

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Campus de Araraquara**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Avaliação acaricida de derivados naturais de  
*Achyrocline satureioides* e de *Schinus  
lentiscifolius* em associação com produtos  
biotecnológicos obtidos de fungos  
entomopatogênicos sobre o carrapato do boi  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Rafaela Regina Fantatto**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina L. R. Pietro**

**Coorientadora: Dra. Ana Carolina de Souza Chagas**

**Araraquara**

**2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Campus de Araraquara**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Avaliação acaricida de derivados naturais de  
*Achyrocline satureioides* e de *Schinus lentiscifolius* em  
associação com produtos biotecnológicos obtidos de  
fungos entomopatogênicos sobre o carrapato do boi  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Rafaela Regina Fantatto**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas..

**Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina L. R. Pietro**

**Coorientadora: Dra. Ana Carolina de Souza Chagas**

**Araraquara**

**2021**

**Dedico esse trabalho a todos que acreditam que a educação é a arma para mudar o mundo.**

## **Agradecimentos**

Com o coração cheio de gratidão escrevo esses agradecimentos, pois nada disso teria sido possível sem as pessoas que passaram no meu caminho durante essa jornada.

Agradeço primeiramente à minha orientadora Profa. Dra. Rosemeire Pietro, que confiou no meu potencial e me deu a oportunidade de concluir o mestrado e o doutorado sob a sua supervisão, por sempre estar disposta a ajudar, correr atrás dos meus sonhos comigo, dividir seus conhecimentos acadêmicos e de vida.

Agradeço também à minha coorientadora Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, que me deu a primeira oportunidade quando eu mesma me sentia incapaz e tudo o que eu sabia era perguntar “CPF na nota?”. Se não fosse a sua confiança e a primeira oportunidade em estagiar no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste eu não chegaria até aqui.

Algumas pessoas nos marcam e nos direcionam para alguns caminhos. E eu não poderia deixar de agradecer as que passaram pela minha vida acadêmica: Luciana Ferreira Domingues, Marcio Dias Rabello, Yousmel Alemán Gainza e Flávio Augusto Sanches Politi por sempre me ensinarem, direcionarem e motivarem.

Agradeço aos meus amigos de caronas, almoços, conselhos, desabafos e conversa que fizeram os dias de laboratório mais animados Rodrigo Sorrechia e Barbara Kapp. Agradeço também a todos os que convivi no Laboratório de Sanidade Animal (novo Parasitologia Veterinária) em especial à Amanda Figueiredo pela super ajuda nas coletas de carrapatos e a todos que encontrei no BiotecFar.

Agradeço à Camila Rodero e Marlus Chorilli pelo suporte e por sempre estarem disponíveis a ajudar, aos funcionários da secretaria de pós-graduação por toda a atenção dispensada. Aos funcionários de campo da Embrapa Pecuária Sudeste por sempre tratarem tão bem os animais

Agradeço à banca de qualificação Dr. Alessandro Minho e Profa. Dra. Ana Helena Januário e a banca de defesa Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, Prof. Dr. João Aristeu Rosa, Prof. Dr. Hernane Barud e Profa. Dra. Angeles Sonia Olmeda pelas contribuições.

À Professora Dra. Angeles Sonia Olmeda, ao Dr. Felix Valcarcel Sancho e aos demais membros do laboratório de parasitologia do INIA pela ótima recepção, por todo carinho, atenção e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Azucena Gonzalez Coloma por me receber tão bem em seu laboratório. Agradeço aos meus pais, Luzia e Celso por nunca medirem esforços para apoiar os meus estudos e por tudo o que fazem por mim . Agradeço também à minha tia Wilma (titia) por sempre vibrar com cada pequena conquista e por todo carinho.

Aos meus avós (*in memoriam*) pelo amor e carinho.

Ao Osni Ribeiro Neto pelo incentivo, apoio, amor, por dividir os problemas, os medos e os planos futuros.

Ao CNPq pela bolsa concedida, à Capes pela bolsa de Doutorado sanduíche e à FAPESP pelo auxílio financeiro do projeto.

De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos, antes de terminar...  
Façamos da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

## Resumo

Apesar da importância social e comercial da bovinocultura, infestações por ectoparasitas, como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, apresentam-se como um grande empecilho econômico. O controle atualmente é realizado por meio de carrapaticidas sintéticos e o seu uso indiscriminado tem contribuído para o surgimento da resistência dos parasitas à maioria das moléculas disponíveis. Assim, alternativas efetivas, economicamente viáveis e potencialmente seguras devem ser investigadas, como o uso de derivados naturais associados a fungos entomopatogênicos. Esse estudo avaliou extrativos vegetais de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. e *Schinus lentiscifolius* (March.) D. C., associados e não associados ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, bem como à enzima quitinase por ele produzida, sobre diferentes estágios do ciclo de vida do carrapato do boi *R.(B.) microplus*. A atividade carrapaticida dos extratos vegetais, do fungo, das associações dos mesmos e quitinase, foi analisada por testes *in vitro* tais como o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas, teste de contato em papel impregnado e teste de imersão de larvas. Os resultados obtidos demonstraram que os extrativos, quando associados ao fungo tem sua ação potencializada chegando a atingir 100% de mortalidade sobre larvas. Outro fator relevante é que o teste de imersão de larvas permite uma melhor avaliação dos produtos analisados, devido ao tempo que fica em contato com as larvas. Frente às fêmeas ingurgitadas os resultados não foram significativos devido ao tempo que o fungo necessita para agir e com isso não foi possível interromper o ciclo. A utilização de quitinase sobre larvas não apresentou mortalidade superior à utilização de extratos sendo apenas efetiva quando o tratamento consistiu de associação de partição hexânica de *A. satureioides* e enzima. Os resultados obtidos com as espécies vegetais associados ao fungo são considerados promissores e abrem novas perspectivas de estudos.

**Palavras chave:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; *Achyrocline satureioides*; *Schinus lentiscifolius*; *Beauveria bassiana*; quitinase.

## Abstract

Despite the social and commercial importance of cattle farming, ectoparasite infestations, such as the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, present themselves as a major economic obstacle. The control is currently carried out using synthetic acaricides and its indiscriminate use has contributed to the emergence of parasite resistance to most of the available molecules. Thus, potential alternatives that are effective, economically viable and safe should be investigated, such as the use of natural derivatives associated with entomopathogenic fungi. This study evaluated plant extracts of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. and *Schinus lentiscifolius* (March.) D.C. associated and not associated with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, as well as the chitinase enzyme produced by it, over different stages of the life cycle of the cattle tick *R. (B.) microplus*. The acaricide activity of plant extracts, fungus, their associations and chitinase, was analyzed by *in vitro* tests such as the immersion test of engorged females, contact test on impregnated paper and larvae immersion test. The results obtained demonstrated that the extractives, when associated with the fungus, have their potentiated action reaching 100% mortality on larvae. Another relevant factor is that the larvae immersion test allows a better evaluation of the evaluated products, due to the time that is in contact with the larvae. The results were not significant compared to engorged females due to the time that the fungus needs to act and, therefore, it was not possible to interrupt the cycle. The use of chitinase on larvae did not present a higher mortality than the use of extracts, being only effective when the treatment consisted of an association of hexane partition of *A. satureioides* and enzyme. The results obtained with the plant species associated with the fungus are considered promising and allow possibilities for further studies.

**Key words:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; *Achyrocline satureioides*; *Schinus lentiscifolius*; *Beauveria bassiana*; chitinase



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Distribuição geográfica de <i>R. (B.) microplus</i> demarcados pelas áreas em cinza. Fonte: MURREL et al.,(2011); ESTRADA-PEÑA et al., (2006).....	22
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico do carrapato do boi ilustrando a fase de vida livre e parasitária (fonte).....	22
<b>Figura 3.</b> Resistência acumulada para organofosforados (OF), piretróides sintéticos (SP), amidina (AM), lactonas macrocíclicas (LM), fipronil e fluazuron. Foram consideradas como classes também, as associações entre organofosforados e piretróide (OF+SP) e amidina e organofosforados (AM+OF).....	25
<b>Figura 4.</b> Fêmea de <i>R. (B.) microplus</i> infectada pelo fungo <i>B. bassiana</i> (SUN et al.2013).....	30
<b>Figura 5.</b> A) Colonias macroscopicas do fungo <i>B. bassiana</i> ; B) Hifas e conídios de <i>B. bassiana</i> (Fonte: Rafaela Fantatto).....	31
<b>Figura 6.</b> Ação enzimática: Durante uma reação, as enzimas se ligam especificamente ao substrato através de uma região chamada sitio ativo (1) formando o complexo enzima-substrato (2). Devido a tal ligação, a conformação espacial da enzima sofre alterações. A reação procede catalisada pela enzima (3) quando terminada, os produtos formados são liberados (4) e a enzima volta a conformação original (5) Fonte adaptado de Tortora, Funke e Case (2010).....	32
<b>Figura 7.</b> A: Inflorescências de <i>A. satureioides</i> ; B: Professor Ilio Montanari Junior em meio à plantação de <i>A. satureioides</i> (CPQBA-Unicamp).....	37
<b>Figura 8.</b> Partes aéreas de <i>S. lentiscifolius</i> (Fonte: RafaelaFantatto).....	38
<b>Figura 9.</b> Partição líquido-líquido do extrato bruto de <i>S. lentiscifolius</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> Preparo das nanoparticulas pelo método de nanoprecipitação	

(Greatti et al; 2020).....	44
<b>Figura 11.</b> Esquema do texturometro no ensaio de bioadesão (Carvalho et al. 2013 ).....	45
<b>Figura 12.</b> Colonias do fungo <i>B. bassiana</i> em meio batata dextrose agar.....	47
<b>Figura 13.</b> Curva Analítica de <i>p</i> -nitrofenol.....	50
<b>Figura 14.</b> Metodologia esquematizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima.....	52
<b>Figura 15.</b> Teste de imersão de fêmeas A) Fêmeas coletadas diretamente de bovinos infestados, B) Fêmeas distribuídas em grupos de 10 indivíduos, C) Carrapatos imersos em extrativo vegetal, D) Fêmeas após imersão acondicionadas em BOD, E) Fêmeas em oviposição, F) Visualização em lupa para determinar a porcentagem de eclosão (Fonte: Rafaela Fantatto).....	54
<b>Figura 16.</b> Teste de contato em papel impregnado (Fonte: Rafaela Fantatto).....	56
<b>Figura 17.</b> Larvas de <i>R. (B.) microplus</i> imersas em diferentes concentrações do extrato (Fonte: Rafaela Fantatto).....	56
<b>Figura 18.</b> a) Larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em contato com celulose impregnada com extrato b) Contagem das larvas vivas e mortas (Fonte: Rafaela Fantatto).....	57
<b>Figura 19.</b> a) Grupos de <i>Galleria mellonella</i> , b e c aplicação do extrato.....	58
<b>Figura 20.</b> Cromatograma obtido das inflorescências de <i>A. saturoioides</i> (ASb). Condições de análise: Metanol (grau LC-MS) (MeOH): Água MiliQ a 1% de Ácido acético com um gradiente 38:100% durante 45 minutos, 100% MeOH durante 10 minutos e 100:32% durante 7 minutos e um fluxo de 0,5mL/min.....	59
<b>Figura 21.</b> Moléculas de quercetina, 3-O-metilquercetina e campferol	

encontradas no extrato etanólico de <i>A. saturoioides</i> (ChemDraw ultra 12.0).....	60
<b>Figura 22.</b> Cromatograma obtido das inflorescências de <i>S. lentiscifolius</i> (SLb). Condições de análise: Metanol (grau LC-MS) (MeOH): Água MiliQ a 1% de Ácido acético com um gradiente 38:100% durante 45 minutos, 100% MeOH durante 10 minutos e 100:32% durante 7 minutos e um fluxo de 0,5mL/min.....	61
<b>Figura 23.</b> Molécula de ácido morônico encontrada no extrato etanólico de <i>Schinus lentiscifolius</i> .....	62
<b>Figura 24.</b> Produção de enzimas quitinolíticas pela linhagem de <i>B. bassiana</i> 487 em diferentes meios e tempos.....	63
<b>Figura 25.</b> Produção de enzimas quitinolíticas pela linhagem de <i>B. bassiana</i> em diferentes meios e tempos.....	64
<b>Figura 26.</b> Atividade enzimática de quitinase produzida por <i>B. bassiana</i> 487 em meio 2 com indutor.....	64
<b>Figura 27.</b> Atividade Residual de Quitinase em diferentes tempos de incubação frente à extratos de <i>A. saturoioides</i> e <i>S. lentiscifolius</i> . AsB: extrato bruto de <i>A.</i> <i>saturoioides</i> . AsAc: partição Acetato de etila de <i>A. saturoioides</i> . AsH: partição hexano de <i>A. saturoioides</i> . SIB: extrato bruto de <i>S. lentiscifolius</i> . SIAC: partição Acetato de etila de <i>S. lentiscifolius</i> . SIH: partição hexano de <i>S. lentiscifolius</i> .....	65
<b>Figura 28.</b> Atividade Residual de proteases em pH neutro de <i>A. oryzae</i> frente à extratos de plantas. ASB: extrato bruto de <i>A. saturoioides</i> . ASAc: partição Acetato de etila de <i>A. saturoioides</i> . ASH: partição hexano de <i>A. saturoioides</i> . SLB: extrato bruto de <i>S. lentiscifolius</i> . SLAc: partição Acetato de etila de <i>S.</i> <i>lentiscifolius</i> . SLH: partição hexano de <i>S. lentiscifolius</i> .....	67
<b>Figura 29.</b> a) Força da bioadesividade das amostras sobre couro bovino. b) Trabalho da bioadesão das amostras sobre o couro.....	70
<b>Figura 30.</b> Distância percorrida pelas formulações contendo extrato, branco	

(goma xantana e poloxamer) e água em contato com o couro do boi.....	70
<b>Figura 31.</b> Teste de determinação da velocidade de escoamento de formulações em couro bovino.....	71
<b>Figura 32.</b> A: Fêmeas do grupo controle pós-postura; B: Fêmeas do grupo extrato+fungo pós-postura.....	76
<b>Figura 33.</b> Comparação da porcentagem de mortalidade de todos os tratamentos realizados no teste de contato em papel impregnado.....	82
<b>Figura 34.</b> Comparação de mortalidade entre todos os extrativos associados ou não ao fungo <i>B. bassiana</i> no teste de imersão de larvas.....	85
<b>Figura 35</b> Larva acometida pelo fungo <i>B. bassiana</i> corada com azul de metileno e visualizada sob microscópio óptico.....	86
<b>Figura 36.</b> Comparação entre as taxas de mortalidade entre o Teste de contato em papel impregnado (TCPI), Teste de imersão de larvas (TIL) e Teste de contato em celulose impregnada (TCI).....	88

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Principais classes acaricidas utilizadas e seus mecanismos de ação.....	24
<b>Tabela 2.</b> Composição dos meios de cultura para produção de quitinases.....	47
<b>Tabela 3.</b> Composição das soluções de mix de sais e elementos traços.....	48
<b>Tabela 4.</b> Rendimento obtido a partir de partição líquido-líquido do extrato bruto de <i>A. saturoioides</i> e <i>S. lentiscifolius</i> .....	58
<b>Tabela 5.</b> Tempo de retenção e massa/carga obtidos por análise HPLC-MS de compostos pertencentes ao extrato etanólico bruto de <i>A. saturoioides</i> .....	59
<b>Tabela 6.</b> Tempo de retenção e massa/carga obtidos por análise HPLC-MS de compostos pertencentes ao extrato etanólico bruto de <i>S. lentiscifolius</i> (SLb).....	61
<b>Tabela 7.</b> Determinação das melhores condições de produção de enzima quitinase em linhagens de <i>B. bassiana</i> na ausência e presença de Indutor (Indut.) em atividade enzimática.....	63
<b>Tabela 8.</b> Análise por equipamento de DLS.....	69
<b>Tabela 9.</b> Determinação do potencial zeta das nanoparticulas.....	69
<b>Tabela 10.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de <i>A. saturoioides</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> na concentração de $10^6$ células/mL.....	72
<b>Tabela 11.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição acetato de <i>A. saturoioides</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> na concentração de $10^6$ células/mL.....	72
<b>Tabela 12.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição hexânica de <i>A. saturoioides</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> .....	73
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição aquosa de <i>A. saturoioides</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> na concentração de $10^6$ células/mL.....	73

