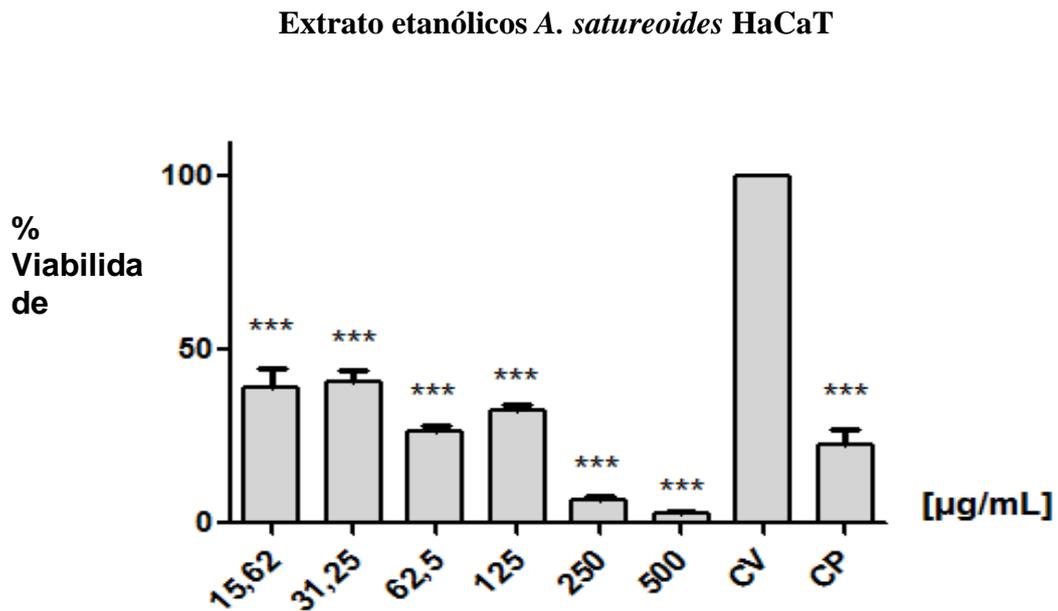
O óleo essencial solubilizado em Tween 2% causou mortalidade nas três maiores concentrações (100, 50 e 25 mg/mL). A concentração de 100 mg/mL foi a responsável pela maior porcentagem de mortalidade (56,55%). As CLs encontradas para o óleo essencial foram: CL<sub>50</sub> 119,73 mg/mL (111,22 a 134,49 mg/mL) e CL<sub>90</sub> 185,53 mg/mL (158,32 a 245,30 mg/mL).

O extrato etanólico solubilizado em Tween 2% não causou mortalidade, portanto foi também utilizada a alternativa de solubilização em etanol 50% e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5. Do mesmo modo que as larvas de *R. (B.) microplus*, as larvas de *R. sanguineus* apresentaram baixa mortalidade.

A concentração de 100 mg/mL foi a que demonstrou maior porcentagem de mortalidade ficando em 32,21%. Já as demais concentrações não demonstraram resultados significativos e as concentrações letais encontradas para o extrato etanólico foram: CL<sub>50</sub> 249,62 mg/mL (187,87 a 369,05 mg/mL) e a CL<sub>90</sub> 1.444,0 mg/mL (848,31 a 3.083,0 mg/mL).

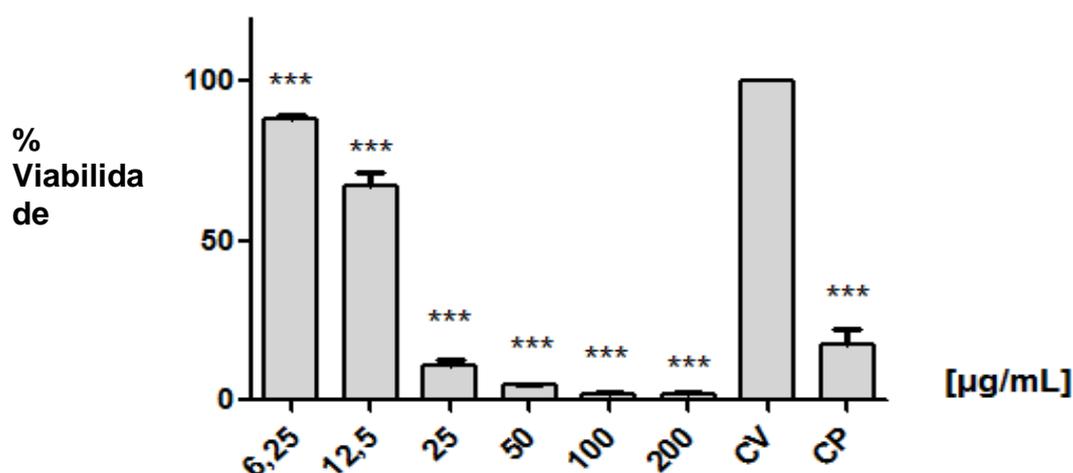
### 5.9 Ensaio de citotoxicidade

As figuras 17 e 18 apresentam os resultados do ensaio de citotoxicidade em queratinocitos humanos imortalizados (HaCaT) pelo ensaio da Sulforodamina B.



**Figura 16.** Porcentagem de viabilidade de queratinocitos humanos imortalizados frente a diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. saturooides*. (CV) controle veículo; (CP) controle positivo)

### Óleo essencial *A. saturooides* HaCaT



**Figura 18.** Porcentagem de viabilidade celular frente a diferentes concentrações do óleo essencial de inflorescências de *A. saturooides* colocar significado das siglas e mudar para % de viabilidade (CV) controle veículo; (CP) Controle positivo.

Na tabela 12 podemos observar a viabilidade celular e  $CL_{50}$  do óleo essencial e extrato de *A. saturooides*, podemos notar que o extrato etanólicos e o óleo essencial apresentaram efeitos de citotoxicidade, especialmente nas maiores concentrações analisadas.

**Tabela 12** Porcentagem de viabilidade celular e  $CL_{50}$  do extrato etanólico ( $AS_{EtOH}$ ) e do óleo essencial ( $AS_{OE}$ ) de inflorescências de *A. saturooides*

Concentração (µg/mL)	$AS_{EtOH}$	Concentração(µg /mL)	$AS_{OE}$
	% Viabilidade celular		% Viabilidade celular
500	2,81	200	2,13
250	6,57	100	2,19
125	32,71	50	4,64
62,5	26,65	25	10,91
31,2	40,57	12,5	67,11
15,6	38,86	6,25	88,32
Controle veículo	95	Controle veículo	97

Controle positivo*	23	Controle positivo*	16
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controle positivo doxorubicina 20 µg/mL</li> </ul>			

Notamos que ambos os extrativos inviabilizaram as células quando avaliados em altas concentrações. A concentração letal capaz de inviabilizar 50% das células ( $CL_{50}$ ) foi 9,309 µg/mL para o extrato e 13,96 µg/mL para o óleo essencial.

## 6. DISCUSSÃO

O Brasil é detentor de cerca de 20% das 250 mil espécies, tendo a mais diversa flora (EMBRAPA, 2009), sendo assim, o interesse de pesquisadores da área de terapias naturais vem crescendo exponencialmente no país. Assim como na medicina humana, na medicina veterinária as propriedades curativas dos fitoterápicos estão sendo cada vez mais estudadas e com frequência têm demonstrado bons resultados quanto ao tratamento de parasitoses e doenças infecciosas (HAMMOND et al., 1997). Embora muitas pesquisas tenham demonstrado o grande potencial de compostos vegetais sobre diversos patógenos, o empecilho encontrado é o baixo rendimento na obtenção dos extrativos.

A utilização de um cultivar da espécie *A. saturoioides* avaliada nesse trabalho permite confiabilidade de resultados e demonstrou rendimento menor que 1% na extração de óleo essencial, corroborando com Lucas et al. (2009), que pela mesma técnica de extração obteve apenas cerca de 1,5%. Por outro lado o extrato etanólico das inflorescências ( $A_{SETOH}$ ) apresentou melhores resultados quanto ao rendimento ficando em 12% de extrato bruto. Um estudo realizado com a espécie *A. saturoioides*, provenientes do semiárido brasileiro, demonstrou que a extração da raiz utilizando o solvente metanol, quando comparado a outros órgãos da planta, revelou um aproveitamento cerca de oito vezes maior (GONÇALVES, 2010).

Estudos com outras espécies da família Asteraceae demonstraram rendimentos semelhantes. A espécie *Tagetes patula* mostrou rendimento de 39,33% para o extrato etanólico, enquanto que para o óleo essencial o rendimento foi maior ficando em torno de 2,5 µL/g (POLITI, 2012). A espécie *Calendula officinalis* com

apenas 50 gramas de flores apresentou rendimento de 54% do extrato etanólico, considerado bastante elevado (VOLPATO, 2005). Os rendimentos de extrativos vegetais podem ser baixos, pois o processo de extração, a solubilidade dos constituintes químicos e os solventes utilizados podem interferir (FALKENBERG et al. 2000).

Os vegetais produzem compostos agrupados como primários e secundários. Os compostos primários comumente abundantes nos vegetais são carboidratos, aminoácidos e lipídios. Os compostos secundários, que na maioria das vezes são os maiores responsáveis pela defesa da planta e que podem apresentar efeitos medicinais ou tóxicos são encontrados em menores proporções. Dentre esses metabólitos secundários estão os óleos essenciais, flavonóides, terpenóides, alcaloides e taninos entre outros (SIMÕES et al., 2004). É interessante realizar ensaios de prospecção fitoquímica a fim de determinar as classes de metabólitos secundários presentes na espécie em estudo. Esses metabólitos podem variar de acordo com diversas condições ambientais como chuva, insolação e nutrientes recebidos, assim como variam de acordo com cada parte da planta. A triagem fitoquímica preliminar das inflorescências da espécie *A. saturoioides* revelou a presença de flavonoides, taninos e saponinas. Esses mesmos testes realizados por Marques-Junior et al. (2009) com inflorescências de macela, provenientes do comércio e domicílios de Uruguaiana –RS, demonstraram a presença desses três mesmos metabólitos secundários, demonstrando assim a concordância dos testes.

Relatos encontrados na literatura demonstram que os flavonoides geralmente são responsáveis pelo potencial antiinflamatório (RAMOS, 2009), antitumoral ( GIL et al., 2009), antioxidante (MIYASHIRO, 2010), antimicrobiano, antihepatotóxico e anticolérico (LORENZI; MATOS, 2002). Os taninos apresentam potencial adstringente e antimicrobiano atuando também na precipitação de proteínas. As saponinas por sua vez já apresentaram relatos de atividade larvicida de *Aedes aegypti* e *Culex pipiens* (PELAH et al., 2002) bem como possui também relatos de atividade antiinflamatória, hemolítica, antiviral, imunoestimulante e imunoadjuvante (ODA et al., 2000; SCHENKEL et al., 2003), antimicrobiana, inseticida e moluscicida (SPARGO et al., 2004). Estudos mais detalhados demonstraram a macela como

uma fonte rica de flavonoides singulares assim como grande quantidade de terpenos (mono e sesquiterpenos) (LORENZI; MATOS, 2002).

Apesar das reações colorimétricas serem confiáveis e de baixo custo elas não substituem análises por métodos mais robustos como a cromatografia líquida de alta eficiência com detectores diodo (HPLC- DAD) e a Cromatografia gasosa acoplada a massas (CG- MS). A cromatografia gasosa é um método de separação e análise de misturas com substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo com a fase móvel adequada (gás). Esse fluxo passa por um tubo contendo a fase estacionária onde ocorre a separação, as substâncias separadas saem da coluna dissolvidas em gás de arraste e passa por um detector. Como o extrato é uma matriz complexa e muitos dos seus constituintes não são voláteis naturalmente, foi realizado o procedimento de sililação (PELLATI; BENVENUTI, 2007). Essa etapa de preparação da amostra consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupos -OH, -SH, -NH e -COOH por grupos trimetilsilanos (TMS) ou *tert*-butildimetilsilanos (TBDMS), de modo a obter derivados com maior volatilidade e estabilidade térmica. Com esse procedimento foram detectados na CG-MS do (As<sub>EtOH</sub>) 63 picos e foram caracterizadas 29 substâncias sendo elas aminoácidos como a isoleucina TMS e prolina TMS, açúcares como d-glucose, d-galactose, xilitol TMS, ribitol TMS, álcoois como o farnesol, sorbitol TMS e o glicerol TMS e outros de maior importância área farmacêutica como o ácido fosfórico TMS, succinato TMS, ácido pirrolidônico, ácido málico TMS, ácido benzoico TMS, ácido linoleico TMS, ácido ftálico, heptacosano, quercetina TMS e stigmasterol TMS. O ácido fosfórico é comumente utilizado na indústria farmacêutica, em produtos para uso veterinário como os organoclorados que são derivados desse ácido (GEORGE et al., 2004). O flavonoide quercetina por sua vez possui propriedades farmacológicas como atividades anti-hipertensiva, antiarrítmica, hipocolesterolêmica, antihepatotoxicidade, anticarcinogênica (FORMICA; REGELSON, 1995), antiviral, antiulcerogênica, antitrombótica, anti-isquêmica, anti-inflamatória, antialérgica (INAL; KAHRAMAN, 2000; SHIRAI et al., 2002) e antioxidante (FORMICA; REGELSON, 1995). O ácido ftálico por sua vez é conhecido pela sua atividade antibacteriana e antifúngica (IMRAN et al. 2008; HASSAN et al. 2002). O ácido linoleico é necessário para manter sob condições normais membranas celulares, funções cerebrais e transmissão de impulsos (MARTIN et al. 2006). O ácido benzoico possui ampla