<b>Tabela 14.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de <i>S. lentiscifolius</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> na concentração de 10 <sup>6</sup> células/mL.....	74
<b>Tabela 15.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição acetato de <i>S. lentiscifolius</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> na concentração de 10 <sup>6</sup> células/mL.....	74
<b>Tabela 16.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição hexânica de <i>S. lentiscifolius</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> na concentração de 10 <sup>6</sup> células/mL.....	75
<b>Tabela 17.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição aquosa de <i>S. lentiscifolius</i> associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> na concentração de 10 <sup>6</sup> células/mL.....	75
<b>Tabela 18.</b> Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes controles na concentração de 10 <sup>6</sup> células/mL..	76
<b>Tabela 19.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em contato com papéis impregnados com extrativos de <i>Achyrocline satureioides</i> de diferentes polaridades associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> .....	77
<b>Tabela 20.</b> Concentração letal (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) dos extrativos de <i>A. satureioides</i> associados ao fungo.....	78
<b>Tabela 21.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em contato com papéis impregnados com extrativos de <i>Schinus lentiscifolius</i> de diferentes polaridades associados e não associados ao fungo <i>B. bassiana</i> .....	78
<b>Tabela 22.</b> Concentração letal (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) dos extrativos de <i>S. lentiscifolius</i> associados ao fungo.....	79
<b>Tabela 23.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em contato com papéis impregnados com quercetina em diferentes concentrações....	79
<b>Tabela 24.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas em contato com papel impregnado por meio fermentado contendo quitinase associada e não associada a extrativos de <i>Achyrocline satureioides</i> .....	80
<b>Tabela 25.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas em contato com papel impregnado por meio fermentado contendo quitinase associada e não associada	

a extrativos de <i>Schinus lentiscifolius</i> .....	80
<b>Tabela 26.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em contato com papéis impregnados com nanoparticulas de extrato etanólico de <i>A. satureioides</i> .....	81
<b>Tabela 27.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em contato com papéis impregnados com formulação de extrato etanólico de <i>A. satureioides</i> .....	81
<b>Tabela 28.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas imersas em extrativos de <i>Achyrocline satureioides</i> de diferentes polaridades associados ou não ao fungo <i>B. bassiana</i> .....	83
<b>Tabela 29.</b> Concentração letal (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) dos extrativos de <i>A. satureioides</i> associados ao fungo.....	83
<b>Tabela 30.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas imersas em extrativos de <i>Schinus lentiscifolius</i> de diferentes polaridades associados ou não ao fungo <i>B. bassiana</i> .....	84
<b>Tabela 31.</b> Concentração letal (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) dos extrativos de <i>S. lentiscifolius</i> associados ao fungo.....	84
<b>Tabela 32.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> em teste de imersão de larvas com quercetina em diferentes concentrações.....	85
<b>Tabela 33.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas colocadas em contato com celulose impregnada em extrativos de <i>Achyrocline satureioides</i> de diferentes polaridades.....	87
<b>Tabela 34.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas colocadas em contato com celulose impregnada em extrativos de <i>Schinus lentiscifolius</i> de diferentes polaridades.....	87
<b>Tabela 35.</b> Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>G. mellonella</i> frente à extratos e partições hexano de <i>A. satureoides</i> e <i>S. lentiscifolius</i> no período de 7 dias.....	89

## Lista de abreviaturas

%E	Porcentagem de eficácia
%eclo	Porcentagem de eclosão
%O	Porcentagem de oviposição
µL	Microlitro
SLac	Partição acetato <i>Schinus lentiscifolius</i>
ASac	Partição acetato <i>Achyrocline satureioides</i>
SLágua	Partição aquosa <i>Schinus lentiscifolius</i>
ASágua	Partição aquosa <i>Achyrocline satureioides</i>
BDA	Batata dextrose ágar
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
Embrapa	Empresa Brasileira de Agropecuária
FCFAR	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
SLh	Partição hexânica <i>Schinus lentiscifolius</i>
ASh	Partição hexânica <i>Achyrocline satureioides</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
m/z	Massa carga
meOH	Metanol
pH	Potencial hidrogenionico
RE	Eficiência reprodutiva
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
ASb	Extrato bruto <i>Achyrocline satureioides</i>
SLb	Extrato bruto <i>Schinus lentiscifolius</i>



## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>18</b>
<b>2. Referencial teórico</b> .....	<b>21</b>
2.1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	21
2.2. Controle químico do carrapato <i>R. (B.) microplus</i> .....	23
2.3. Controle alternativo do carrapato.....	26
<b>2.4. Uso de nanotecnologia e formulações no controle do carrapato .</b> .....	<b>27</b>
2.5. Controle biológico do carrapato <i>R. (B.) microplus</i> por fungos entomopatogênicos .....	29
2.6. <i>Beauveria bassiana</i> .....	30
2.7. Enzimas .....	32
2.7.1. Quitinase.....	34
2.7.2. Proteases.....	35
2.8. <i>Achyrocline satureioides</i> .....	36
2.9. <i>Schinus lentiscifolius</i> .....	38
2.10. <i>Galleria mellonella</i> como modelo alternativo para testes.....	39
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>41</b>
3.1. Objetivos específicos .....	41
<b>4. Material e métodos</b> .....	<b>41</b>
4.1. Material vegetal.....	41
4.2. Produção e fracionamento dos extrativos vegetais.....	42
4.3. Análise por HPLC-MS dos extratos vegetais .....	42
4.4. Nanopartículas com extrato etanólico de <i>A. satureioides</i> e <i>S.</i> <i>lentiscifolius</i> .....	43
4.4.1. Produção de Nanopartículas de Policaprolactona (PCL) .....	43
4.4.2. Análise de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanopartículas .....	44
4.4.3. Determinação do potencial zeta.....	44
4.5. Formulação a base de extrato etanólico de <i>A. satureioides</i> .....	45

4.5.1. Produção de Formulação de Goma Xantana.....	45
4.5.2. Determinação da bioadesividade da formulação .....	45
4.5.3. Determinação da velocidade de escoamento das formulações .....	46
4.6. <i>Condições de cultivo do fungo</i> .....	46
4.7. <i>Condições de produção de quitinase</i> .....	47
4.7.1. Meios de Fermentação .....	47
4.7.2. Preparo do indutor .....	49
4.8. <i>Determinação da atividade enzimática</i> .....	49
4.8.1. Atividade Quitinolítica .....	49
4.8.2. Curva Analítica de <i>p</i> -nitrofenol.....	49
4.9. <i>Determinação da influência dos extratos sobre a atividade enzimática</i> .....	50
4.9.1. Avaliação de Atividade Residual de Quitinase.....	50
4.9.2. Avaliação da Atividade Residual de Proteases.....	51
4.10. <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e</i> <i>Concentração Fungicida Mínima (CFM)</i> .....	51
4.11. <i>Aplicação dos extratos vegetais frente a R. (B) microplus</i> .....	53
4.11.1. Preparo da suspensão fúngica para ensaios.....	53
4.11.2. Teste de imersão de fêmeas de <i>R. (B) microplus</i> .....	53
4.11.3. Sensibilidade de larvas em teste de contato em papel impregnado . .....	55
4.11.4. Teste de imersão de larvas .....	56
4.11.5. Teste de contato em celulose impregnada .....	56
4.12. <i>Avaliação da toxicidade frente ao modelo alternativo de Galleria</i> <i>mellonella</i> .....	57
4.13. <i>Análises estatísticas</i> .....	58
<b>5. Resultados</b> .....	<b>58</b>
5.1. <i>Obtenção e rendimento dos extratos etanólicos brutos</i> .....	58
5.2. <i>Rendimento da partição líquido-líquido</i> .....	58
5.3. <i>Análise por HPLC-MS dos extratos vegetais</i> .....	59
5.4. <i>Determinação da Concentração Fungicida Mínima</i> .....	62

5.5.	<i>Determinação do melhor meio para a produção da enzima quitinase .</i>	62
5.6.	<i>Determinação da influência dos extratos sobre a atividade enzimática</i>	65
5.6.1.	Avaliação de Atividade Residual de Quitinase.....	65
5.6.2.	Avaliação da Atividade Residual de Proteases de <i>A. oryzae</i> .....	67
5.7.	<i>Produção de nanopartícula com extrato etanólico de A. saturoioides e S. lentiscifolius</i> .....	68
5.7.1.	Análise de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanopartículas	68
5.7.2.	Determinação do potencial zeta.....	69
5.8.	<i>Produção de formulação a base de extrato etanólico de A. saturoioides</i> .....	70
5.8.1.	Determinação da bioadesividade da formulação .....	70
5.8.2.	Determinação da velocidade de escoamento das formulações .....	70
5.9.	<i>Aplicação dos extratos vegetais frente a R. (B) microplus</i> .....	71
5.9.1.	Teste de imersão de fêmeas de <i>R. (B) microplus</i> .....	71
5.9.2.	Teste de contato em papel impregnado.....	76
5.9.3.	Teste de imersão de larvas.....	83
5.9.4.	Teste de contato em celulose impregnada .....	86
5.10.	<i>Avaliação da toxicidade frente ao modelo alternativo de Galleria mellonella</i> .....	88
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>97</b>

## 1. Introdução

O Brasil é detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo. Estima-se que em 2017 o país possuía um rebanho de 226 milhões de cabeças, representando 22,64% do total mundial (IBGE, 2018). Esse grande rebanho oferece grandes benefícios econômicos e contribuem significativamente para o PIB do país devido à comercialização de derivados internamente e externamente, como carne, leite e couro (ABIEC, 2018).

Apesar da grande receita gerada por essa atividade, alguns empecilhos acarretam prejuízos consideráveis, sendo um dos principais a infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Pertencente à família Ixodidae, a espécie *R. (B.) microplus* possui alta taxa reprodutiva, sendo capaz de em uma única oviposição depositar no ambiente cerca de 3.000 ovos (GONZALES, 2003). De hábito hematófago causa intensa espoliação sanguínea, particularmente nas raças mais susceptíveis, sugando em média de 2 a 3 mL de sangue do seu hospedeiro (SUTHERST et al., 1983), diminuindo a qualidade do couro e a eficiência reprodutiva dos animais parasitados. Esse carrapato também está envolvido na transmissão de hemoparasitos (complexo carrapato/tristeza parasitária bovina), que se não tratados levam o animal a óbito. Estima-se que os prejuízos causados por este carrapato em rebanhos bovinos no Brasil atingem a cifra de 3,24 bilhões de dólares/ano (GRISI et al., 2014).

O controle desses ectoparasitas tem sido feito basicamente por meio de carrapaticidas químicos, contudo, a aplicação destes produtos tem apresentado baixa eficácia na redução da infestação devido à seleção de carrapatos resistentes a diversos produtos (GOMES et al., 2011; RAYNAL et al., 2013; MINHO et al., 2019). Além disto, existe risco de contaminação do ambiente, do leite e da carne com resíduos da droga. O desenvolvimento de novos carrapaticidas é um processo longo e de alto custo, o que reforça a necessidade de alternativas para o controle da infestação do carrapato (GRAF et al., 2004). Estudos de produtos naturais tem gerado grande interesse das comunidades comercial, médica e científica de diversos países, pois a fitoterapia e outras alternativas sustentáveis como controle biológico tem potencial para reduzir o uso de quimioterápicos atualmente usados para controlar infecções por ectoparasitas (ATANOSOV et al. 2015).

A utilização de extratos vegetais no controle do carrapato tem sido foco de pesquisas em vários países (VATSYA et al., 2006). Diversas espécies da família das Asteraceas já foram avaliadas e apresentaram eficácia frente a esse ectoparasita. A espécie *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. é uma espécie dessa família, comum no Brasil, ocorrendo principalmente de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, crescendo espontaneamente nas pastagens e podendo até ser considerada uma “erva daninha” (DE SOUZA et al., 2002) Essa espécie já apresentou atividade frente a várias espécies de insetos como simulídeos (borrachudo) relatada por Dal Magro (1998), *Triatoma infestans* (barbeiro) (ROJAS DE ARIAS et al., 1995) e *Myzus persicae* (pulgão verde) (SAUPE, 2003).

Além disso, Fantatto et al. (2015) demonstraram que o extrato etanólico bruto obtido a partir das inflorescências dessa espécie vegetal apresentou 100% de inibição na postura dos ovos do carrapato *R. (B.) microplus* na concentração de 100 mg/mL e 92,3% na concentração de 50 mg/mL. Sobre as larvas dessa mesma espécie, o extrato apresentou 67,34% de mortalidade na concentração de 100 mg/mL (FANTATTO et al., 2016).

Uma família pouco estudada e muito promissora é a Anacardiaceae, espécies dessa família são amplamente conhecidas por suas atividades inseticidas, como a *Schinus terebinthifolius* que apresentou potencial frente à *Hypothenemus hampei* (broca do café) (SANTOS et al. 2013), *Anopheles gambiae* e *Culex quinquefasciatus* (PERICH et al. 1995) e a espécie *Schinus molle* que já apresentou ação inseticida frente ao carrapato *R. (B.) microplus* (TORRES, 2010) despertando assim o interesse pelo potencial de uma espécie dessa família ainda pouco estudada, a *Schinus lentiscifolius* (March.) D. C., conhecida popularmente como Aroeira cinzenta. A aroeira cinzenta é uma espécie nativa de alguns países da América do Sul como Uruguai, Paraguai, Argentina, Peru e Brasil, sendo muito comum e utilizada na medicina popular no Rio Grande do Sul (GEHRKE et al., 2012). A atividade antimicrobiana e antioxidante de *S. lentiscifolius* já foi anteriormente demonstrada por Gehrke em 2013 e a exemplo de outras espécies do gênero que possuem atividade inseticida, supõe-se que esta espécie contenha vários compostos químicos de importância biológica.

*S. lentiscifolius* apresentou atividade carrapaticida detectada em screening *in vitro* realizado por Minho et al. 2019. Dentre 35 extratos vegetais avaliados no Bioma Pampa, o extrato hexânico apresentou eficácia sobre larvas e adultos de *R. (B.) microplus* na concentração de 50 mg/mL e efeito repelente (MINHO et al. 2019).

Uma alternativa com grande potencial e ainda em desenvolvimento é o controle biológico. Vários predadores, entre fungos, bactérias, animais vertebrados e invertebrados, se apresentam como alternativas para o controle biológico do carrapato *R. (B.) microplus*. Os fungos entomopatogênicos são conhecidos pela sua alta capacidade de controlar pragas na agricultura causando menor impacto ambiental sendo eficientes e seguros (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Apesar da maioria das espécies serem desconhecidas, algumas espécies têm sido mais estudadas, especialmente as dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Paecilomyces* (FARIA; WRAIGHT, 2007). Diversos estudos demonstraram a ação de fungos entomopatogênicos sobre o carrapato *R. (B.) microplus in vitro* podendo-se destacar duas espécies com alto potencial: *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

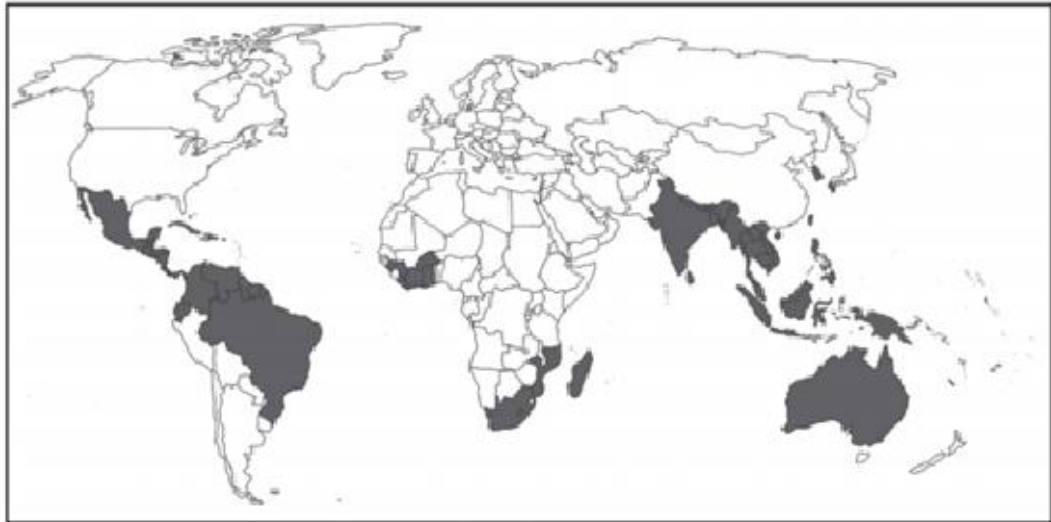
Cepas de *B. bassiana* demonstraram potencial sobre diferentes ectoparasitas de importância veterinária, como o carrapato *Amblyomma cajennense* (REIS, et al. 2014), *Rhipicephalus sanguineus* (PRETTE et al. 2005) e *R. (B.) microplus* (SUN et al. 2013). O mecanismo de atuação básico dos fungos sobre os insetos é pela adesão de conídios à cutícula dos hospedeiros terrestres (carrapatos, baratas, triatomíneos) e a formação de hifas que penetram o tegumento com o auxílio de enzimas secretadas como proteases, quitinases e lipases (MORAES et al., 2003). Há muito tempo, as enzimas são aplicadas na indústria farmacêutica em finalidades diversas que vão desde a produção de medicamentos, desenvolvimento de novos produtos e diagnósticos clínicos até sua utilização em terapia (SAID; PIETRO, 2014). As quitinases têm recebido crescente atenção por causa de sua ampla aplicação nas áreas da medicina, agricultura, biotecnologia e gestão de resíduos industriais (PATEL et al., 2010). São comumente encontradas em paredes de células fungicas, exoesqueleto de insetos e conchas de crustáceos (KUMAR, 2000). Em insetos e crustáceos estão associados com a necessidade da degradação parcial da cutícula velha e em plantas estão relacionados com a

resistência contra fitopatógenos devido a sua atividade antifúngica (DAHIYA et al., 2006). Essa enzima também é amplamente utilizada para o isolamento de protoplastos a partir de fungos e leveduras, controle de fungos patogênicos, tratamento de resíduos quitinosos, e controle da transmissão de doenças por insetos devido a sua capacidade de degradar quitina (DAHIYA et al., 2006). O carrapato possui em sua morfologia, uma carapaça resistente composta principalmente por quitina. Desta maneira, quando o fungo secreta a enzima quitinase sobre o mesmo, ele torna-se vulnerável permitindo uma maior penetração das hifas. Sendo assim, o presente estudo avaliou o potencial de extratos e partições de *A. saturoioides* e *S. lentiscifolius* associadas ou não ao fungo *B. bassiana* e à enzima quitinase frente ao carrapato *R. (B.) microplus* que constitui um grande problema da pecuária mundial.