utilização na indústria alimentícia e farmacêutica, pois atua como um conservante natural (KAWAZE, et al. 2009). A análise cromatográfica gasosa do óleo essencial de *A. satureioides* apresentou 122 picos dentre os quais foram caracterizadas 58 substâncias com bases nos maiores picos e tempo de retenção em minutos, sendo eles basicamente terpenos como o  $\alpha$  pineno, o  $\beta$  mirceno, d-limoneno, eucaliptol,  $\beta$  ocimeno, verbenol, borneol, terpineol, oxido de limoneno,  $\alpha$  muurelene,  $\alpha$  gurgugene, aromadendrene, humuleno, pachouleno, azuleno, ,  $\alpha$ -campholeno aldeído, trans carveol, caryono, nonyne, copaeno,  $\alpha$  copaeno,  $\alpha$  gurgunene,  $\beta$  caryophylleno, germacrene, aromadendrene, humuleno, azuleno, cyclodecadieno, delta cadineno, patchouli, oxido cis limoneno, nerodiol, cedrol.

Estudo realizado com o óleo essencial de *A. satureioides* provenientes da Colômbia demonstrou a presença de trans-beta-cariofileno, oxido de cariofileno, muurolene, cadinene e alfa pineno (SIERRA et. al., 2015). Lorenzo et. al. (2000) analisou esse mesmo extrativo e identificou como compostos majoritários  $\alpha$ -pineno, Z- $\beta$ -ocimeno,  $\alpha$ -copaeno, E-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e  $\delta$ -cadineno, corroborando assim com nossos dados, apesar de algumas divergências possivelmente causadas pelo tempo de análise, tempo de armazenamento da amostra ou até mesmo condições e época de plantio. Os terpenos, comumente encontrado em óleos essenciais, geralmente são empregados no setor industrial como aromatizante e fragrâncias em cosméticos e produtos de perfumaria além de aditivos alimentares. A indústria farmacêutica possui grande interesse nessa classe de metabolitos, pois estudos apontam suas propriedades farmacológicas. Dentre as propriedades biológicas dos terpenos, encontram-se descritos os efeitos antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório e atividades antiparasitárias (PADUCH, et al., 2007).

*A. satureioides* possui diversas atividades relatadas como repelência a simulideos (borrachudo) identificada por Dal Magro et al. (1998), onde o extrato das flores apresentou 98,5% de eficiência. Rojas de Arias et al. (1995) evidenciam a atividade tripanocida (*Trypanossoma cruzi*) e inseticida (*Triatoma infestans*). Hieronymus (1882) e Lorenzi e Matos (2002) sugerem o efeito estimulante e anti-helmíntico, além do uso para o tratamento de patologias digestivas e intestinais, cólicas e diarreia.

Quando os estudos tratam de um fitoterápico, Costa et al. (2002) enfatizam a necessidade de validação científica como uma etapa inicial e obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos. Ensaio *in vitro* são utilizados como fase inicial da atividade a ser pesquisada, pois esses testes permitem selecionar espécies de plantas mais promissoras e excluir as sem potencial algum (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Sendo assim todos os testes realizados nesse trabalho foram *in vitro*, poupando cobaias e diminuindo gastos.

Com base na composição química rica em flavonoides, saponinas e taninos a macela foi testada sobre um problema frequente na pecuária, que é a infecção por endoparasitas, sendo o mais prevalente e danoso *H. contortus*. Visando uma possível solução para esse problema foram realizados testes *in vitro* com a finalidade de determinar a eficácia dos extrativos vegetais sobre diferentes estádios do parasita, dentre eles o Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL). Esse teste busca avaliar o desenvolvimento de larvas de nematódeos gastrointestinais frente a substâncias em que estão em contato. Nesse caso, avaliou-se o óleo e o extrato etanólico de macela sobre larvas de *H. contortus*. O teste realizado com o extrato etanólico apresentou 96,9% de inibição na concentração de 1,56 mg/mL e não houve diferença estatística até a concentração de 0,39 mg/mL em que a inibição foi de 82,1%. O teste realizado com o óleo essencial de macela apresentou 100% de inibição na concentração de 0,62 mg/mL e não houve diferença estatística da concentração de 0,15 mg/mL onde a porcentagem de inibição foi de 88,67%. As concentrações que demonstraram eficácia foram baixas, ou seja, com pequenas quantidades obtêm-se resultados positivos.

Outro teste realizado com *H. contortus* foi o Teste de Ecloração de ovos (TEO), que, diferentemente do TDL, avalia a porcentagem de ovos do parasita que continuam viáveis frente à substância testada. Caso os ovos se tornem inférteis quando depositados no ambiente, não chegarão a eclodir quebrando-se assim o ciclo e impedindo que se torne larva infectante. A concentração de 100 mg/mL do extrato etanólico de macela apresentou 68,9% de inibição. O óleo essencial apresentou 100% de inibição na concentração de 50 mg/mL e não diferiu estatisticamente da concentração de 25 mg/mL, onde a porcentagem de inibição foi

de 92,6%. Essa maior eficácia em menores concentrações no TDL em relação ao TEO ocorre devido ao fato de que as larvas são mais sensíveis aos agentes bioativos que os ovos (CALA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012). Podemos considerar que os extrativos de *A. satureioides* foram bons larvicidas, quanto a atividade ovicida, podemos concluir que o extrato etanólicos se apresentou menos eficiente.

Muitas espécies vegetais já foram testadas frente aos parasitas gastrintestinais de ruminantes com essas metodologias e várias já apresentaram resultados positivos como os óleos essenciais de *Lippia sidoides* (Alecrim pimenta) e *Croton zehntneri* (Canela brava) que inibiram a eclosão de ovos em mais de 98% na concentração de 1,25 mg/mL e em mais de 90% o desenvolvimento larvar na concentração de 10 mg/mL (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007). Em comparação, os testes realizados nesse trabalho demonstraram que o óleo essencial de *A. satureioides* possui alta eficácia no sobre larvas de *H. contortus*, pois a concentração letal de 90% dos parasitas que permaneceram em contato com o óleo 0,12 mg/mL e o extrato etanólico apresentou  $CL_{90}$  de 0,39 mg/mL. No teste de eclodibilidade dos ovos, o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (manjeriço) apresentou 100% de inibição na eclodibilidade dos ovos na concentração de 50% (PESSOA et al., 2002). O óleo essencial de *E. globulus* obtido comercialmente apresentou resultados na concentração de 21,75 mg/mL de 99,07% de inibição na eclosão e 98,7% na concentração de 43,5 mg/mL no desenvolvimento larvar de *H. contortus* (MACEDO et al., 2009; 2010).

Com extratos necessita-se de uma dose maior como podemos observar nos resultados do presente trabalho e também em outros como o desenvolvido por Maciel et al. (2006). Estudo realizado com extrato hexânico de folhas de *Melia azedarach* a 50 mg/mL inibiu apenas 51,31% a eclosão de larvas e 8,10% o desenvolvimento larvar. A fração etanólica do extrato hexânico obtido das sementes da *Mangifera indica* (manga) L. foram testados sobre ovos de *H. contortus* por meio do TEO e demonstrou-se eficaz na concentração de 50 mg/mL inibindo 95,6% (COSTA et al., 2002). O extrato etanólico de *Azadirachta indica* (neem) inibiu a eclosão de ovos em 100% na concentração de 12,5 mg/mL e o desenvolvimento larvar de 87% na concentração de 50 mg/mL.

A comparação entre o extrato e o óleo de *A. saturoioides* sugere que frente aos ovos de *H. contortus* sendo é necessário uma alta dose para se atingir a CL<sub>90</sub>.

Sabe-se que há aproximadamente 55 espécies de plantas pertencentes a 26 famílias que foram avaliadas para a atividade contra *R. (B.) microplus*, várias das quais apresentaram atividade inseticida e/ ou acaricida (BORGES et al., 2011). O teste de imersão de fêmeas foi realizado com diferentes concentrações do extrato etanólico produzido a partir das inflorescências de *A. saturoioides* e avaliou parâmetros de eficácia, redução de postura e de eclodibilidade. Em relação à eficácia sobre as fêmeas ingurgitadas do carrapato, a concentração de 100 mg/mL foi a que apresentou melhor resultado inibindo 100% da postura e não diferiu estatisticamente da concentração de 50mg/mL em que a porcentagem de inibição foi de 92,3% demonstrando assim que uma dose menor apresenta o mesmo resultado. A espécie *Tagetes minuta* na concentração de 20% apresentou 99,98% de inibição de eclosão (ANDREOTTI et al., 2013) e o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* apresentou eficácia máxima a 25%, *Eucalyptus globulos* a 10% e *Eucalyptus staigeriana* a 15% (CHAGAS et al. 2002).

Outro teste realizado é o teste de contato em papel impregnado, esse procedimento é recomendado pela FAO e amplamente utilizado para detecção de resistência á carrapaticidas comerciais podendo ser utilizado também para a avaliação de extrativos vegetais. Nesse trabalho avaliou-se o extrato etanolico e o óleo essencial de *A. saturoioides* sobre o carrapato do boi e o carrapato do cão. O extrato etanólico solubilizado em etanol 50% apresentou 67,34% de mortalidade sobre larvas de *R. (B.) microplus* na concentração de 100 mg/mL enquanto o óleo essencial solubilizado em Tween 2%, apresentou 18,5% na concentração de 100 mg/mL. Dentre outras espécies vegetais que apresentaram eficácia sobre as larvas de *R. (B.) microplus*, estão outras espécies da família Asteraceae como a *Tagetes minuta* apresentou na concentração de 20% de seu óleo essencial, ótimos resultados com 99,98% de mortalidade sobre larvas (ANDREOTTI et al., 2013). Os óleos essencias de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus staigeriana* a 10% apresentaram 100% de eficácia, enquanto *Eucalyptus globulus* apresentou eficácia máxima na concentração de 20% sobre larvas (CHAGAS et al., 2002).

Esse mesmo teste apresentou resultados inferiores quando realizado com a espécie *R. sanguineus*. A maior porcentagem de mortalidade obtida frente ao extrato etanólico de *A. saturoioides* ficou em 32,21% e as concentrações letais capazes de causar 50 e 90% de mortalidade ficaram em 119,73 mg/mL respectivamente, o óleo essencial dessa mesma espécie apresentou 56,55% de mortalidade na concentração de 100mg/mL. Estudos com extrato etanólico 70% das partes aéreas de *Tagetes patula* frente a espécie *R. sanguineus* demonstrou melhores resultados comparados ao extrato de *A. saturoioides*, com a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> de 7,3 mg/mL e 49,4 mg/mL (POLITI, 2012), assim como o extrato de cascas de *Sapindus saponaria* (sapindaceae) que apresentou CL<sub>90</sub> de apenas 3,92 mg/mL (FERNANDES et al. 2008).

Os testes realizados com o ectoparasita *R. (B.) microplus* demonstraram que as fêmeas ingurgitadas são mais sensíveis ao extrato do que a larva. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), regulamenta que para um carrapaticida ser registrado, deve possuir eficácia mínima de 95% (BRASIL, 1997). Com base nessa regulamentação, pode-se concluir que o extrato etanólico proveniente das inflorescências da *A. saturoioides*, apesar de necessitar de uma alta dose, possui eficácia sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Assim como os resultados encontrados nesse trabalho que demonstraram uma maior sensibilidade de fêmeas ingurgitadas, Domingues et al. (2013) observou o mesmo comportamento em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, onde o extrato aquoso de *Ananas comosus* (abacaxi) também apresentou mais eficácia sobre fêmeas ingurgitadas. Esse fenômeno pode ser explicado devido à diferença das ceras que compõem a cutícula das diferentes fases dos carrapatos (BALASHOV, 1972).

Outro fator relevante que deve ser considerado é o da utilização de solventes em testes *in vitro*. Nesses ensaios foram utilizados Tween, um solvente lipofílico, e etanol, como solvente polar, Chagas et al. (2003) verificou que os solventes juntamente com compostos apolares causam uma maior destruição das camadas cerosas de fêmeas ingurgitadas levando a perda de água ocasionando maior mortalidade, porém, em relação às larvas, esse fato não ocorre. Deve-se considerar também o fato de que os dois testes possuem enfoque diferente. No teste de imersão de fêmeas são observados diversos parâmetros, tais como redução da oviposição e incubação. Todos estes parâmetros são utilizados para calcular a

eficácia do tratamento. No teste de contato em papel impregnado apenas o parâmetro mortalidade é avaliado.