## **2. Referencial teórico**

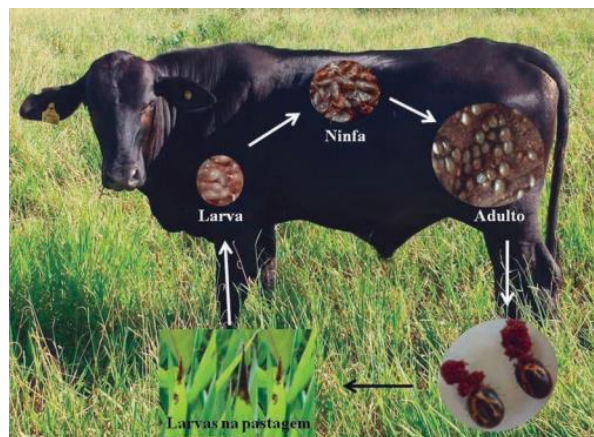
### **2.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Pertencente ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Ixodida, subordem Metastigmata e a família Ixodidae (ANGELO; BITTENCOURT, 2013), o carrapato *R. (B.) microplus* foi descrito pela primeira vez por Canestrini em 1888. Após estudos filogenéticos, em 2003 o gênero *Boophilus* (CURTICE, 1891) foi reclassificado como um subgênero do gênero *Rhipicephalus* (KOCH, 1844) e a espécie conhecida por *Boophilus microplus* passou a ser denominada *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL; BARKER, 2003). Essa espécie de artrópode possui ampla distribuição mundial e tem destacada importância nos países da América Latina e África (Figura 1) (FURLONG, 2005).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de *R. (B.) microplus* demarcados pelas áreas em cinza. Fonte: MURREL et al.,(2011); ESTRADA-PEÑA et al., (2006).

Esse parasito é monoxeno, ou seja, necessita apenas de um hospedeiro durante sua fase parasitaria e esse hospedeiro é preferencialmente bovinos. Seu ciclo de vida compreende duas fases: parasitária e não parasitária (Figura 2) (NICARETTA, 2018) e os prejuízos estão relacionados aos efeitos diretos e indiretos provenientes do parasitismo.



**Figura 2** Ciclo biológico do carrapato do boi ilustrando a fase de vida livre e parasitária (GARCIA et al. 2018).

Os danos decorrentes da ação direta caracterizam-se pela espoliação sanguínea e suas consequências, tais como anemia, supressão do apetite e diminuição da resposta imune, que resultam em redução da produção de leite e carne. Além de danos ao couro, que geram desvalorização desse produto e podem propiciar a fácil deposição de larvas causadoras de miíases



(FURLONG, 2005; SANTOS, 2013; RECK et al., 2014) e a transmissão de hemoparasitas que causam babesiose bovina e anaplasmose, doenças que causam alta mortalidade (GUERRERO et al., 2014).

A principal maneira de controlar este carrapato é pela aplicação de acaricidas sintéticos (KUNZ; KEMP, 1994), porém o uso incorreto e indiscriminado leva à seleção de resistência entre carrapatos aos efeitos destas drogas, através de diferentes mecanismos (BARON et al., 2015). Devido à dificuldade atual no controle químico dos carrapatos em função do desenvolvimento de resistência aos antiparasitários (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2007), há necessidade de se investigarem alternativas para o controle desse parasita.

## **2.2. Controle químico do carrapato *R. (B.) microplus***

O mercado de substâncias acaricidas no Brasil é responsável por grandes movimentações financeiras. Estudo realizado pelo SINDAN demonstrou que a movimentação anual desse segmento em 2018 foi de cerca de R\$ 5,3 bilhões de reais, sendo responsável por 27,2% do mercado de produtos veterinários.

O controle acaricida por compostos químicos é utilizado há muito tempo. Segundo relatos, iniciou-se com a utilização de uma formulação arsenical no ano de 1895, em uma fazenda localizada em Queensland - Austrália, aplicado sob a forma de banho de imersão (ANGUS, 1996) e tomou maiores proporções no século XX, tendo o seu primeiro relato de resistência em *R. (B.) microplus* desde na década de 30. Os organoclorados e organofosforados começaram a ser usados no início da década de 50, substituindo os arsenicais, porém os organoclorados deixaram de ser utilizados devido a resíduos na carne e no meio ambiente (KUNZ; KEMP, 1994). Somente vinte anos depois iniciou o uso das formamidinas seguida então pelos Piretróides sintéticos e Lactonas macrocíclicas (PEREIRA, 1982; GEORGE et al., 2008).

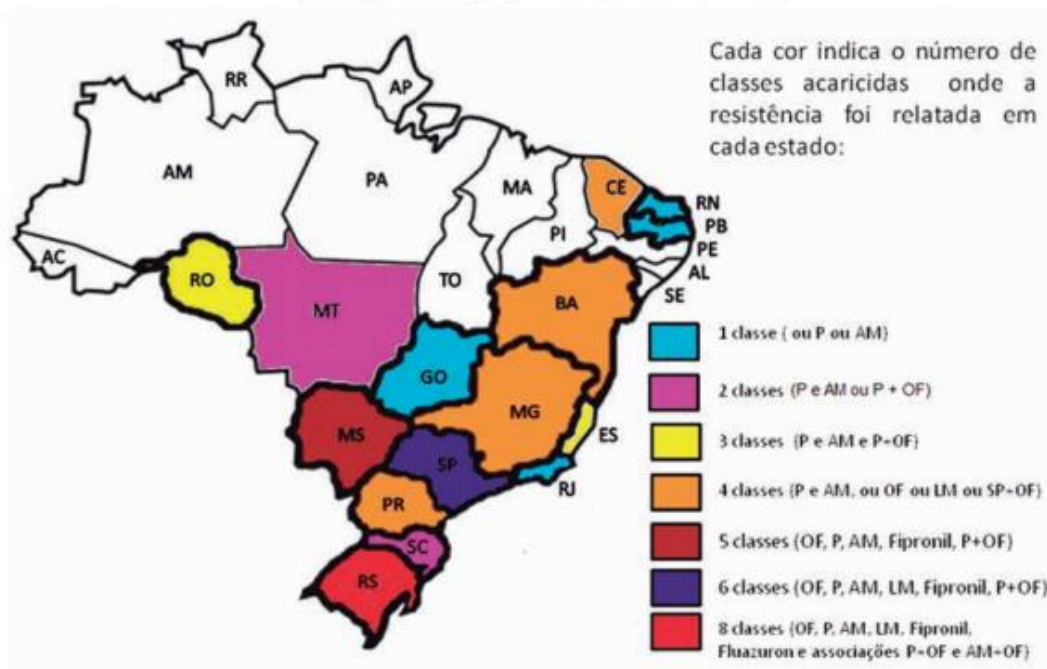
Atualmente, as famílias acaricidas utilizadas são Organofosforados, Piretróides, Amidínicos, Lactonas Macrocíclicas, Fenilpirazóis e o Difluorobenzoilureia, com diferentes formas de aplicação (pulverização, pour-on e injetáveis) e mecanismo de ação como demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais classes acaricidas utilizadas e seus mecanismos de ação.

<b>Classe acaricida</b>	<b>Modo de ação</b>	<b>Referência</b>
Organofosforado	Inibidor de acetilcolinesterase	Fakuto,1990
Piretroide	Modulador de canais de sódio	Hayes, 1982
Formamidinas	Agonista da octopamina	Jonsson et al., 2018
Lactona macrocíclica	Ativador de canal de cloro (via GABA e/ou glutamato)	Wolstenholme, 2012
Fenilpirazole	Bloqueador do canal de cloro (antagonista do GABA; glutamato)	Cole et al., 1993
Benzoilfeniluréia	Inibe a síntese de quitina	Graf, 1993

Como podemos observar na Tabela 1, a maioria dos acaricidas apresentam ação neurotóxica e os mecanismos de resistência podem ser divididos em três principais: detoxificação celular/resistência metabólica, insensibilidade no sítio de ação e diminuição da penetração cuticular da droga (HEMINGWAY et al., 1998; OAKESHOTT et al., 2003; FFRENCH-CONSTANT et al., 2004). No Brasil, o uso dos acaricidas constitui o principal instrumento de controle do carrapato do boi *R. (B.) microplus* (VARGAS et al 2003). Apesar de ser usado amplamente e há muito tempo, o seu emprego é, sistematicamente, feito de maneira incorreta, sem considerar os conhecimentos básicos do ciclo do parasito e a casos de resistência encontram-se amplamente difundidos, como podemos observar na Figura 3 a seguir.

Distribuição da resistência aos acaricidas em  
*Rhipicephalus (B.) microplus* no Brasil



**Figura 3.** Resistência acumulada para organofosforados (OF), piretróides sintéticos (SP), amidina (AM), lactonas macrocíclicas (LM), fipronil e fluazuron. Foram consideradas como classes também, as associações entre organofosforados e piretróides (OF+SP) e amidina e organofosforados (AM+OF). (HIGA et al., 2015).

Em uma revisão de literatura feita por Higa et al. (2015), diversos artigos científicos disponíveis na literatura foram analisados e estratificados por estados quanto à presença de resistência no Brasil. Segundo os autores, a presença de resistência já foi relatada em 15 estados brasileiros a pelo menos uma das bases químicas revisadas (organofosforado, piretroide, amidinas, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron). Existe também uma maior concentração dos relatos na região centro-sul do país, com atenção especial para o estado do Rio Grande do Sul, o qual apresentou relatos de resistência a todas as classes químicas, inclusive entre associações.

Porém, com os problemas, relacionados a essa prática, já citados anteriormente, como linhagens resistentes, resíduos químicos em produtos de origem animal e poluição ambiental, outros métodos de controle alternativo do carrapato vêm sendo estimulados apesar de resposta ainda pouco expressiva.

Dentre eles destacam-se o uso de patógenos como fungos e fitoterápicos (CHAGAS et al., 2012).

### **2.3. Controle alternativo do carrapato**

Com os diversos relatos de resistência às moléculas químicas disponíveis no mercado e em virtude de novos cenários comerciais e tendências de mercado que visam uma relação menos deletéria com o ambiente e meios orgânicos de produção, o controle alternativo de *R. (B.) microplus* vem crescendo significativamente. Dentre os métodos de controle alternativo, destacam-se a fitoterapia, homeopatia, predadores naturais, controle biológico e controle integrado.

Das 250 mil espécies catalogadas pela United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (UNESCO), o Brasil é detentor de cerca de 12% da biodiversidade (SiBBr, 2019; ROMÃO et al., 2015) e ainda possui cerca de 44.000 a 50.000 espécies de plantas vasculares, o que representa aproximadamente 18% da diversidade global de plantas (EMBRAPA, 2009). Sendo assim, o interesse de pesquisadores da área de produtos naturais como acaricidas vem crescendo exponencialmente no país (BORGES et al., 2011). Entre as vantagens da utilização de extratos vegetais estão os possíveis efeitos sinérgicos de compostos, isto é, associação de mecanismos de ação por meio de substâncias agindo simultaneamente em diferentes alvos moleculares, além do menor risco de efeitos colaterais, baixa contaminação ambiental e custos relativamente baixos para sua obtenção (POLITI et al., 2019; CHAGAS et al., 2002; OLIVO et al., 2009).

A fitoterapia, área que concebe o estudo de plantas frente a diversos patógenos e doenças apresenta-se como uma promissora alternativa no controle das infestações pelo carrapato, atuando na melhoria da saúde animal e na redução do uso de drogas veterinárias devido a sua riqueza de constituintes, que por apresentarem diferentes modos de ação retardam ou não ocasionam o desenvolvimento de resistência embasando a elaboração de formulações antiparasitárias (CHAGAS, 2015). Levantamento realizado por Borges et al. (2011) demonstrou que aproximadamente 55 espécies de plantas pertencentes a 26 famílias já foram avaliadas sobre o carrapato bovino. Apesar de muitos estudos e diversas moléculas potenciais encontradas, a grande

dificuldade está nos testes a campo, já que resultados de boa atividade carrapaticida *in vitro* muitas vezes não se repetem nos ensaios *in vivo* (HABEEB, 2010; CHAGAS, 2015; CHAGAS et al., 2016). Outra alternativa, essa com menos utilização e poucos relatos científicos é o uso da homeopatia, a homeopatia é um método terapêutico considerado seguro em razão de suas formulações serem baseadas em plantas, animais ou minerais (BRAGHIERI et al., 2007). Ela constitui uma perspectiva para os produtores na redução do uso indiscriminado de medicamentos e, conseqüentemente, diminuindo a pressão de seleção de cepas de carrapatos resistentes, já que suas possibilidades de aplicação na medicina veterinária são grandes (VERÍSSIMO et al., 2016).

Os métodos de controle biológico, seja por macro ou microrganismos, possuem diferenças significativas quanto à porcentagem de controle quando comparado com os métodos convencionais com produtos químicos, porém deve-se salientar que essa diferença é compensada, pois o controle biológico além de ter como objetivo manter os parasitas em níveis aceitáveis, ainda preserva o meio ambiente e não atinge os inimigos naturais (BAHIENSE et al., 2007). Os fungos entomopatogênicos destacam-se entre as alternativas de controle biológico por possuírem alta taxa de crescimento, produção elevada de unidades infectantes, capacidade de sobrevivência no ambiente do seu hospedeiro e resistência a adversidades ambientais (FUXA; TANNADA, 1987). As espécies de fungos mais utilizadas e conhecidas para controle de carrapatos são *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* com excelentes resultados (KAAYA; GODWIN 2000).

Alguns animais também auxiliam no controle e destacam-se alguns predadores vertebrados (aves, ratos, camundongos e sapos) e invertebrados (formigas, aranhas, "tesourinhas") que predam fêmeas ingurgitadas e ovos de *R. (B.) microplus*. Porém não existem estudos comprobatórios para aferir a eficiência desse método de controle (VERÍSSIMO, 2002; CHAGAS et al., 2002).

#### **2.4. Uso de nanotecnologia e formulações no controle do carrapato**

Na indústria farmacêutica, tão importante quanto o princípio ativo estão as formas de apresentação do fármaco/bioativo, dessa área encarrega-se a farmacotécnica. Atualmente o desenvolvimento de formulações e

nanoemulsões com o propósito de aumentar a eficácia de uma substância e também permitir a redução de doses tem sido amplamente investigada (URBAN, 2004). Esses sistemas possuem como vantagens a capacidade de melhorarem a solubilidade e estabilidade dos compostos, além de proporcionarem ação prolongada, vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo e poderem veicular substâncias ativas com diferentes graus de hidrofília/lipofília na mesma formulação (SINTOV; SHAPIRO, 2004).

Mesmo com muitos estudos sobre extrativos vegetais frente ao carrapato *R.(B.) microplus* um grande entrave é a falta de aderência e outras formas de manter o extrato em contato com o parasita por mais tempo para potencializar sua ação. Sendo assim, o desenvolvimento de formulações e o uso da nanotecnologia associada à molécula com ação acaricida promove atraente linha de pesquisa para controle do ácaro no rebanho brasileiro (CARAMORI et al., 2004).

Alguns destes produtos são apresentados na forma de emulsões, em que o ativo no interior da fase dispersa da emulsão é mais protegido, possibilitando a formulação de emulsões concentradas ou mesmo diluídas para uso conforme atividade específica (FURLONG et. al, 2004).

Estas emulsões podem ser classificadas de acordo com a sua hidrofília ou lipofília da fase dispersante, sendo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). No geral são formadas por uma fase aquosa e uma fase oleosa (MORAIS, 2008; PIANOVSKI et al 2008). De acordo com as propriedades físico-químicas encontradas nessas fases, ocorrerá o processo de formação da emulsão, influenciando no tipo e na estabilidade do sistema (BOUCHAMA et al., 2003).

A nanotecnologia, área de destaque nas últimas décadas, possui cunho extremamente multidisciplinar, que vai desde as áreas mais básicas como física, química e biologia, como das mais tecnológicas e aplicadas como engenharias, médicas e farmacêuticas (PETROS et al., 2010; HUYNHH et al., 2012). Esses sistemas possuem as vantagens de aumentar a solubilidade do ativo, proteger os ativos contra hidrólises, diminuir a toxicidade dos ativos, aumentar a permeação e o tempo de disponibilidade (SCHAFFAZICK et al., 2003; RANGASAMY et al., 2011).

## 2.5. Controle biológico do carrapato *R. (B.) microplus* por fungos entomopatogênicos

Durante seu ciclo de vida, tanto livre quanto parasitária vários inimigos naturais colaboram para o controle desse parasita. Devido à resistência parasitária e a dificuldade por novos compostos para o controle químico vários predadores entre fungos, bactérias, animais, vertebrados e invertebrados já foram identificados como perspectivas para controle biológico (CHAGAS et al., 2002; FURLONG; MARTINS; PRATA, 2007). Porém os que mais se destacam atualmente devido a sua maior facilidade de manipulação e controle são os fungos entomopatogênicos. Os fungos não necessitam serem ingeridos, pois apresentam capacidade de penetrar a cutícula. Em geral são capazes de matá-los em seus diferentes estágios e podem apresentar algum tipo de especificidade por um grupo de pragas (SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004). Adicionalmente, os fungos entomopatogênicos são produzidos em massa por técnicas simples e apresentam menor propensão de ocorrência de resistência por parte dos invertebrados (POLAR et al., 2005b).

Diferentes espécies já possuem ações sobre artrópodes relatadas como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, *Lecanicillium* sp., *Simplicillium lamellicola*, *Verticillium* sp., *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*. Para o controle de carrapatos e, em especial de *R. (B.) microplus*, destacam-se *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (LONC et al., 2014).