Chagas et al. (2003) avaliou diversos solventes para testes com *R. (B.) microplus* e demonstrou que o álcool etílico não é tóxico para larvas em concentrações de até 75%. Como nesse trabalho foi utilizado apenas etanol 50% não houve interferência do solvente na porcentagem de mortalidade.

Para avaliar a segurança desses extrativos frente a possíveis testes *in vivo*, foi avaliada a citotoxicidade dos mesmos. A linhagem selecionada para essa avaliação foram queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Os queratinócitos são as células mais presentes no tecido epitelial e apesar da linhagem selecionada ser de origem humana, os queratinócitos também estão presentes nos animais o que justifica a utilização dessa linhagem para aferir a citotoxicidade desses extrativos. O método avaliado consiste no cultivo da célula em placas de cultura nas quais após um tempo decorrido são adicionadas diferentes concentrações da substância a ser testada aos poços e a viabilidade celular é determinada pela absorção do corante utilizado para revelação do teste através da membrana de células mortas. Os ensaios determinaram que em altas concentrações tanto o extrato, quanto o óleo, apresentaram citotoxicidade, tornando os queratinócitos inviáveis. Para avaliar o óleo essencial foram determinadas concentrações de 200 a 6,25 µg/mL, já para o extrato as concentrações analisadas foram de 500 a 16,62 µg/mL. O óleo essencial se mostrou menos tóxico na concentração de 12,5 µg/mL apresentando 88,32% a porcentagem de células viáveis. O extrato etanólico foi testado em maiores concentrações e a maior porcentagem de células viáveis foi encontrada na concentração de 31,25%. As  $CL_{50}$  calculadas foram 13,98 µg/mL para o óleo essencial e 9,30 µg/mL para o extrato etanólico. No teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (TIF) foi necessário pelo menos 12,5 mg/mL do óleo essencial para atingir a eficácia de 92,9% que não diferenciou estatisticamente da maior concentração testada que foi a de 50 mg/mL, onde obteve-se 100% de eficácia. Na citotoxicidade, o óleo em concentração muito menor se mostrou tóxico. Nesse mesmo teste, todavia utilizando o extrato etanólico, a concentração mais baixa que apresentou eficácia foi de 50 mg/mL, sendo essa tóxica para a linhagem celular avaliada.

Os efeitos tóxicos dos extrativos de *A. saturoioides* ainda são pouco conhecidos, apesar da sua grande utilização na medicina popular (RIVERA et al., 2004). Os constituintes mais significantes extraídos por etanol das inflorescências dessa espécie são os flavonóides quercetina, 3-Ometilquercetina e luteolina (SIMÕES et al., 1984), além de também serem frequentemente encontrados os ácidos caféicos, clorogênicos, isoclorogênicos e glicolipídios (MENDES et al., 2006). Os extratos aquosos de macela foram testados para a presença de atividade genotóxica em microrganismos por Vargas et al. (1990), e os resultados positivos foram relacionados à presença da quercetina e do ácido caféico nesses extratos.

*A. saturoioides* possui entre seus metabolitos secundários taninos, a presença de taninos é atribuída a possível inibição da divisão de células em células meristemáticas *Allium cepa* (TEIXEIRA et al., 2003). Alguns estudos como o realizado por Musonda e Chipman em 1998 demonstrou que os flavonoides são capazes de causar variabilidade na função celular como a modulação da sinalização celular, alterando assim a proliferação e a citotoxicidade em linhagens celulares de câncer (KUNTZ et al., 1999). Estudo realizado por Ruffa et al. (2001), avaliou o potencial citotóxico do extrato metanólico de *A. saturoioides* frente a carcinoma hepatocelular humano, linhagem celular HB 8065–Hep G2 e o extrato apresentou resultado positivo para citotoxicidade com a CL50 encontrada em 237 microgramas por mL corroborando assim com o potencial citotóxico encontrado em nosso trabalho.

Apesar desses efeitos significativos frente aos parasitas testados, os extrativos apresentaram certa toxicidade frente a linhagem celular avaliada. Já era esperado esse resultado devido ao seu potencial antiproliferativo, entretanto esses extrativos devem ser avaliados frente a outras linhagens celulares para esclarecimento de suas propriedades.

## **8. CONCLUSÕES**

O extrato e o óleo essencial de *A. saturoioides* apresentaram alta porcentagem de eficácia em baixas concentrações no teste de desenvolvimento larvar e inibição da eclosão de ovos de *H. contortus*. O óleo essencial sobre o parasita gastrointestinal *H. contortus*, mostrou-se ser 10,75 vezes mais potente que

o extrato na inibição do desenvolvimento larvar e 25,14 vezes superior que o extrato sobre a inibição da eclodibilidade dos ovos. O extrato etanólico e o óleo essencial apresentaram resultados significativos sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* chegando a inibir totalmente a postura na concentração de 100 mg/mL e 50 mg/mL respectivamente. Os testes realizados com larvas de *R. (B.) microplus* e *R. sanguineus* não apresentaram altas porcentagens de eficácia. Sendo assim conclui-se que o extrato e o óleo essencial da espécie *A. saturoioides* possuem eficácia frente ao endoparasita *H. contortus* e fêmeas adultas de *R. (B.) microplus*.

## REFERÊNCIAS

ADAMOLI, R. Unconventional therapies in HIV infection: a working perspective. In: XII National Conference ANLAIDS. 1998.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras, conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus Editora, 1993. p.341.

AMARANTE, A. F. T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.461- 473.

AMARANTE, A. F. T. Nematoides gastrintestinais em ovinos. In: CAVALCANTE, A. C. R. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 19-61.

ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; BARROS, J. C. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 341-345, 2013.

BALASHOV, Y. S. **Bloodsucking ticks (Ixodoidea) vector of diseases of man and animais**. Miscellaneous Publication Entomology Society American., v. 8, no. 5, p. 159-376, 1972.

BATH, G.F.; VAN WYK, J.A. Using the Famacha system on commercial sheep farms in South Africa. In: INTERNATIONAL SHEEP VETERINARY CONGRESS, 1., 1992, Cidade do Cabo, África do Sul. **Anais**. Cidade do Cabo: University of Pretoria, 2001. V.1. 346p. p.3.