O mecanismo de ação desses fungos em condições naturais se dá da seguinte forma: os esporos entram em contato com a cutícula do carrapato, germinam e inserem suas estruturas invasivas no corpo do hospedeiro. A ponta do tubo germinativo quando se dilata forma o chamado “apressorio” que facilita a invasão do fungo ao hospedeiro. Um fator que potencializa o uso de fungos é que os mesmos excretam grande número de enzimas como proteases, quitinases, chitobiases, lipases, lipoxigenases e outras enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da cutícula e fornecendo nutrientes do fungo (BARRANCO-FLORIDO et al., 2002). Após penetrar no inseto, o fungo produz hifas que proliferam atingindo a procutícula constituída principalmente por fibras de quitina lamelares incorporadas em uma matriz de proteína que atua

como cobertura protetora para secreções extracelulares de patógenos (PUCHETA et al., 2006). Nas próximas etapas, os corpos de hifas invadem a epiderme e a membrana basal. Se distribuem então pela hemocele onde estruturas como tecido muscular, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, mitocôndrias, hemócitos, retículo endoplasmático e membrana nuclear são invadidas por crescimento vegetativo extenso e ocorrendo a produção de toxinas. O período de incubação depende do hospedeiro, do estágio do hospedeiro, da temperatura e da virulência da cepa do fungo. Durante este período o fungo pode alterar mudanças comportamentais e alimentares no hospedeiro, como a redução de peso corporal, fecundidade ou provocar malformações. Após a morte do hospedeiro e em condições favoráveis de umidade, o fungo inicia sua fase reprodutiva e sai do corpo do hospedeiro iniciando a produção de conídios na superfície externa do cadáver, como podemos observar na Figura 4.



**Figura 4** Fêmea de *R. (B.) microplus* infectada pelo fungo *B. bassiana* (SUN et al. 2013).

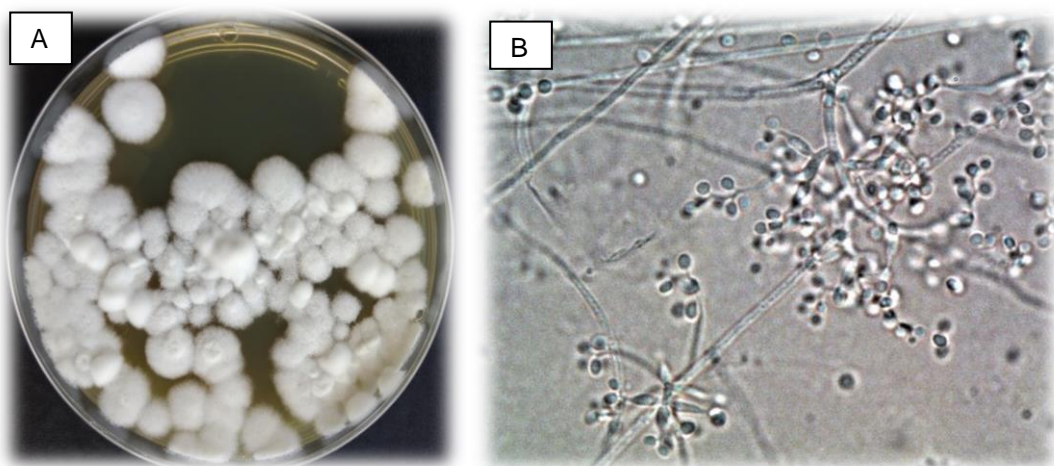
Porém apresentar corpo esbranquiçado não é um fator determinante que comprova que o fungo afetou ou não o inseto, muitas vezes mesmo não apresentando essa característica o fungo pode sim ter infectado o hospedeiro, porém em condições ambientais secas o fungo pode permanecer no estágio de hifas no interior do cadáver (KHACHATOURIANS, 1996; OUEDRAOGO et al., 2003).

## **2.6. *Beauveria bassiana***

O primeiro relato do fungo *B. bassiana* foi feito em 1835 por Agostino Bassi, causando doença em insetos, enunciando assim a teoria do “germe da doença” (ZIMMERMANN, 2007a). Essa espécie fúngica foi observada



inicialmente em *Bombyx mori* (Lepdoptera: Bombycidae) causando grandes prejuízos aos produtores de seda; Agostino Bassi então a denominou de “muscardina branca” devido ao aspecto de mofo branco dado pela presença do micélio formado sobre os cadáveres dos hospedeiros (REHNER; BUCKLEY, 2005). Pertencente à classe Ascomycota, a *B. bassiana* caracteriza-se normalmente por apresentar colônias brancas, amareladas (Figura 5a) e em poucos casos pode apresentar-se avermelhada. Microscopicamente, observam-se suas células conidiogênicas com parte basal globosa em forma de “garrafa” e uma raque de até 20 µm de comprimento, formando normalmente um zig-zag. Os conídios são hialinos, globosos a largamente elipsoidais, geralmente com tamanho variando de 2-3 × 2-2,5 µm, com formação em aglomerados (Figura 5b) (ZIMMERMANN, 2007a).



**Figura 5.** A) Colônias macroscópicas do fungo *B. bassiana*; B) Hifas e conídios de *B. bassiana* (Fonte: Rafaela Fantatto).

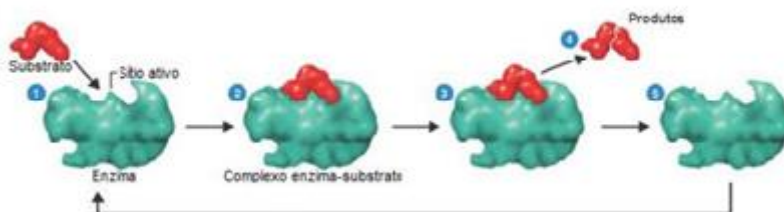
Segundo Samish e Glazer (1991), o gênero *Beauveria* é um dos mais promissores agentes para controle biológico de artrópodes, pois é de fácil dispersão, possui grande variedade de hospedeiros e habilidade de penetrar pela cutícula.

Seu uso como microinseticida já é amplamente relatado em todo o mundo. Na Europa, mais de dois milhões de hectares já recebem aplicações a base de propágulos de *B. bassiana*. No Brasil, seu uso ainda é pequeno, cerca de 100 mil hectares, porém com a tendência a sustentabilidade e controle de pragas de forma natural, esse uso tende a crescer (ZIMMERMANN, 2007a).

Produtos a base de fungos já são comercializados como o Boverin, desenvolvido em 1965 na ex-União Soviética a partir de *B. bassiana*. Em 1981, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos concedeu o registro completo ao micoacaricida Mycar, contendo *Hirsutella thompsonii* para o controle do ácaro da ferrugem, *Phyllocoptruta oleivora* (FARIA; WRAIGHT, 2007). No entanto, apenas cerca de 1 a 2% dos pesticidas vendidos mundialmente são produtos contendo micro-organismos (LACEY et al., 2015).

## 2.7. Enzimas

São denominadas enzimas, macromoléculas, predominantemente proteínas, de estruturas complexas que atuam como catalisadoras de reações químicas (SAID; PIETRO, 2014). São essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos ao possuírem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (LEHNINGER et al., 1995) (Figura 6).



**Figura 6.** Ação enzimática: Durante uma reação, as enzimas se ligam especificamente ao substrato através de uma região chamada sítio ativo (1) formando o complexo enzima-substrato (2). Devido a tal ligação, a conformação espacial da enzima sofre alterações. A reação procede catalisada pela enzima (3) quando terminada, os produtos formados são liberados (4) e a enzima volta a conformação original (5) Fonte adaptado de Tortora, Funke e Case (2010).

As enzimas são divididas em seis classes de acordo com as reações que catalisam: oxidoredutases (reações de óxido-reduções); transferases (reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (reações de hidrólise); liases (reações de quebra de ligações); isomerases (reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um

produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

A estrutura molecular de uma enzima é complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos (HARTMEIER, 1988). Quanto à estrutura, ela pode ser primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária das enzimas corresponde à sequência de seus aminoácidos e a estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais do tipo  $\alpha$ -hélice ou folha  $\beta$ . A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, provocando torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, determinante para sua atividade biológica. Finalmente, estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre diferentes cadeias polipeptídicas (SANT'ANNA JUNIOR, 2001). Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, devido à sua produção em larga escala via fermentação. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido (GHANDI et al., 1997) e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento (COLEN, 2006). A produção de enzimas microbianas é um dos principais setores da Biotecnologia Industrial, sendo que as proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas pelas amilases (MICHELIN, 2005).

A velocidade e especificidade pela reação que catalisam, permitem a conversão de substratos específicos em produtos específicos, além de evitar a produção de resíduos tóxicos normalmente gerados em processos químicos (PAQUES; MACEDO, 2006; ZHANG; SUN; MA, 2016). As condições amenas e compatíveis à vida, em que ocorrem as biocatálises, fazem com que os processos enzimáticos sejam de baixo custo energético. E a existência de uma variedade de enzimas possibilita a criação e simplificação de diversos processos industriais. Todas essas características tornam os biocatalisadores

uma alternativa aos catalisadores e processos químicos clássicos (PAQUES; MACEDO, 2006).

Com demandas e aplicações crescentes, empresas como Novozymes® (Dinamarca), DuPont® (Estados Unidos) e Roche® (Suíça) investem cada vez mais em pesquisa, produção e comercialização de enzimas, fazendo assim, parte de um mercado que movimentará até 2027 um valor estimado de US\$ 17,5 bilhões anuais (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

Dentro do contexto comercial de enzimas, os microrganismos ganham destaque por serem os principais produtores dos biocatalisadores comerciais, apresentando características como: rápido desenvolvimento em meio de cultura; grande quantidade de produto em tempo relativamente curto; possibilidade de produção em larga escala; baixos custos de produção, devido ao uso de substratos baratos e resíduos industriais; produção independente de fatores sazonais; e possibilidades de manipulações genéticas para melhor rendimento produtivo (SOARES et al., 2012). As enzimas fitase, celulase e amilase, por exemplo, em usos industriais, podem ser produzidas por *Aspergillus niger*, *Bacillus sp.* e *Bacillus subtilis*, respectivamente (SINGH et al., 2016).

### **2.7.1. Quitinase**

Quitinases pertencem a uma classe de enzimas endoglicosil-hidrolases que clivam de forma específica as ligações glicosídicas da quitina, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (N-acetil-D-glucosamina) unidas por ligações do tipo  $\beta$ -[1-4], encontradas principalmente nas carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e na parede celular de fungos. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, ficando apenas atrás da celulose e as enzimas quitinolíticas estão distribuídas entre duas numerosas famílias de glicosil-hidrolases (famílias 18 e 19), que se diferem quanto as suas estruturas primárias e terciárias e ao mecanismo de catálise (HENRISSAT, 1991; KOGA et al., 1999). As quitinases pertencentes à família 18 formam produtos  $\beta$ -anoméricos, através de um mecanismo de retenção, enquanto as quitinases da família 19 geram produtos  $\alpha$ -anoméricos utilizando um mecanismo de inversão (PERRAKIS et al., 1994).

As quitinases são enzimas que catalisam a quebra da quitina, possuem massa molecular variado de 20 a 90 kilodaltons (kDa) e são produzidas por diferentes organismos, incluindo bactérias, fungos, nematóides, insetos, plantas, peixes e humanos (HAMID et al., 2013). Para que a total degradação enzimática da quitina ocorra, as quitinases agem como um sistema quitinolítico sinérgico e consecutivo (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). Essa enzima também é amplamente utilizada para o isolamento de protoplastos a partir de fungos e leveduras, controle de fungos patogênicos, tratamento de resíduos quitinosos, e controle da transmissão de doenças por insetos devido a sua capacidade de degradar quitina (DAHIYA et al., 2006).

### **2.7.2. Proteases**

Proteases são enzimas que catalisam seletivamente a hidrólise de ligações peptídicas, resultando na degradação de proteínas e estão presentes em todos os organismos vivos, realizando inúmeras funções (LÓPEZ-OTÍN; OVERALL, 2002). Em animais, as proteases participam de processos cruciais como digestão de alimentos, crescimento celular, morfogenia e desenvolvimento, inflamação, ativação de zimogênios e pró-hormônios, dentre vários outros (GODFREY; WEST, 1996). As proteases são hidrolases que podem ser classificadas como exopeptidases, quando clivam as ligações peptídicas presentes nos terminais amino ou carboxi, ou como endopeptidases (proteínases), quando clivam as ligações peptídicas presentes no interior da molécula.

As proteases apresentam diversas aplicações biotecnológicas, o que tem estimulado a busca por novas fontes. Essas enzimas correspondem a cerca de 60% das enzimas utilizadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia (KUMAR; BHALLA, 2005; SILVA et al., 2009). Na indústria química, as proteases podem ser aplicadas como constituintes de detergentes, no tratamento de resíduos e na síntese de peptídeos. Na indústria alimentícia, são utilizadas na tenderização e maturação de carnes, na fermentação de farinhas, na coagulação de leite para produção de queijos e na hidrólise de proteínas de soja, gerando 11 produtos com atividade antioxidante e melhorando a vida útil de alimentos (BHASKAR et al., 2007). Na indústria farmacêutica, as proteases

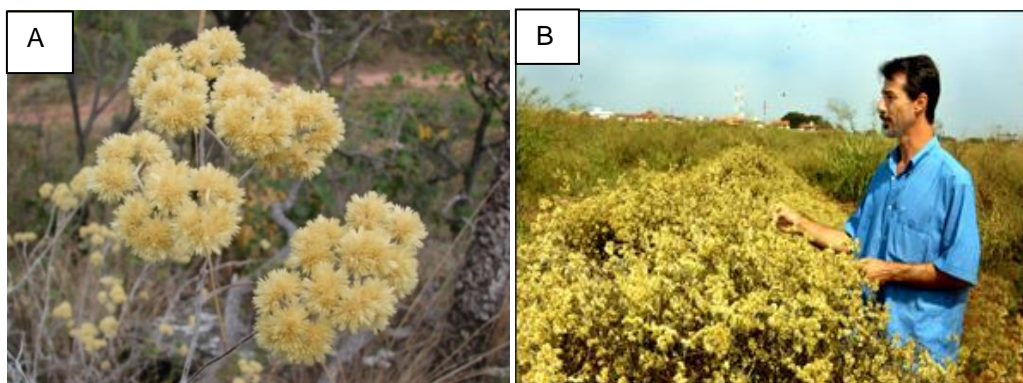
têm recebido destaque como ferramentas para uso em kits de diagnóstico (TURK, 2006) e na obtenção de peptídeos bioativos.

As proteases constituem um dos maiores e mais importantes grupos de enzimas industriais, contabilizando, pelo menos, um quarto de todas as enzimas comerciais produzidas. O mercado mundial de enzimas industriais movimentava mais de 1 bilhão de dólares por ano, sendo que 75% das enzimas comercializadas pertencem ao grupo das hidrolases e, dentre essas, 60% são proteases. Elas são amplamente utilizadas na indústria de detergentes, proteínas, cervejaria, processamento de carnes, couro, soja e laticínios, além de serem usadas em indústrias de Biotecnologia (DADSHAHI, 2016).

Uma vez que a maioria dos processos fisiológicos envolve o controle de ativação e síntese de proteínas, as proteases têm papel fundamental na regulação de diversos eventos, tais como fecundação, digestão, proteção contra agentes externos, envelhecimento e até a morte, em todos os organismos vivos. Além disso, essas enzimas são essenciais em vírus, bactérias e parasitas para sua replicação e propagação de doenças infecciosas (SHEN, 2009).

## **2.8. *Achyrocline satureioides***

*Achyrocline 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 da 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 lineares, lanceoladas de até 12 cm de comprimento por 1,8 cm de largura. Possui inflorescências de cor amarelo dourado do tipo capítulos. Possui dois tipos de flores: as flores centrais são hermafroditas e geralmente são de uma a duas, já as flores marginais são quatro ou cinco (Figura 7) (CASTRO; CHEMALE, 1995).



**Figura 7.** A: Inflorescências de *A. satureioides*; B: Professor Ilio Montanari Junior em meio à plantação de *A. satureioides* (CPQBA-Unicamp).

É muito conhecida na medicina popular brasileira como um agente digestivo, antiespasmódico, anti-inflamatório e hiperglicêmico, para tratar distúrbios gastrointestinais 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 medicinais mais utilizadas na forma de chá na medicina alternativa por pessoas de uma comunidade de Porto Alegre, RS.

Estudos têm demonstrado ações antioxidante (DESMARCHELIER et al., 1998), anti-HIV (ADAMOLI, 1998), anti-proliferativa (PESSOA, 2000), anti-herpéticas (GARCIA et al., 1999), analgésicas, constipativa 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. satureioides* também mostrou atividade mutagênica *in vitro* contra *Salmonella* e *Escherichia coli* podendo estar ligada ao seu uso popular na disenteria, diarreia e infecções intestinais (ALMEIDA, 1993). Devido à importância desta planta, ela foi incluída na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (BRANDÃO et al., 2006).

Desde os anos 80 essa espécie foi 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. Também foram 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).

### **2.9. *Schinus lentiscifolius***

A espécie *Schinus lentiscifolius* (Anacardeacea) popularmente conhecida como Aroeira cinzenta é comumente encontrada no Rio Grande do Sul e muito utilizada na medicina popular, porém tem sido pouco estudada quanto ao seu potencial medicinal e conteúdo de metabólitos secundários (LORENZI, 2002; ROSSINI et al., 1996; SCHERNKEL et al., 2002; MONTANHA et al., 2004; PAWLOWSKI et al., 2009;; GEHRKE, 2012; GEHRKE et al., 2013; PAWLOWSKI et al., 2013).