BIZIMENYERA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p.336-343, 2006.

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

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p. 408-420, 2006.

BRASIL. LEI n. 9.456, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9456.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9456.htm) Acesso em: 26 set. 2016.

BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, R. A.; CABRAL FILHO, S. L.; HUNTLEY, J. F. HOUDJICK, J. G. M.; ABDALLA, A. L.; GENNARI, S. M. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines Lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 134. p 99-109,2005

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G., Distribucion de las *Rickettsiasis* em Mexico (tifo murinho, tifo clássico y fiebre manchada). **Revista Instituto Salud Enfermedades Tropicales**, v.8, p. 3-4, 1947.

CALA, A.C.; CHAGAS, A.C.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; MATOS, A.P.; BORGES, L.M.F.; SOUZA, L.A.D.; SOUZA, F.A.; OLIVEIRA, G.P. *In vitro* anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia claussenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**. v.130,p 98-102,2012

CALVO, D.; CARIDDI, L. N.; GROSSO, M.; DEMO, M. S.; MALDONADO, A. M. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus spp.* And immunomodulating effects on human lymphocytes. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.48, p.247-255, 2006.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3-4, p.288-294, 2007

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CASTRO L. O.; CHEMALE V. M. **Manual de identificação e cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Agronômicas, 1995. p.78.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; PRATES, H. T.; PASSOS, W. M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n. 1 p. 109-114, 2003.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis

de *Eucalyptus spp* em *Boophilus microplus*. **Brazilian Veterinary Reserch Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHAGAS, A.C.S; NICIURA, S.C.N.; MOLENTO, M.B. **Manual prático Metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p. 35-44, 1992.

COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; CASTRO, C.M.S.; BRAGA, R.R.; OLIVEIRA, L.M.B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v.74, p.284-287, 2008.

COSTA, C. T. C.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.11, p.57-60, 2002.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 3, p. 1032.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1/2, p.149-155, 2005.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J. J. R.; ZAKI S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587-594, 2005.

DAL MAGRO, J.; RENK, M.H.; GARCIA, F.R.M.; YUNES, R.A.; MAGRO, D. Eficiência de repelentes à base de extratos de *Achyrocline satureioides* e Cucurbita pepo sobre simulídeos. XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Águas de Lindóia, Anais do Congresso, p.163, 1998.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.

DE SOUZA, K. C.B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V.L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 28: 771-777.2002

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC ("Marcela"). **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v.31, p.1163-1170, 1998.

DOMINGUES, L.F.; GIGLIOTI, R.; FEITOSA, K.A.; FANTATTO, R.R.; RABELO, M.D.; DE SENA OLIVEIRA, M.C.; BECHARA, G.H.; DE OLIVEIRA, G.P.; BARIONI JUNIOR, W.; CHAGAS, A.C.S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**, v.97, p.263– 270, 2013.

DONALD, A.D.; MORLEY, F.H.W.; WALLER, P.J.; AXELSEN, A. & DONELLY, J.R., Availability to of gastrointestinal nematode infection arising from summer contamination of pastures. **Australian Veterinary**. J. 29: 189-20, 1978.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H.. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests for insecticides. **Journal of Economic Entomology**, 66, 130-133.1973.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELENA, C., Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.14, p.6-8, 2004. em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 11 ago. 2015.

DUKE, J. A. Toxins: their toxicity and distribution in plant genera. In: **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 525- 568

MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Org.) **State of the Brasil's plant genetic resources**; Second National Report Conservation and Sustainable Utilization for Food and Agriculture. Brasília, DF: EMBRAPA, 2009. p.163.

EREMEEVA, M. E.; ZAMBRANO, M. L.; ANAYA, L.; BEATI, L.; KARPATHY, S. E.; SANTOS-SILVA, M. M.; SALCEDA, B.; MACBETH, D.; OLGUIN, H.; 25 DASCH, G. A.; ARANDA C. A. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus Ticks*, Mexicali, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 418- 421, 2011.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F.M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 15, p. 381-391, 2005.

FAO. **Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for larvae of cattle**

ticks, *Boophilus* spp. FAO Method No. 7. FAO Plant Protection Bulletin 19, 15–18, 1971.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Resistance management and integrated parasites control in ruminants. Guidelines, module 1: ticks - acaricide resistance, diagnosis, management and prevention.** Rome: Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Organization, 2003. p.25-77.

FERNADES, F. F.; D'ALESSANDRO, W. B. D.; FREITAS, E. P. S. 2008. Toxicity of Extract of *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae). **Neotropical Entomology**, v.37, n.2, p.205-208, 2008.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos.** São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 502p.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chemical Toxicology**. v. 33, p. 1061-1080, 1995.

FURLONG, J. Poder infestante de larvas de *Boophilus microplus* (ACARI:IXODIDAE) em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.4 , p.635- 640, 1998.

GARCIA, G. H.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; CAMPOS, R. Biological and chemical characterisation of the fraction with antiherpetic activity from *Achyrocline fl accida*. **Planta Medica**, v.65, p.343-346, 1999.

GARCIA, G. H.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; TORRES, R.; COUSSIO, J.; CAMPOS, R. Antiviral activity of *Achyrocline fl accida* Wein DC aqueous extract. **Phytotherapy Research**,v. 9, p.251-254, 1995.

GAUSS, C.L.B.; FURLONG, J.; Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus Microplus* em pastagem de *Brachiaria Decumbens*. **Ciencia Rural**, v.32, n.3, 2002.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of there parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, n 1 p.353-366, 2004.

GILL, B.S. Anthelmintic Resistence In India. **Veterinary Parasitology**, v. 63, p. 173-176, 1996.

GILL, H. S.; LEJAMBRE, L. F. Novel aproaches to the control of helmintic parasite of livestock. **International Journal of Parasitology**, v. 26, p. 797-798, 1996.

GIL,J.F.R.; GOMEZ, M.B.; TREJOS, J.S. Citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados de Brownea ariza Brent. **Vitae**. v. 16, n. 1, p. 93-101, 2009.

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A.; Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**; p 99: 2507–2515.2008.

GODDARD, J. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 6, p. 628-629, 1989.

GOMES,A. **Carrapato de boi**: Prejuízos e controle. [on line] disponível na internet via URL: <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>. Acesso em: 23 ago. 2016.