A aroeira cinzenta se apresenta como árvores de 4 a 6 metros de altura, com flores esbranquiçadas e seu fruto é esférico de cor violeta (Figura 8).



**Figura 8.** Partes aéreas de *S. lentiscifolius* (Fonte: Rafaela Fantatto).

Segundo levantamento realizado por Lorenzi (2002) a infusão das folhas dessa espécie é muito utilizada para a limpeza de ferimentos e a decocção da casca produz uma essência balsâmica que é utilizada para tratamento de



artrites e dores nos pés, o látex extraído para dores musculares, de tendões e inflamações da pele e as partes aéreas são utilizadas para tratamento antipirético (LORENZI, 2002).

Quanto ao seu uso como antiparasitário, um estudo desenvolvido por Minho et al. (2019) avaliou o potencial do extrato aquoso, hexânico e metanólico dessa espécie em diferentes estágios do parasita gastrointestinal de ruminantes *Haemonchus contortus* e do carrapato *R. (B.) microplus*. Demonstrou-se que, frente ao carrapato, o extrato hexânico em 50 mg/mL apresentou 100% de mortalidade de larvas e repelência acima de 80%.

Análise química de diferentes frações obtidas de extratos aquosos da folha *S. lentiscifolius* identificaram substâncias como mono e sesquiterpenos, o composto fenólico ácido gálico, flavonoides como a quercetina e a rutina. O extrato bruto de acetato de etila apresentou o triterpeno ácido morônico (GEHRKE et al., 2013). Apesar de existirem alguns estudos com *S. lentiscifolius*, o conhecimento a respeito dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica dos seus extratos ainda é escasso. A sua utilização na medicina popular e a inexistência de trabalhos na literatura que tragam o potencial medicinal e a identificação química de extratos obtidos da casca dessa espécie justifica a necessidade de serem estudados os seus efeitos biológicos.

### **2.10. *Galleria mellonella* como modelo alternativo para testes**

Nas últimas décadas a redução do uso de animais em pesquisa vem sendo incentivado, com as exigências de comitês de ética e boas práticas laboratoriais. O processo lento e burocrático tem levando a grande aderência da teoria três R (Reduction, Refinement and Replacement) proposta por Russell e Burch em 1959 que conscientizou o mundo científico sobre o tema e também os obrigou a buscar alternativas, restringindo assim o uso de animais de experimentação. Dentre os modelos sugeridos estão técnicas físico-químicas, uso de modelos matemáticos e computacionais, testes in vitro com cultura de tecidos e técnicas de microarranjo. Entretanto, a total substituição dos animais ainda não é possível, visto que é a melhor maneira de reproduzir o que acontece no corpo humano (ARORA et al., 2011).

Uma alternativa aos modelos de infecção em mamíferos é o uso de hospedeiros invertebrados como os nematoides ou insetos. *Caenorhabditis elegans* tem atraído a atenção como um modelo de infecção para uma ampla gama de patógenos bacterianos (PELEG et al., 2009). No entanto, *C. elegans* não pode sobreviver a 37°C e faltam homólogos funcionais de alguns componentes do sistema imune de mamíferos, tais como células fagocíticas especializadas (GLAVISBLOOM et al., 2012). A utilização de insetos como *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* como modelo de infecção oferecem a vantagem do uso a 37°C, além disso os insetos possuem células fagocíticas especializadas, também conhecidas como hemócitos, que apresentam muitas propriedades em comum com fagócitos de mamíferos.

*Galleria mellonella* é um Lepidoptera (Pyralidae) que tem sido utilizado como modelo alternativo. Este inseto é encontrado naturalmente no ambiente onde se alimenta de mel, pólen e cera de abelha e apresenta vantagens importantes; as larvas podem ser incubadas à temperatura variando entre 25 a 37 °C e por isso é possível simular o habitat de mamíferos. Além disso, é possível administrar quantidades exatas de agentes patogênicos. *G. mellonella* possui seis tipos de células fagocíticas, as quais desempenham papel importante no sistema de defesa. Além disso, a densidade de células na hemolinfa não é constante e alterações durante a infecção podem ser facilmente medidas e usadas como um parâmetro da resposta da larva após a exposição a agentes patogênicos. Além disso, a viabilidade das larvas pode ser facilmente constatada pela falta de movimento e melanização maciça induzida em resposta à infecção (HAIDO; BARRETO-BERGTER, 1989; DESALERMOS; FUCHS et al., 2012). Essas células são capazes de fagocitar patógenos e matá-los usando peptídeos antimicrobianos, melanina e produtos de cascatas proteolíticas (ELEFTherianos; REVENIS, 2011). Desta forma, as larvas de *G. mellonella* têm sido utilizadas como modelo de infecção para avaliar a virulência de diversos patógenos humanos e veterinários, como *Klebsiella pneumoniae* (INSUA et al., 2013), *Listeria monocytogenes* (JOYCE; GAHAN, 2010), *Staphylococcus aureus* (FLEMING et al., 2006) e *Streptococcus pneumoniae* (EVANS; ROZEN, 2012), mostrando que esse modelo pode ser usado para estudo de virulência em uma série de patógenos até então mal compreendida (BROWNE et al., 2013).

### 3. Objetivos

**3.1.** Avaliar a atividade acaricida de extrativos quimicamente caracterizados de *A. saturoioides* e de *S. lentiscifolius* sobre *R. (B.) microplus*, bem como associação dos mesmos ao fungo *B. bassiana* e à enzima quitinase e sua toxicidade frente ao modelo alternativo de *Galleria mellonella*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Obtenção dos extrativos vegetais e frações dos mesmos;
- Caracterizar fitoquimicamente os extratos e frações obtidas;
- Determinar as melhores condições para o cultivo do fungo *B. bassiana*;
- Produzir a enzima quitinase por *B. bassiana* em agitador orbital;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e frações de *A. saturoioides* e *S. lentiscifolius* frente a *B. bassiana*;
- Avaliar a atividade acaricida sobre *R. (B.) microplus* por meio de testes *in vitro* com os extrativos, fungo, quitinase e associações.
- Avaliar a toxicidade dos extrativos vegetais frente ao modelo alternativo de *Galleria mellonella*.

### 4. Material e métodos

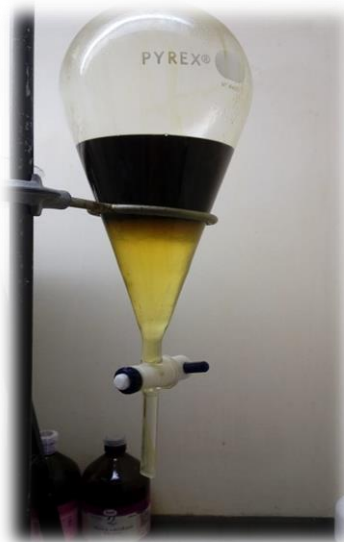
#### 4.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado foi obtido por meio de convênio firmado entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAr- UNESP), Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônomicas (CPQBA UNICAMP) e Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA). A espécie *A. saturoioides* foi obtida da Coleção de Plantas medicinais do CPQBA, cujo cultivo é de responsabilidade do Professor Dr. Ílio Montanari Junior, e coletada na cidade de Campinas-SP sob as coordenadas 22° 48' S; 47° 07' W. A espécie *S. lentiscifolius* foi cedida pela EMBRAPA CPPSUL sob responsabilidade do Dr. Alessandro P. Minho e colhida nas coordenadas 31° 33' S lat, 54° 01' W. Ambas as espécies foram registradas e possuem autorização de uso pelo SISGEN, sob cadastro número AD73F75.

#### 4.2. Produção e fracionamento dos extrativos vegetais

O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar a 40 ° C. e posteriormente moídas em um moinho de facas.

Os extratos etanólicos foram obtidos a partir das partes aéreas de *A. saturoioides* e da casca de *S. lentiscifolius* pelo método de maceração 1:10 em etanol absoluto. Após 7 dias o conteúdo foi filtrado, rotaevaporado e acondicionado em frasco âmbar. O fracionamento procedeu-se pelo método de partição líquido-líquido com solventes de alta, média e baixa polaridade (acetato de etila, hexano e água). Em seguida, 2 gramas de extrato etanólico foram solubilizados em 200 mL de acetato de etila, centrifugado e seu sobrenadante colocado em funil de separação juntamente com 100 mL de água destilada, permanecendo assim por 45 minutos com agitação de 15 em 15 minutos, retirando e adicionando água por três vezes (Figura 9). Após, a fração acetato foi rotaevaporada e ressuspensa em acetonitrila, que foi colocada em funil de separação juntamente com 50 mL de hexano. Após, ambas as frações foram rotoevaporadas e acondicionadas em béquer em temperatura de – 80°C.



**Figura 9.** Partição líquido-líquido do extrato bruto de *S. lentiscifolius*.

#### 4.3. Análise por HPLC-MS dos extratos vegetais

Os extratos foram analisados por HPLC-MS em um equipamento Shimadzu com bomba LC-20AD e um forno de coluna CTO-10AS VP acoplado

a um espectrômetro de massas com quadrupolo simples como analisador (LCMS-2020 QP), com uma fonte de ionização eletrospray (ESI).

Para a separação utilizou-se uma coluna ACE 3 C18 (150 mm × 4,6 mm, 3 µm de tamanho de partícula) com uma pré-coluna analítica ACE3 C18. Os compostos foram eluidos com metanol (MeOH, grau LC-MS), Água MiliQ a 1% de Ácido acético com um gradiente 38:100% durante 45 minutos; 100% MeOH durante 10 minutos e 100:32% durante 7 minutos com um fluxo de 0,5 mL/min. O fluxo de nitrogênio (gás de secagem para a evaporação do solvente) foi de 15 L/min. O potencial para o capilar do eletrospray foi de +4.50 kV e emprego de Full Scan em modo positivo e negativo (m/z 100-700) com um potencial de 1,40 kV e uma temperatura de capilar de 250°C.

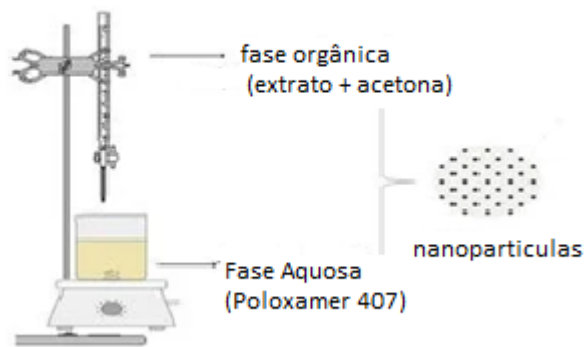
As soluções estoques dos extratos etanólicos foram injetadas a 0,25 mg/mL, com uma injeção de 5 µL através de um injetor automático (SIL-20A XR). Todos os extratos foram dissolvidos em 100% MeOH para injeção.

Para a quantificação foram utilizadas as porcentagens de área relativa de todos os picos obtidos nos cromatogramas e escolhendo-se os de maior porcentagem de área de cada amostra.

#### **4.4. Nanopartículas com extrato etanólico de *A. satureioides* e *S. lentiscifolius***

##### **4.4.1. Produção de Nanopartículas de Policaprolactona (PCL)**

As nanopartículas foram desenvolvidas pela metodologia clássica de nanoprecipitação adaptada por Greatti et al. (2020). O polímero de policaprolactona juntamente com os extratos de *A. satureioides* (ASb) e *S. lentiscifolius* (SLb) na concentração de 20 mg foram dissolvidos em 50 mL de acetona, e o surfactante Poloxamer 407 (Polyethylene glycol) na concentração de 0,5% foi dissolvido em 100 mL de água deionizada como fase aquosa da formulação. A fase orgânica foi imersa na fase aquosa com agitação em uma capela de fluxo laminar por aproximadamente 16 h para evaporação total do solvente orgânico (Figura 10). O volume final foi de 50 mL.



**Figura 10.** Preparo das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação (Greatti et al., 2020).

#### **4.4.2. Análise de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanopartículas**

A análise de DLS foi realizada pelo equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK), equipamento capaz de determinar pequenas mudanças no diâmetro médio como decorrentes das camadas adsorvidas na superfície na partícula ou pequenas variações no processo e manufatura.

As nanoemulsões foram diluídas em água na proporção de 10  $\mu\text{L}$  de emulsão em 990  $\mu\text{L}$  de água destilada, as amostras foram colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 25  $^{\circ}\text{C}$ , o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram realizadas seis determinações do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI) das gotículas de cada amostra, com a duração total de 5 min. O branco utilizado para comparação foi constituído por nanopartículas vazias, produzidas da mesma forma que as com extrato.

#### **4.4.3. Determinação do potencial zeta**

O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK. As amostras foram colocadas na célula eletroforética e foram realizadas, para

cada amostra, três determinações do potencial. O branco utilizado para comparação foi constituído por nanopartículas vazias, produzidas da mesma forma que as com extrato.

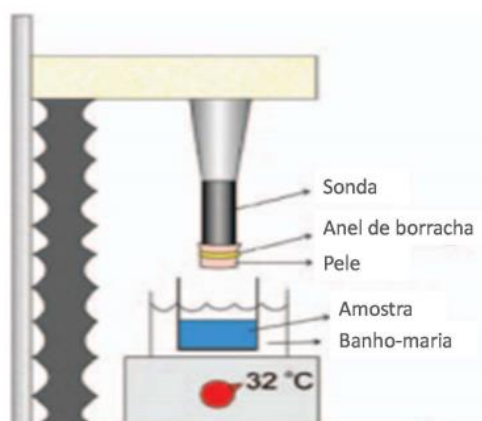
#### 4.5. Formulação a base de extrato etanólico de *A. saturoioides*

##### 4.5.1. Produção de Formulação de Goma Xantana

O preparo da formulação se deu da seguinte forma: o extrato etanólico foi pesado na concentração inicial de 40 mg/mL e solubilizado em 1 mL de água destilada com 0,5% de goma xantana obtida comercialmente. Uma segunda solução contendo água destilada e 16% de poloxamer foi preparada e solubilizada em banho de gelo. Após ambas as soluções serem preparadas, as mesmas foram incorporadas uma à outra, fazendo com que a quantidade de goma xantana e poloxamer resultassem na metade, isto é, atingindo 0,25% de goma xantana e 8% de poloxamer.

##### 4.5.2. Determinação da bioadesividade da formulação

O couro de boi *in natura* foi obtido comercialmente, lavado, cortado em pequenos quadrados de 5 cm de lado e congelado a -80 °C. No dia do experimento, o couro foi descongelado e lavado em água corrente. A força bioadesiva entre o couro e as formulações foi avaliada pelo teste de desprendimento usando um analisador de textura (CARVALHO et al., 2013 (modificado)).



**Figura 11.** Esquema do texturometro no ensaio de bioadesão (Carvalho et al., 2013).

O couro foi preso na extremidade inferior da sonda analítica (diâmetro 10 mm) por um anel de borracha. As amostras da formulação foram

aconditionadas em vasos cilíndricos rasos e baixou-se a sonda analítica revestida com couro em velocidade constante (1 mm/s) até atingir a superfície da amostra. O couro foi mantido em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este intervalo. Em seguida, a sonda analítica revestida pelo couro foi puxada para cima (0,5 mm/s) até o momento em que o contato entre as superfícies foi quebrado. A força bioadesiva das formulações foi a medida da força máxima de separação como a resistência à retirada da sonda, o que reflete a característica de bioadesão. Cinco repetições foram realizadas a 32 °C.

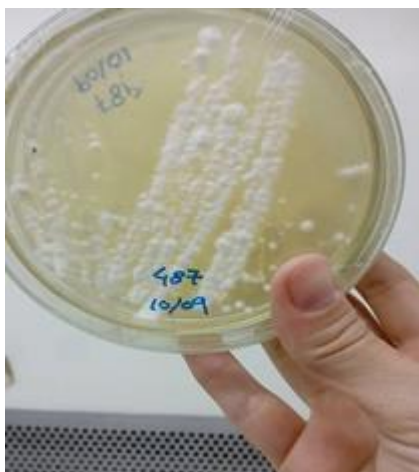
#### **4.5.3. Determinação da velocidade de escoamento das formulações**

Para determinar a velocidade de escoamento da formulação no animal, foi desenvolvido um teste utilizando couro bovino *in natura*. Uma amostra de cerca de 20 cm de couro bovino foi limpa para a retirada de resíduos, lavada em água destilada e colocado em prancha de aquecimento com temperatura de 38°C e inclinação de 90°. Aplicou-se 200 uL de cada formulação sendo elas ASb 20, SLb 20, branco (apenas goma xantana e poloxamer) e água com corante azul de metileno 10% na parte superior do couro e mensurou-se com o auxílio de uma régua a distância percorrida (em centímetros) pelas amostras das formulações no tempo de 2 minutos.

#### **4.6. Condições de cultivo do fungo**

A cepa 487 de *B. bassiana* utilizada nos ensaios foi obtida da Coleção Embrapa Cenargen e registrada no banco de dados ARSEF (Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures). O cultivo para manutenção e produção de conídios foi realizado em meio Batata Dextrose Agar (BDA) comercial e mantido em estufa a 28 °C (Figura 12).





**Figura 12.** Colonias do fungo *B. bassiana* em meio batata dextrose agar.

## 4.7. Condições de produção de quitinase

### 4.7.1. Meios de Fermentação

Para a produção de quitinases foram realizadas fermentações em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura. A fermentação ocorreu em incubadora com agitação orbital (Tecnal ® TE-422). As condições das fermentações iniciais foram baseadas em Nahar e colaboradores (2004) com pH inicial 5,5, temperatura de 28 °C, velocidade de agitação de 120 rpm, tamanho de inóculo de  $10^7$  cel/mL e tempo de incubação de 24h e ajustadas conforme necessário. Os meios utilizados estão descritos na Tabela 2 e as soluções de mix de sais e elementos traços estão dispostas na Tabela 3.

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultura para produção de quitinases.

	Meio Hill	Meio Adams	Meio 2
KHPO <sub>4</sub> (g/L)	3,0	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	1,0	-	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	0,7	-	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	1,4	-	-
Mix de Sais (mL/L)	-	50,0	-
Solução MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	5,0	-

(mL/L)			
Solução de Elementos	-	1,0	-
Traços (mL/L)			
Glicose (g/L)	-	10,0	10,0
Extrato de Levedura (g/L)	-	-	2,0
pH	-	-	5,5

**Tabela 3.** Composição das soluções de mix de sais e elementos traços.

	Solução de Mix de Sais	Solução MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Solução de Elementos Traços	
			Solução A	Solução B
NaNO <sub>3</sub> (g/L)	120,0	-	-	-
KCl (g/L)	10,4	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	16,3g	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	20,9	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	-	10,4	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	12,5	-
EDTA (g/L)	-	-	125,0	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	-	55,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (g/L)	-	-	-	27,5
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	-	12,5
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	-	4,0
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	-	4,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4 H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	-	2,75

Quanto ao preparo da Solução de Elementos Traços, a solução A foi preparada previamente através da dissolução do FeSO<sub>4</sub> em água e posterior adição do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O pH da solução A deve ser ajustado para 5,5, obtendo uma solução amarelo dourado. A solução B foi preparada solubilizando os elementos traços e o pH foi ajustado para 6,5 com *pellets* de KOH e armazenado a 4 °C.

#### 4.7.2. Preparo do indutor

Camarões inteiros pré-cozidos foram adquiridos no comércio local e foram retiradas a cabeça e a carapaça dos mesmos. Após isso foram congeladas, lavadas com água destilada em peneira, secas a 100 °C em estufa de secagem e trituradas. O indutor foi adicionado aos meios de cultivo na concentração de 5,0 g/L.

### 4.8. Determinação da atividade enzimática

#### 4.8.1. Atividade Quitinolítica

Para determinar a atividade enzimática quitinolítica uma alíquota de 200 uL do meio fermentado foi adicionada de 200 uL da solução de substrato 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 1 mmol/L em tampão acetato de sódio 100mmol/L pH 5,0, e reação enzimática foi incubada a 65 °C por 5 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio, o qual na presença de p-nitrofenol liberado pela reação enzimática desenvolveu uma coloração amarela pela alcalinização do pH causado pelo tetraborato de sódio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm de absorbância e a atividade enzimática foi calculada seguindo a equação:

$$Atividade\ Enzimática = \frac{Absorbância_{(405nm)} \times Volume_{Ensaio(mL)}}{\epsilon_{(p-nitrofenol)} \times Tempo_{(minutos)} \times Volume_{Amostra(mL)}}$$

Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitrofenol por minuto conforme as condições experimentais. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata e seus resultados expressos pela média ± desvio padrão.

#### 4.8.2. Curva Analítica de p-nitrofenol

Para a determinação da atividade enzimática das quitinases foi necessária a utilização de uma curva analítica de p-nitrofenol, produto da atividade enzimática. A curva analítica está representada na Figura 13, cuja concentração de p-nitrofenol variou de 10 a 150 nmol/mL e a leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro. A partir da curva analítica de p-

nitrofenol foi determinado o  $\epsilon$  utilizado para a determinação da atividade quitinolítica.

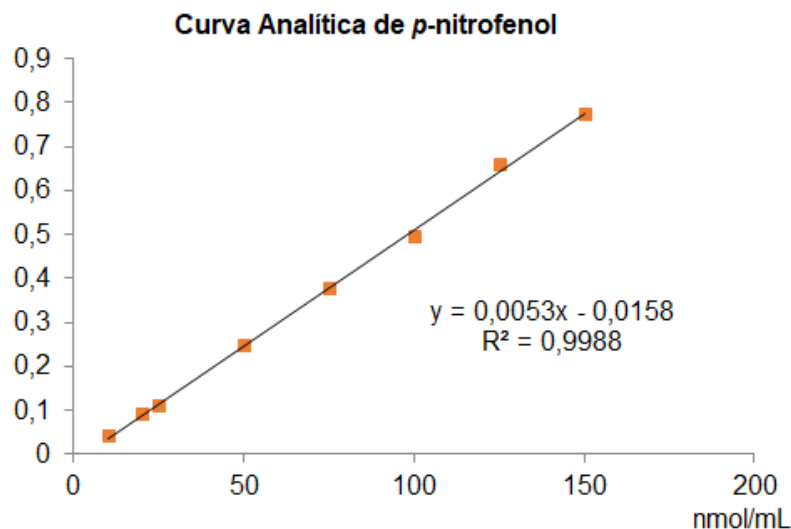


Figura 13. Curva Analítica de *p*-nitrofenol.

#### 4.9. Determinação da influência dos extratos sobre a atividade enzimática

##### 4.9.1. Avaliação de Atividade Residual de Quitinase

Para determinar a influência dos extratos de *A. saturooides* e *S. lentiscifolius* na atividade enzimática e mimetizar as condições utilizadas no ensaio de contato em papel impregnado de larvas de *R (B) microplus* foi realizado um ensaio da atividade residual de quitinases frente aos diferentes extratos de plantas. O método constituiu em adicionar 200  $\mu$ L de cada extrato a ser avaliado em um tubo e adicionar 200  $\mu$ L de meio fermentado com enzima. As enzimas foram incubadas a 30 °C por 1 hora, 2 dias e 5 dias e após cada ciclo de tempo adicionou-se a essa solução reacional 200  $\mu$ L de substrato 4-Nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, seguido de incubação por 5 minutos a 30 °C. A reação foi finalizada com 1 mL de solução saturada de tetraborato e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm. A fim de retirar a possível interferência da coloração do extrato também foi medida absorvância dos denominados brancos dos extratos.

$$\text{Atividade Residual (\%)} = \frac{\text{Atividade Quitinase e Extrato} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}}\right) \times 100}{\text{Atividade Quitinase} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}}\right)}$$

#### 4.9.2. Avaliação da Atividade Residual de Proteases

A determinação da atividade residual de proteases frente a diferentes extratos de *A. saturoides* e *S. lentiscifolius* foi realizada para determinar uma aplicação farmacológica dos extratos. Para o teste, 200 µL de proteases produzidas por *Aspergillus oryzae* foram incubadas com diferentes extratos de *A. saturoides* e *S. lentiscifolius* por 30 minutos em temperatura ambiente. Após 30 minutos de incubação foi realizada a determinação da atividade proteolítica segundo Parathaman et al. (2009); uma alíquota de 200 µL da reação de extrato e protease foi adicionada a um tubo contendo 300 µL de tampão fosfato de potássio (0,2 mol/L pH 7,0) e 500 µL de solução de caseína a 1% (p/v) em tampão (0,2 mol/L pH 7,0). Os tubos foram incubados por 10 minutos a 60 °C e a reação foi finalizada pela adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% (p/v). Após a finalização da reação, os tubos foram centrifugados a 5000 x g por 15 minutos e 1 mL do sobrenadante foi coletado. Ao sobrenadante adicionou-se 5 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 mol/L e 1 mL do reagente de Folin Ciocalteau (diluído na proporção 1:3 em água MilliQ). Para o desenvolvimento da coloração azul a mistura reacional contendo Folin Ciocalteau foi incubada por 30 minutos, temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro a 660 nm. (LOWRY et al, 1951).

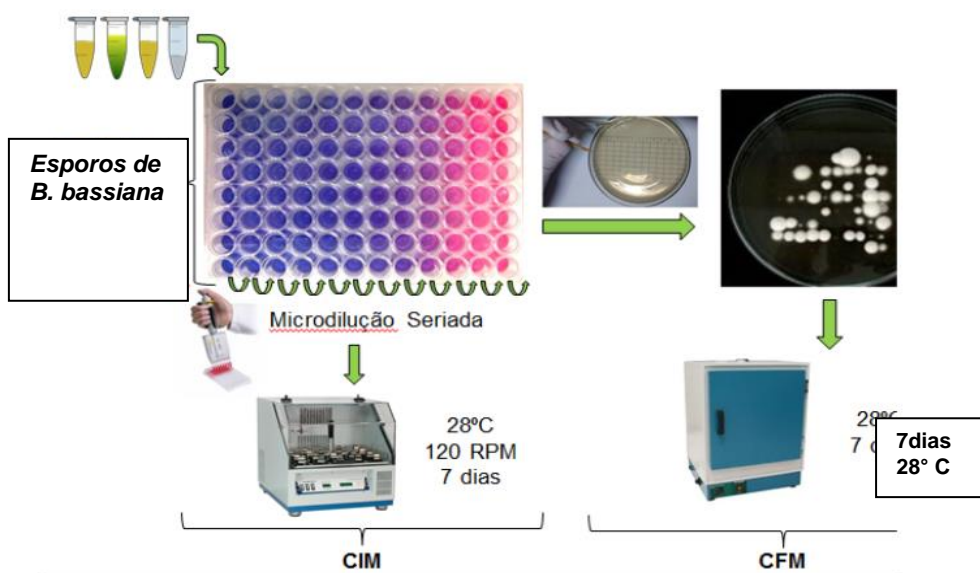
A atividade enzimática na ausência de extrato de plantas foi considerada como atividade máxima e a porcentagem de inibição de proteases foi calculada através da equação:

$$\text{Porcentagem de Inibição (\%)} = \frac{\text{Atividade Proteases e Extratos} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}}\right) \times 100}{\text{Atividade Protease} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}}\right)}$$

#### 4.10. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação do CIM foi baseada na metodologia segundo o Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) M38A2 (CLSI, 2008), com modificações, adaptada em microplacas de 96 poços e meio RPMI com 2% de glicose tamponado em MOPS pH 7,2 e inóculo de 10<sup>8</sup> UFC/mL (Figura 14). Os

extrativos e frações foram diluídos em água estéril na concentração de 60 mg/mL e 100 µL foram adicionados ao primeiro poço da microplaca contendo 100 µL de meio RPMI. Realizou-se então a diluição seriada das amostras, incluindo também controle positivo e controle negativo. O inóculo foi obtido realizando uma suspensão das células fúngicas em solução aquosa de Tween® a 0,1% para contagem em câmara de Neubauer. O número de células foi ajustado para a concentração de células  $10^8$  UFC/mL, conforme descrito na literatura. Para testar o efeito acaricida das linhagens fúngicas, foram adicionadas às microplacas contendo 100 µL de meio e 100 µL da suspensão de células fúngicas. Após a montagem, a placa foi mantida por 7 dias a 28°C em estufa com agitação. Foi realizada a leitura visual para determinações da CIM. Após a leitura, uma amostra de cada poço foi coletada e inoculada em placa de Petri contendo meio BDA, com o auxílio de um palito estéril. A placa de Petri foi mantida em estufa a 28 °C por 5 dias, e então realizou-se leitura visual de inibição de crescimento para determinar a concentração fungicida mínima (CFM). A CFM obtida embasou as concentrações dos extratos brutos e frações que foram associados ao fungo *B. bassiana* sem inibi-lo.



**Figura 14.** Metodologia esquematizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima.

#### **4.11. Aplicação dos extratos vegetais frente a *R. (B) microplus***

##### **4.11.1. Preparo da suspensão fúngica para ensaios**

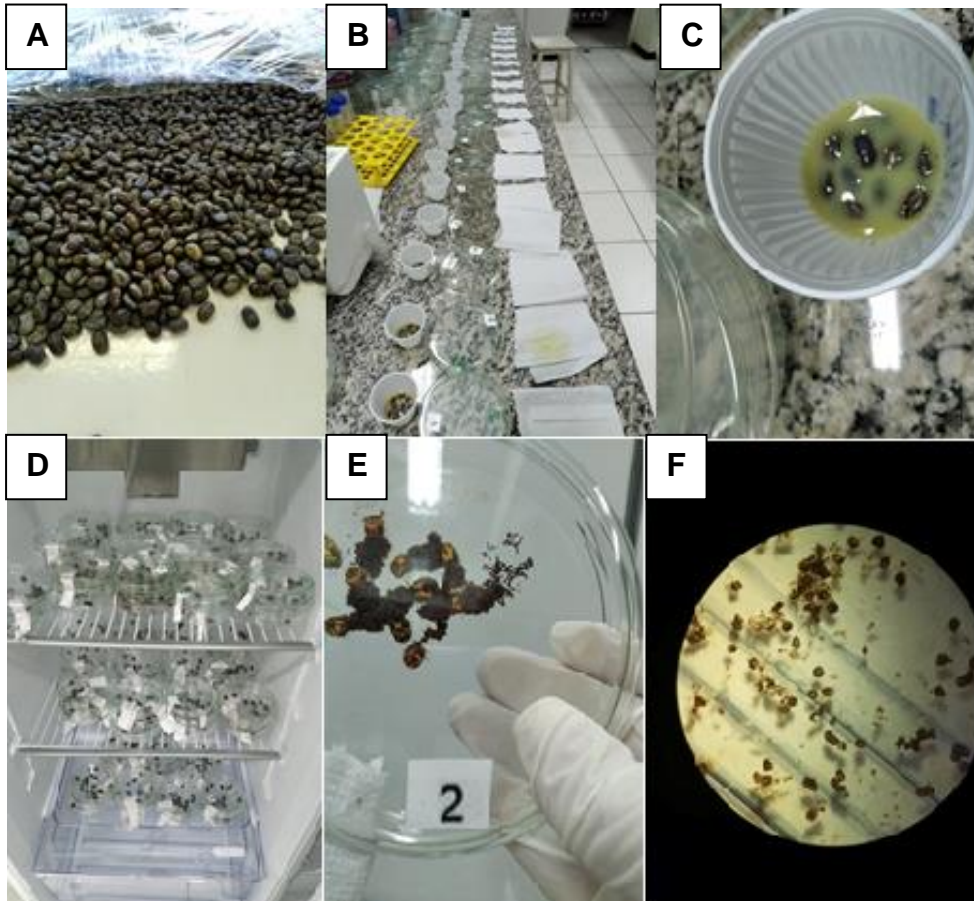
Para o preparo da suspensão fúngica, os esporos foram raspados das placas com meio em que foram cultivados e colocados em solução salina 0,09%. Após isso, procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer para determinar o volume necessário para atingir  $10^6$  esporos/mL. Na suspensão adicionou-se 10% de meio de RPMI para que o fungo tivesse uma fonte de nutrientes para desencadear sua ação.

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

Fêmeas ingurgitadas de *R. (B) microplus* foram coletadas de bovinos naturalmente infestados na Embrapa Pecuária Sudeste. De acordo com teste de resistência realizado em 2019 os carrapatos deste rebanho são resistentes a piretróides, organofosforados e amidinas.

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.

As concentrações das associações extrato/fungo/quitinase avaliadas foram determinadas através da CFM e constatou-se ser seguro iniciar em 20 mg/mL que corresponde à metade da concentração mínima inibitória encontrada. Os testes também contaram com um controle negativo, controle de solvente (Tween 2%) e controle do fungo ( $10^6$ ). As teleóginas dos grupos testes foram imersas nas substâncias a serem testadas durante 5 minutos. Em seguida foram secas e colocadas em placa de Petri para postura em estufa a temperatura média de 27 °C e umidade relativa superior a 80% durante 18 dias (Figura 15).



**Figura 15.** Teste de imersão de fêmeas de *R. (B.) microplus* nos extrativos vegetais. A) Fêmeas coletadas diretamente de bovinos infestados, B) Fêmeas distribuídas em grupos de 10 indivíduos, C) Carrapatos imersos em extrativo vegetal, D) Fêmeas após imersão acondicionadas em incubadora BOD, E) Fêmeas em oviposição, F) Visualização em lupa para determinar a porcentagem de eclosão de larvas.