GONÇALVES, J. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e triagem fitoquímica dos extratos de espécies da família Asteraceae encontradas no semi-arido baiano**. Dissertação apresentada para receber o título de Mestre em Biotecnologia pela Faculdade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 2010.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; FRANCO, N. A vida livre do *Boophilus microplus*. **Arquivo Faculdade de Veterinaria, UFRGS**.v. 3, p. 21-28, 1974.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* em bovinos estabulados. **Arquivo Faculdade de Veterinaria**, UFRGS, v.2, p. 25–34, 1975.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do autor. 1995.

GOTHE, R.; WEGEROT, S.; WALDEN R.; WALDEN, A. On the epidemiology of infections with *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* in dogs in Germany. : **Kleintierpraxis**, v.34, n.7, p. 309 – 320,1989.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEON, A. A. P., 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.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA, B. G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, p. 8-10, 2002.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospect for Plants Antihelmintics in Tropical Veterinary Medicine, **Veterinary Research Communication**, v.21, p. 213-228, 1997.

HASSAN, M. V.; CHAHAN, Z. H.; SUPERAN, C. T. **Main group Metal Chemistry**; v. 25; p.291-296; 2002.

HIERONYMUS, J. *Plantae diaphoricae florum argentinæ*. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba** (República Argentina). Buenos Aires. p.199-598, 1882.

HORN, S. C. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos**. Boletim Defesa Sanitaria Animal; Brasília: Ministério da Agricultura; 1983.

HOUNZANGBE-ADOTE, M. S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; MOUTAIROU, K.; HOSTE, H. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 155-160, 2005.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v.130, p. 442-446, 1992

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2010**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/tabelas\\_pdf/tabela02.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/tabelas_pdf/tabela02.pdf)> Acesso em: 05 set. 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/pecua> Acesso em: 25 set 2016.

INAL, M. E.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, v. 154, p. 21-29, 2000.

JABBAR, A.; IGBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G; KHAN, M. N.; AFAQ, M.; Anthelmintic resistance: The state of play revised. **Life sciences**; v.79; p. 2413-2431; v.2006.

JASMER, D.P.; MCGUIRE, T.C. Protective immunity to a blood feeding nematode (*Haemonchus contortus*) Induced by Parasite Gut Antigen. **Infection and Immunity**; v.59 ; p. 4412- 4417; 1991.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H., Comparative analysis of effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition** v.38, 133–142.1999

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE, I. **Anais**.Viçosa 2006. P. 63-72.

LABRUNA, M. B; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.30, p.24-32, 2001.

LABRUNA, M. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* ( Acari :Ixodidade). In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA & I SIMPOSIO LATINO AMERICANO DE RICKETISSIOSES, Ouro Preto, MG, 2004.

LE JAMBRE, L. F. Ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.70, p.357, 1993.

LEONARD, J.A.; WAYNE, R.K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLEN, S.; VILA C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science**, v. 298, p. 1613-1616, 2002.

LIMA, C.S.A. **Estudo químico e biológico de *Achyrocline satureioides* DC.** Recife, PE: Centro de Ciências da Saúde, UFPE, 1990. Dissertação de mestrado, Recife: UFPE, 1990.

LOPEZ, P.; BROUSSALIS, A.; RODRIGUES, M.; COUSSIO, J.; Ferraro, G. Análisis de muestras comerciales de “marcela” (*Achyrocline satureioides*). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.15, p. 243-249, 1996.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas**, Nova Odessa: Inst. Plantarum, 2002. p. 451-452.

LORENZI, H. ; **Plantas Daninhas do Brasil**. 3<sup>a</sup> ed. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2000. p.116.

LORENZO, D.; ATTI-SERAFINI, L.; SANTOS, A. C.; FRIZZO, C. D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. *Achyrocline satureioides* essential oils from southern Brazil and Uruguay. **Planta Medica**, v. 66, p. 476-477.2000.

LUCAS, D. A. P.; RODRIGUES, M. R. A.; ALVES, G. H. Caracterização dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *Achyrocline satureioides* Lam. DC via GC- MS e GC- FID; In: **49 Congresso Brasileiro de Química** Porto Alegre / RS 04 a 08 de outubro de 2009

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA; L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R., QUEIROZ JUNIOR, E. M.; PORTELA, B. G., BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S.; Atividade ovicida e larvicida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA; L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R., QUEIROZ JUNIOR, E. M.; TOMÉ, A. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 93-98, 2010.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C.; CASTRO, C.M.S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia*

*azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology** 140, 98-104. 2006.

MAGALHÃES NETO, M.A.; BENEDETTI, E.; CABRAL, D.D. Homeopatia no controle de carrapatos em bovinos leiteiros. In: XVII SECIVET, 2004, UBERLANDIA. **ANAIS DA XVII SECIVET**. UBERLANDIA: SECIVET - UFU, 2004. 1 CD.

MARQUES JUNIOR, J. M.; DENARDIN, E. L. G.; TRETBOHL, L. A. C.; SCHENEIDER, E. G.; MOREIRA, C. M. Análise fitoquímica como estudo da qualidade de *Achyrocline satureioides* (lam) DC. **Anais do Salão Internacional de Ensino e Pesquisa**. v. 1, p.1, 2009.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2000. 346 p.

MATTOS, M.J.T.; SCHMIDT, V.; BASTOS, C.D. Atividade ovicida de dois fármacos em caprinos naturalmente parasitados por nematódeos gastrintestinais, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.30, p.893-895, 2000.

McKOSKER, P.L. The global importance of Babesiosis. In: RISTIC, M.; KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981.

McLEOD, R. S. Costs of major parasites to the Australian livestock industries. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 1363-1367, 1995.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolípídios em plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 568-575. 2006.

MIYASHIRO, C.A.H.V. **Avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do flavonóide rutina e derivados contendo metal de transição**. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Universidade Bandeirante de São Paulo; 2010.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J. Método Famacha: nova estratégia no controle de endoparasitoses em pequenos ruminantes. **Veterinária In Foco**, São Paulo, p. 17-19, set. 2003.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

MUSONDA, C.A.; CHIPMAN, J.K. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1583 – 1589.1998.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tickborne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v.57, p. 153-165.1995.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **NIST Livro de química na web**. Base de dados de referência padrão do NIST. v. 11, número 69, p. 463-471, 1963.

ODA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, T.; KATAYAMA, S.; OHGITANI, T.; YOSHIKAWA, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biological Chemistry**, v. 381, p. 67-74, 2000.

PADILHA, T. **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: Embrapa; CNPGL, 1996. 258p.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologic Therapy Experimental**. v.55, p.315–327, 2007.

PELAH, D.; ABRAMOVICH, Z.; MARKUS, A.; WIESMAN, Z. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.81, p. 407-409, 2002.