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 por meio da contagem de ovos e larvas (porcentagem de eclodibilidade) em lupa. A partir dos resultados obtidos foram calculadas a eficiência reprodutiva (inibição da postura e eclosão das larvas) e eficiência 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 1 Porcentagem de oviposição**



$$\%O = \frac{\text{Média de peso dos ovos}_{\text{Controle}(g)} - \text{Média de peso de ovos}_{\text{Tratados}(g)}}{\text{Média de peso dos ovos}_{\text{Controle}(g)}} \times 100$$

### **EQUAÇÃO 2 Porcentagem de eclodibilidade**

$$\%Eclo = \frac{\text{Taxa de Eclodibilidade}_{\text{Controle}} - \text{Taxa de Eclodibilidade}_{\text{Tratado}}}{\text{Taxa de Eclodibilidade}_{\text{Controle}}} \times 100$$

### **EQUAÇÃO 3 Eficiência reprodutiva**

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

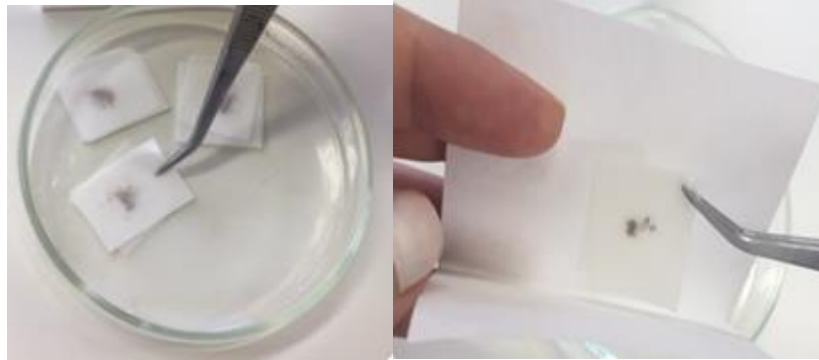
\*Constante que indica o número de ovos presente em um grama

### **EQUAÇÃO 4 Porcentagem de eficácia do produto**

$$\%E = \frac{RE_{\text{Controle}} - RE_{\text{Tratado}}}{RE_{\text{Controle}}} \times 100$$

#### **4.11.3 Sensibilidade de larvas em teste de contato em papel impregnado**

Os testes de sensibilidade de larvas de *R. (B.) microplus* foram realizados de acordo com a técnica recomendada pela FAO (1971). Nessa metodologia aproximadamente 100 larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas coletadas na Embrapa Pecuária Sudeste foram colocadas em papel filtro medindo aproximadamente 10 x 8 cm, impregnados com diferentes concentrações das amostras ou controle. Cada um destes papéis impregnados com os extrativos e/ou *B. bassiana* na concentração de 10<sup>6</sup> esporos/mL foram dobrados formando um “sanduíche” e vedados com pregadores plásticos. Os envelopes foram acondicionados em estufa BOD a 27° C e umidade relativa de 80%, em triplicatas. A leitura ocorreu após 7 dias de incubação com a ajuda de um compressor a vácuo, adaptado com uma pipeta, diferenciando larvas vivas e mortas (Figura 16).

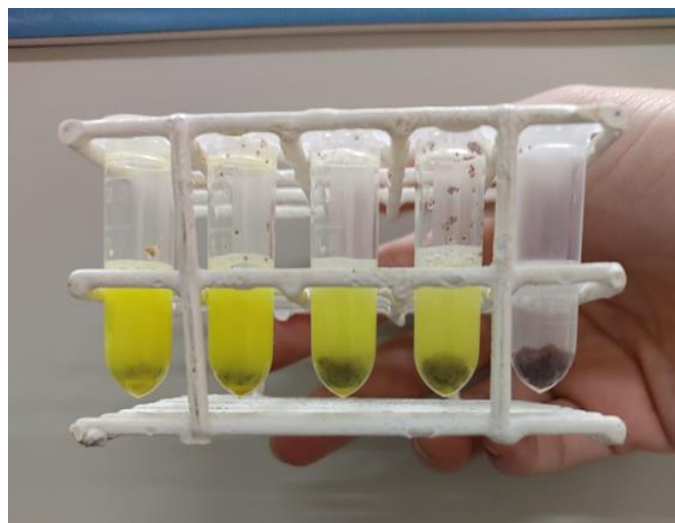


**Figura 16.** Teste de contato de larvas de *R. (B.) microplus* em papel impregnado

(Fonte: Rafaela Fantatto).

#### 4.11.3. Teste de imersão de larvas

Cerca de 300 larvas foram adicionadas a 1 mL de cada concentração de cada solução a ser testada contendo extrativos vegetais e/ou fungo *B. bassiana*. Nessa solução foi adicionado Triton a 0,02% para garantir a imersão das larvas. Essas larvas ficaram imersas por 10 minutos. Após o tempo decorrido as larvas foram colocadas em envelopes de papel filtro em três repetições de 100 larvas (SABATINI et al., 2011) (Figura 17).



**Figura 17.** Larvas de *R. (B.) microplus* imersas em diferentes concentrações do extrato (Fonte: Rafaela Fantatto).

Esses envelopes foram vedados e acondicionados em estufa BOD a 27° C e umidade relativa de 80% por 48 horas e após esse período foi realizada a leitura do teste diferenciando larvas vivas de larvas mortas com o auxílio de um compressor a vácuo.

#### 4.11.4. Teste de contato em celulose impregnada

A técnica consiste em pesar 25 mg de celulose inerte por tubo, adicionar 50 µL de extrato solubilizado em diclorometano e deixar evaporar por 24 horas. Após decorrido esse tempo, adiciona-se larvas de carrapato ao pó, move-os para que impregne e deixa em contato por 24 horas, após isso realizou-se a contagem diferenciando larvas vivas e mortas (RUIZ-VASQUEZ et al., 2017).



**Figura 18.** a) Larvas de *R. (B.) microplus* em contato com celulose impregnada com extrato b) Contagem das larvas vivas e mortas (Fonte: Rafaela Fantatto).

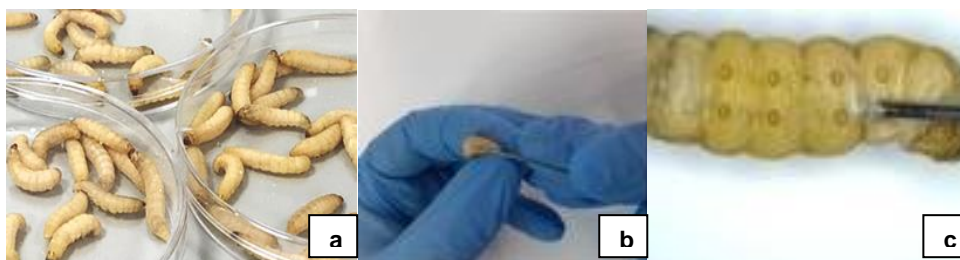
#### **4.12. Avaliação da toxicidade frente ao modelo alternativo de *Galleria mellonella***

Os ensaios de toxicidade utilizando larvas de *G. mellonella* foram executados em colaboração com a Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, do Núcleo do Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp Araraquara.

A colônia de larvas foi mantida no escuro, em caixas plásticas contendo cera de abelha e pólen na temperatura de 25°C. Para o teste foram selecionadas 10 larvas por grupo com peso entre 200 e 250 mg. Foram preparados os grupos para cada amostra do teste e controles de solvente e de desenvolvimento das larvas. Cada grupo foi mantido em uma placa de petri e permaneceu sem alimento por 24 horas a 37°C também no escuro.

Para o teste de sobrevivência das larvas, antes da injeção das amostras foi feita a higienização da região das pró-patas com etanol 70% e swab estéril.

Para a injeção foi utilizada seringa de vidro de Hamilton de 10 µL que antes de cada amostra foi lavada com hipoclorito de sódio, etanol 70% e solução salina 0,9%, nessa ordem. Aplicou-se 10 µL das amostras do extrato (2500 µg/mL), frações (2500 µg/mL) e solvente (DMSO 2,5%) na última pró-pata esquerda de cada larva. As larvas tratadas e controles foram incubadas a 37°C, no escuro e foram avaliadas após 2, 4, 12, 24 horas e posteriormente a cada 24 horas durante 7 dias (Figura 19).



**Figura 19.** a) Grupos de *Galleria mellonella*, b e c aplicação do extrato. (Fonte: Rafaela Fantatto).

#### 4.13. Análises estatísticas

Foram realizadas análise de variância, teste de Tukey e cálculo de desvio padrão para os resultados obtidos nos ensaios. As concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> foram calculadas quando a substância avaliada atingiu ao menos 50% de mortalidade.

### 5. Resultados

#### 5.1. Obtenção e rendimento dos extratos etanólicos brutos

O rendimento encontrado para o extrato bruto de *A. saturoioides* (ASb) foi de 9,64% e o da espécie *S. lentiscifolius* (SLb) foi de 21,76%.

#### 5.2. Rendimento da partição líquido-líquido

Os rendimentos obtidos pela partição estão apresentados na Tabela 4.

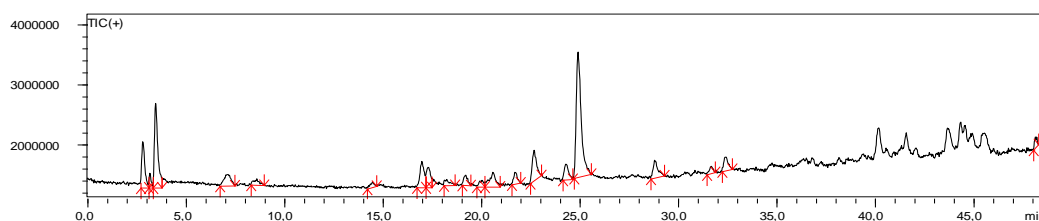
**Tabela 4.** Rendimento obtido a partir de partição líquido-líquido do extrato bruto de *A. saturoioides* e *S. lentiscifolius*.

<i>Achyrocline saturoioides</i> (Macela)	<i>Schinus lentiscifolius</i> (Aroeira)
--	---

Acetato de etila (ASac) 49%	Acetato de etila (SLac) 55%
Hexano (ASh) 17%	Hexano (SLh) 20%
Água (ASágua) 10%	Água (SLágua) 20%

### 5.3. Análise por HPLC-MS dos extratos vegetais

As análises realizadas por HPLC-MS foram apresentadas na forma de um cromatograma com picos integralizados (Figura 20, Figura 22) e tabela com massa/carga ( $m/z$ ) e % dos picos (Tabela 5, Tabela 6). Os possíveis compostos foram sugeridos por sua massa/carga encontrada na literatura (Figura 21 e 23).

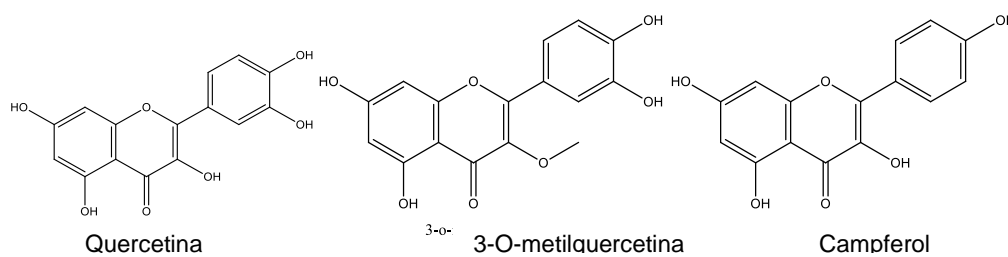


**Figura 20.** Cromatograma obtido das inflorescências de *A. satureioides* (ASb). Condições de análise: Metanol (grau LC-MS) (MeOH): Água MiliQ a 1% de Ácido acético com um gradiente 38:100% durante 45 minutos, 100% MeOH durante 10 minutos e 100:32% durante 7 minutos e um fluxo de 0,5mL/min.

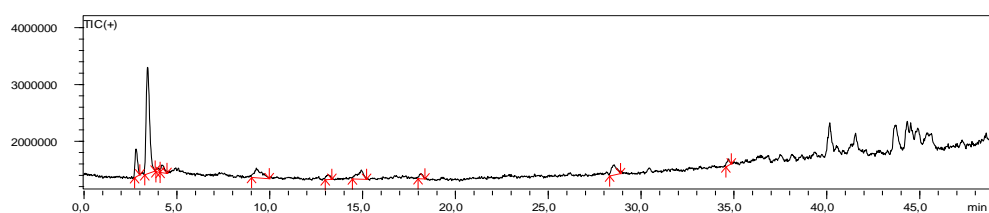
**Tabela 5.** Tempo de retenção e massa/carga obtidos por análise HPLC-MS de compostos pertencentes ao extrato etanólico bruto de *A. satureioides*.

<i>Achyrocline satureioides</i> (ASb)					
Tempo de retenção	$m/z$	[M] <sup>+</sup>		Possível composto	% pico
2,84	207				7,21
	193				
	179				
	165				
3,17	104				1,44
	137				
3,47	205				14,51
	183				
	118				
	153				
7,13	449	448	[M+H] <sup>+</sup>	Derivado de campferol	3,85
	471				
8,62	449	448	[M+H] <sup>+</sup>	Derivado de campferol	1,44
	471				
14,49	479	478	[M+H] <sup>+</sup>	Phyllirin	0,91
	501				

17,00	287 309	486	[M+H] <sup>+</sup>		5,28
17,32	465 487	464	[M+H] <sup>+</sup>	Isoquercetina	4,22
18,26	449 471	448	[M+H] <sup>+</sup>		1,31
19,22	479 501	478	[M+H] <sup>+</sup>		1,87
20,06	465 487	464	[M+H] <sup>+</sup>	Derivado de isoquercetina	1,29
20,60	449 471	448	[M+H] <sup>+</sup>		4,41
21,72	479 501	478	[M+H] <sup>+</sup>		2,01
22,70	303 325	302	[M+H] <sup>+</sup>	Quercetina	6,44
24,31	287 309	286	[M+H] <sup>+</sup>		3,24
24,93	317 339	316	[M+H] <sup>+</sup>	3-O- metilquercetina	31,28
28,82	287 309 301	286	[M+H] <sup>+</sup>	4,2',4'-tridroxi-6'-metoxichalcona	4,03
31,70	617 639	616	[M+H] <sup>+</sup>		1,17
32,46	315 337	314	[M+H] <sup>+</sup>		2,92
43,76	425 403 453	402	[M+Na] <sup>+</sup>		
45,02	467 445 320	444	[M+Na] <sup>+</sup>		
45,28	439 417	416	[M+Na] <sup>+</sup>		
48,16	437 459	436	[M+H] <sup>+</sup>		1,18



**Figura 21.** Moléculas de quercetina, 3-O-metilquercetina e campferol encontradas no extrato etanólico de *A. saturoioides* (ChemDraw ultra 12.0).

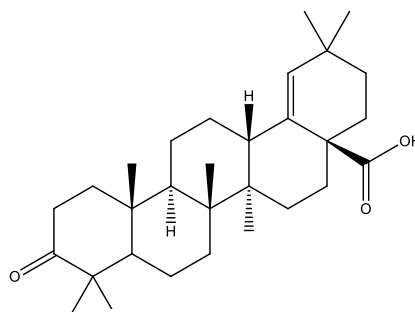


**Figura 22.** Cromatograma obtido das inflorescências de *S. lentiscifolius* (SLb). Condições de análise: Metanol (grau LC-MS) (MeOH): Água MiliQ a 1% de Ácido acético com um gradiente 38:100% durante 45 minutos, 100% MeOH durante 10 minutos e 100:32% durante 7 minutos e um fluxo de 0,5mL/min.

**Tabela 6.** Tempo de retenção e massa/carga obtidos por análise HPLC-MS de compostos pertencentes ao extrato etanólico bruto de *S. lentiscifolius* (SLb).

Tempo de retenção	m/z	[M] <sup>+</sup>	Possível composto	% pico
2,83	207 193 179 165			9,77
3,46	203 365 383			55,15
4,01	355 377 231 209	354	[M+H] <sup>+</sup>	1,32
4,22	243 221 355 325	220	[M+Na] <sup>+</sup>	3,57
9,31	199 453 475	452	[M+Na] <sup>+</sup>	ácido morônico 9,13
13,18	433 455 355	432	[M+H] <sup>+</sup>	2,41
14,96	481 465 513			7,17
18,17	449 471 695 617	448	[M+H] <sup>+</sup>	campferol 2,24

28,59	539 561	538	[M+H] <sup>+</sup>	FLA-1	7,18
34,74	354 332	331	[M+Na] <sup>+</sup>		2,07



Ácido morônico

**Figura 23.** Molécula de ácido morônico encontrada no extrato etanólico de *Schinus lentiscifolius*.

#### 5.4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima

As concentrações das associações extrato/fungo avaliadas foram determinadas através da Concentração Fungicida Mínima e constatou-se ser seguro iniciar em 20 mg/mL que corresponde à metade da Concentração Inibitória Mínima encontrada.

#### 5.5. Determinação do melhor meio para a produção da enzima quitinase

Para determinar o melhor meio e as melhores condições para a produção da enzima quitinase foram avaliados três meios diferentes, na presença e ausência de indutor. Os resultados foram acompanhados durante 7 dias consecutivos e ainda incluindo o décimo dia para determinar o melhor dia de produção. Os meios foram denominados Meio 2, Meio Hill, Meio Adams. Todos os meios foram avaliados na ausência e presença de indutor que foi constituído de casca de camarão *in natura*. Dentre todos os meios, o meio 2 apresentou melhor produção quando suplementado com indutor, e o melhor dia de produção foi o dia 7 como pode ser observado na Tabela 7.



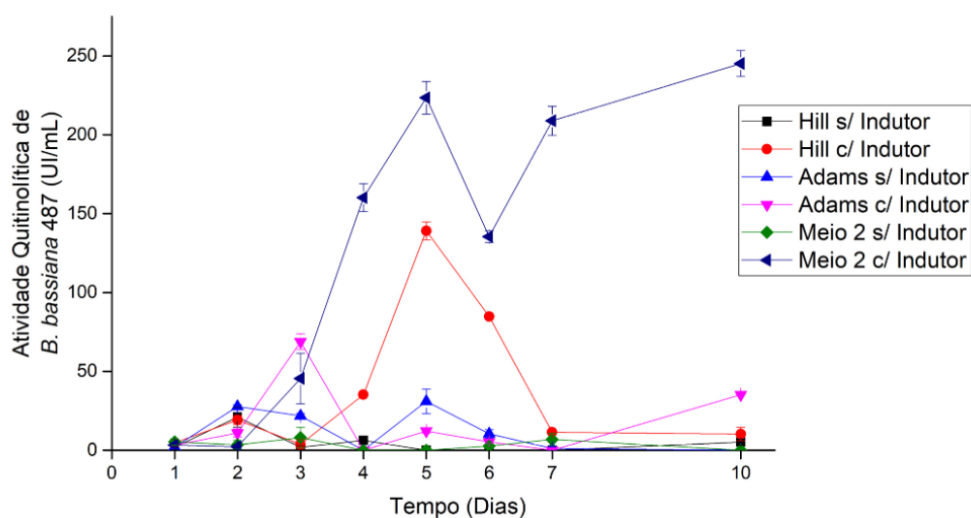
**Tabela 7.** Determinação das melhores condições de produção de enzima quitinase em linhagens de *B. bassiana* na ausência e presença de Indutor (Indut.) em atividade enzimática expressa em unidades/mL (UI/mL = nmol/mL.min).