PELLATI, F., BENVENUTTI, S. Chromatographi and eletroproretic methods for the analysis of phenethylamine (corrected) alkaloids in *Citrus aurantium*. **Journal Cromathography**, v.344, p. 71-88, 2007

PESSOA, C. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil **Phytotherapy Research**, v.14, p.187-191, 2000.

PESSOA, L.M.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1-2, p.59-63, 2002.

POLITI, F. A. S. **Caracterização fitoquímica e avaliação dos potenciais antimicrobiano e carrapaticida de extrativos vegetais de *Tagetes patula* L. (Asteraceae)**. Tese (Doutorado) – Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2012.

PINHEIRO, A.C. Aspectos da verminose dos ovinos. In: 1ª Jornada de Produção Ovina no Rio Grande do Sul. **Anais**. Bagé, RS, p.140-148, 1979.

RAMOS, C. C. **Propriedades anti-inflamatórias de flavonoides – mecanismos de acção celular**. Dissertação (Mestrado) Lisboa: Universidade de Lisboa; 2009.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; SOUZA, A. P. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 473-477, 2002.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsious os paradigms of new and emerging infections diseases. **Clinical Microbiology Reviws** v.10, p. 694-719.1997.

RATERA, E. L.; RATERA, M. O. **Plantas de la flora argentina empleadas em medicina popular**. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1980.

RITTER, M.R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTH, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia** v.12, p. 51-62, 2002.

RIVERA , F., et al Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC (macela). **Journal of Ethnopharmacology**, v 95, n.2-3, p.359, 2004

ROCHA, C. M. B. M. **Percepção e atitude de produtores de leite de Minas Gerais de diferentes estratos de produção em relação ao *Boophilus microplus***. 2005. 62p. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

ROJAS DE ARIAS, A.; FERRO, E.; INCHAUSTI, A.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.35- 41, 1995.

SAITO, E.; FURLAN, C.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.A. cromatografia líquida a vácuo na análise qualitativa e quantitativa de flavonóides em *Achyrocline satureioides*. **Revista Fitos**, v.1, n.1, p.57-59, 2005.

SANTOS, A. L. G.; RIPOLLI, D.; NARDI, N.; BASSANI, V. L. Immunomodulatory effect of *Achyrocline satureioides*(Lam) DC aqueous extracts. **Phytotherapy Research**, v.13, p. 65-66, 1999.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 711-740.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K. F.; CATTO, J. B.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 229-236, 2010.

SEIFERT, G. M.; SPRINGELL, P. H.; STACHELL, R. J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Parasitology**, v. 58, p. 41, 1968.

SERRA-FREIRE, N. M. Doenças Causadas por Carrapatos. In: MARCONDES, C. B. **Doenças transmitidas e causadas por Artrópodes**. São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 27, p. 377-402.

SHIRAI, M.; YAMANISHI, R.; MOON, J. H.; MUROKA, K.; TERAU, J. Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, p. 1015-1021, 2002.

SILVEIRA, R.X.; CHAGAS, A.C.S.; BOTURA, M.B.; BATATINHA, M.J.M.; KATIKI, L.M.; CARVALHO, C.O.; BEVILAQUA, C.M.L.; BRANCO, A.; BORGES, S.L.; ALMEIDA, M.A.O. Action of sisal (*Agave sisalana* Perrine) extract in the *in vitro* development of sheep and goat gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**. v.131, p.162-168.2012

SIMÕES, C. M. O. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. **Fitoterapia**, v.54, p. 419-421, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela)**. Porto Alegre, 1984. 186p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Curso de Pós Graduação em Ciências

Farmacêuticas da UFRGS. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande de Sul, 1984.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, Compositae. **Journal Ethnopharmacology**, v.22, 281-293, 1988.

SIMONI, I. C. Plantas com poder curativo na saúde animal. **Instituto Biológico**, São Paulo, n. 155, 19 abr. 2011. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=155](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=155)>. Acesso em: 5 set. 2014.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v.37, n.2, p.119-126, 1976.

SPARGO, S. G.; LIGHT, M. E.; van STADEN. J. Biological activities and distribution of plants saponins **Journal Ethnopharmacology**. v.94, p. 219, 2004.

SPEROTTO, V. R. **Atividade antibacteriana *in vitro* do decocto de *Achyrocline satureioides* (LAM) D. C. – Asteraceae- (macela) sobre bacterias isoladas de mastite bovina**. Dissertação do programa de Ciências Veterinárias pela Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, 2010.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM-SAS, 2002/2003. **SAS/INSIGHT User's Guide**, versão 9.1.3, versão para Windows. Cary: SAS Institute, 2002/2003. CD-ROM.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 128-213

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assesment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L and *Achillea millefolium* L. *in vivo* assays. **Genetic Molecular Biology**, v.26, p. 551-555, 2003.

TIEFENTHALER, A. **Homeopatia para animais domésticos e de produção**. São Paulo: Ed. ANDREI, 1996. 332p.

TOURSARKISSIAN, M. **Plantas medicinales de la Argentina**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1980. p.67-178.

VAN DEN DOOL, H. DEC KRATZ, P. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal Chromatography**, v.11, 463-467, 1963.

VAN WYK, B. E.; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. **Medicinal Plants of South Africa**. 2nd Improved Impression, 2000. Pretoria: Briza Publications, 1997.

VARGAS, V.M.; MOTTA, V. E.; LEITÃO, C.A.; HENRIQUE, J. A. Effects mutagenic and genotoxic of extracts aqueous of *Achyrocline satureoides* on prokaryotic organism. **Mutation Research**, v. 240, p.13-18.1990.

VENDRUSCULO, G. S.; RATES, S.; MENTZ, L. A.; Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.15, p. 361-372, 2005.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium* (L) skeels and *cissus sicyoides* L. medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta scientarium**, v.23, p. 593- 598, 2001.

VIEIRA, L.S. et al. **Redução do número de ovos por grama de fezes ( OPG) em caprinos medicados com anti-helminticos**. Sobral: EMBRAPA, 1989. 18p. (Boletim de Pesquisa, n.11, 1989).

VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico.** Tese (Doutorado em Ciência: Química Orgânica)- Departamento de Química da UFPR, Curitiba: UFPR, 2005.

WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E.; HORAK, I.G. (ed.). **The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world.** Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 655p.

WALLER, P. J. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 1-14, 2006.

WASIK. R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleo essencial. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, v.81, p. 1-7, 1963.

WHO. **Monographs selected medicinal plants.** Geneva: WHO, 2002. v. 2, p.362.