Linhagem 487									
Meio	Ausência ou Presença Indut./Dias	1	2	3	4	5	6	7	10
HILL	SEM Indut.	1,94	21,04	1,85	6,25	0	0	0	5,19
	COM Indut.	4,75	19,19	3,7	35,22	139,12	84,79	11,45	10,3
ADAMS	SEM Indut.	2,03	27,74	21,75	11,36	30,99	10,39	1,06	0
	COM Indut.	3,35	11,01	68,86	0	12,24	5,37	0	35,22
Meio 2	SEM Indut.	5,28	3,43	8,01	0	0	2,73	6,87	0
	COM Indut.	3,35	2,29	45,52	160,16	223,47	135,42	208,94	245,22

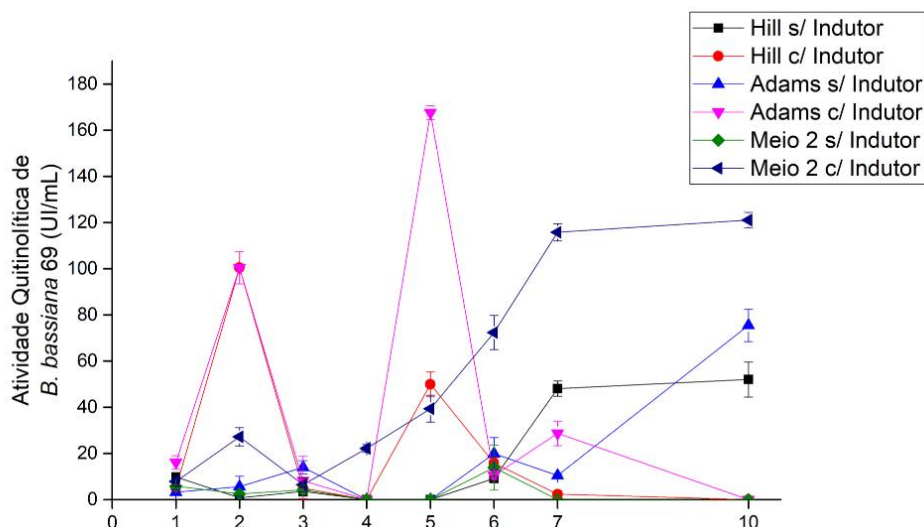
  

Linhagem 69									
Meio	Ausência ou Presença Indut./Dias	1	2	3	4	5	6	7	10
HILL	SEM Indut.	9,77	1	3,61	0	0	9,16	48,08	52,04
	COM Indut.	5,11	100,47	4,93	0	50,01	15,85	2,38	0
ADAMS	SEM Indut.	3,26	5,64	14	0	0	19,9	0	75,46
	COM Indut.	16,11	100,47	8,19	0	167,65	10,48	10,48	0
Meio 2	SEM Indut.	5,81	2,47	4,23	0	0	13,9	0	0
	COM Indut.	7,84	27,21	6,52	22,19	39,36	72,38	115,79	121,07

Nas Figuras 24 e 25, podemos observar com maior clareza os melhores dias de produção enzimática.

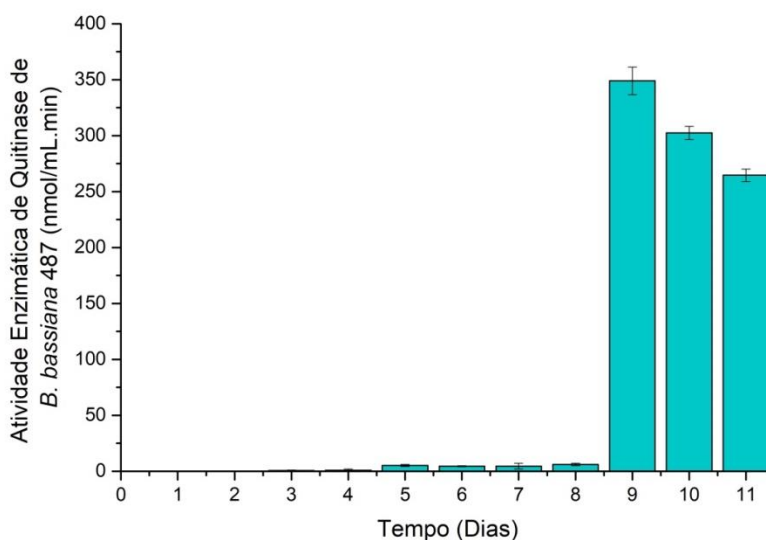


**Figura 24.** Produção de enzimas quitinolíticas pela linhagem de *B. bassiana* 487 em diferentes meios e tempos



**Figura 25.** Produção de enzimas quitinolíticas pela linhagem de *B. bassiana* 69 em diferentes meios e tempos

A análise de variância realizada pelo software Minitab 17 demonstrou que a linhagem de *B. bassiana* 487 produziu a maior atividade quitinolítica no décimo dia de fermentação (345,22 UI/mL), sendo a fermentação realizada no meio 2 e na presença de indutor, casca de camarão *in natura*. A linhagem de *B. bassiana* 69 produziu a maior atividade enzimática no quinto dia de fermentação com o meio Adams também na presença de indutor, isto é, 167,65 UI/mL. Sendo assim o ensaio de produção foi repetido em triplicata apenas com *B. bassiana* 487 em meio 2 com indutor por mais dias de produção como pode-se observar na Figura 26.



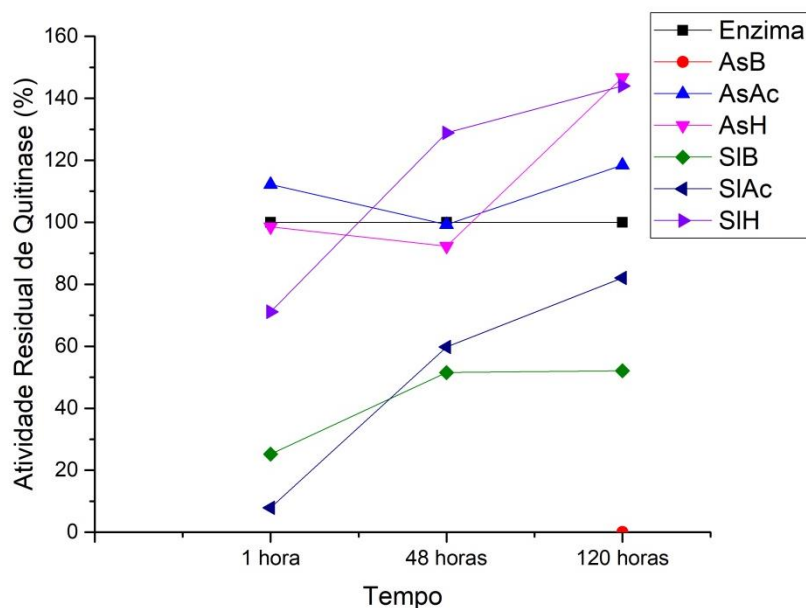
**Figura 26.** Atividade enzimática de quitinase produzida por *B. bassiana* 487 em meio 2 com indutor.

A Figura 26 apresenta a atividade enzimática de quitinase por dia da cepa 487 de *B. bassiana* fermentada em meio 2 na presença do indutor. Podemos observar que até o oitavo dia de fermentação a produção de enzimas pela *B. bassiana* 487 é baixa, sendo no oitavo dia a atividade enzimática de apenas 6,08 nmol/mL.min. Entretanto, no nono dia de fermentação há o pico de produção de enzimas pela *B. bassiana* 487, atingindo a atividade enzimática de 348,94 nmol/mL.min e mantendo a atividade elevada no décimo e décimo primeiro dia de fermentação, 302,45 e 264,59 nmol/mL.min, respectivamente. Portanto, para os ensaios de atividades residuais frente à extratos vegetais os dias 9, 10 e 11 foram utilizados como fonte de quitinases.

## 5.6. Determinação da influência dos extratos sobre a atividade enzimática

### 5.6.1. Avaliação de Atividade Residual de Quitinase

O ensaio realizado para avaliar a atividade residual de quitinases frente aos extratos nos tempos de 1 hora, 2 dias e 5 dias e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 27.



**Figura 27.** Atividade Residual de Quitinase em diferentes tempos de incubação frente à extratos de *A. saturoioides* e *S. lentiscifolius*. AsB: extrato bruto de *A. saturoioides*. AsAc: partição Acetato de etila de *A. saturoioides*. AsH: partição hexano de *A. saturoioides*. SIB: extrato bruto de *S. lentiscifolius*. SIAc: partição Acetato de etila de *S. lentiscifolius*. SIH: partição hexano de *S. lentiscifolius*.

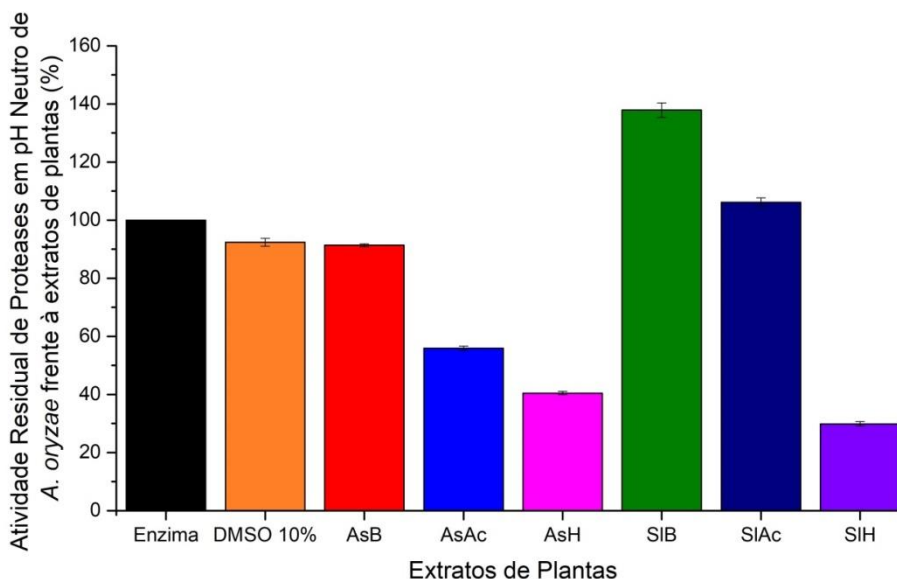
Analisando as atividades residuais de quitinases nos diferentes extratos podemos observar que o extrato bruto de *A. saturoioides* inibiu a enzima quitinase em todos os tempos analisados, com 0% de atividade residual. A partição ASac e hexano de ASH por outro lado obtiveram atividades residuais elevadas, sendo que para uma hora de incubação a atividade residual foi de 112,2 e 98,51% quando comparado à enzima sem adição de extratos vegetais. No segundo dia de incubação, a atividade residual das partições ASac e ASH para *A. saturoioides* foram de 99,26 e 92,25%, respectivamente, permanecendo uma atividade residual elevada. No quinto dia de incubação, a atividade residual da partição hexano demonstrou um aumento da atividade quitinolítica, atingindo 146,71% de atividade residual, enquanto que a partição acetato de etila apresentou um aumento modesto, com atividade residual de 118,49%.

A partição SLac e SLb de *S. lentiscifolius* apresentou uma atividade residual baixa com uma hora de incubação, com 25,2 e 7,86%, respectivamente, aumentando a atividade residual com dois dias de incubação com a quitinase produzida por *B. bassiana*, com 51,52 e 59,77%, respectivamente. No quinto dia de incubação não houve aumento da atividade residual para SLb, mantendo quase constante ao valor obtido com dois dias de

incubação, 52,10%, entretanto, a partição SLac apresentou um aumento da atividade residual de quitinase atingindo 82,02% quando comparada à enzima sem extratos vegetais. A análise de atividade residual dos extratos e frações de *S. lentiscifolius* demonstrou que SLh apresentou menores resultados de inibição, sendo em uma hora de incubação a atividade residual de 71,14%, após dois dias de incubação a atividade foi de 128,86% e, por fim, para o quinto dia de incubação analisado a atividade de quitinase remanescente foi de 144,00%.

### 5.6.2. Avaliação da Atividade Residual de Proteases de *A. oryzae*

A avaliação da atividade residual de proteases em pH neutro produzida por *A. oryzae* IOC 3919 frente a diferentes extratos vegetais teve como objetivo determinação de uma possível atividade farmacológica de inibição ou ativação de enzimas proteolíticas, as quais estão presentes em todos os organismos vivos e desempenham diversas atividades biológicas. Na Figura 28, temos os valores de atividades residuais das enzimas proteolíticas para cada extrato vegetal.



**Figura 28.** Atividade Residual de Proteases em pH neutro de *A. oryzae* frente a extratos de plantas. ASB: extrato bruto de *A. saturoioides*. ASAc: partição Acetato de etila de *A. saturoioides*. ASH: partição hexano de *A. saturoioides*. SLB: extrato bruto de *S. lentiscifolius*. SLAc: partição Acetato de etila de *S. lentiscifolius*. SLH: partição hexano de *S. lentiscifolius*.

A enzima protease sem a adição de extratos de plantas foi considerada como 100% de atividade enzimática, os extratos vegetais foram solubilizados em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e esta concentração foi

utilizada como um controle, a fim de avaliar se a presença desta substância não afetaria significativamente a atividade enzimática de proteases, o que não ocorreu, pois a atividade residual na presença de DMSO 10% foi de 92,38%.

Os resultados obtidos para o extrato bruto de *A. saturoioides* demonstraram uma atividade residual próxima à atividade da enzima sem adição de extratos de plantas, com 91,34%, indicando que este extrato não inibe a atividade proteolítica. As partições acetato de etila e hexano forneceram uma menor atividade residual de proteases com 55,86 e 40,74%, respectivamente, portanto, fornecendo uma inibição média de 50% da atividade de proteases para estas frações.

O extrato bruto e fração acetato de etila de *S. lentificifolius* demonstraram uma elevada atividade residual, com 137,87 e 106,10%, respectivamente. Este resultado sugere que este extrato bruto de *S. lentificifolius* possui um efeito elevando a atividade proteolítica, pois houve um acréscimo de 37,87% em relação à atividade basal da enzima sem estar em contato com extratos vegetais, isto é, quando apenas a protease está presente. Contudo, a fração hexano de *S. lentificifolius* apresentou uma baixa atividade residual de proteases com apenas 29,88% de atividade enzimática. A fração hexano de *S. lentificifolius* demonstrou a maior capacidade de inibição de proteases em pH neutro produzidas por *A. oryzae* IOC 3919 dentre todos os extratos e frações analisadas.

## **5.7. Produção de nanopartícula com extrato etanólico de *A. saturoioides* e *S. lentificifolius***

Após a produção das nanopartículas, foram analisados alguns parâmetros farmacotécnicos para determinar o tamanho médio das nanopartículas pelo método de DLS e Potencial Zeta para determinação da mobilidade eletroforética.

### **5.7.1. Análise de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanopartículas**

Na Tabela 8 está apresentada a análise das nanopartículas por DLS. Observa-se que com a incorporação dos extratos nas nanopartículas, a

amostra AS diminuiu e a SL aumentou consideravelmente o diâmetro, sugerindo uma anormalidade dos resultados.

**Tabela 8.** Análise por equipamento de DLS.

<b>Amostra</b>	<b>PL</b>
<b>Branco</b>	0,13
<b>AS</b>	0,044
<b>SL</b>	0,71

### 5.7.2. Determinação do potencial zeta

O sistema foi caracterizado estudando potencial Zeta, que avalia a carga da partícula como pode ser observado na Tabela 9. O tamanho das nanopartículas variaram dependendo do extrato sendo o potencial negativo o mais encontrado quando usado o sistema polimérico com poloxamer. A nanotecnologia estuda partículas com faixa de tamanho aproximadamente de 1 a 100 nm, e na área farmacêutica até 1000 nm, determinando seu uso em várias aplicações (KOO, et al. 2005). Observando os resultados obtidos nesse trabalho, podemos sugerir que não foram obtidas nanopartículas, pois os valores encontrados estão fora do recomendado na literatura. Na literatura há a descrição de potencial negativo usando o sistema polimérico com poloxamer no qual os autores justificaram que esta é uma característica do polímero utilizado (KÜLKAMP-GUERREIRO et al., 2013). Tais dados devem ser realizados novamente para esclarecimentos.

**Tabela 9.** Determinação do potencial zeta das nanopartículas.

<b>Amostra</b>	<b>Z ave</b>	<b>PL</b>
<b>Branco</b>	189,31	0,13
<b>AS</b>	192,33	0,044
<b>SL</b>	956,96	0,71

## 5.8 Produção de formulação a base de extrato etanólico de *A. satureioides*

A formulação foi desenvolvida com a finalidade de aumentar a adesividade dos extratos no carrapato e/ou no animal prolongando assim o tempo de contato e conseqüentemente um aumento da eficácia. Assim, para determinar a capacidade de adesão da formulação foram realizados o ensaio de determinação da Bioadesividade da formulação (força bioadesiva e trabalho de bioadesão) e a determinação da velocidade de escoamento das formulações.

### 5.7.3. Determinação da bioadesividade da formulação

A Figura 29 demonstra o potencial de adesividade da formulação sobre o couro bovino.

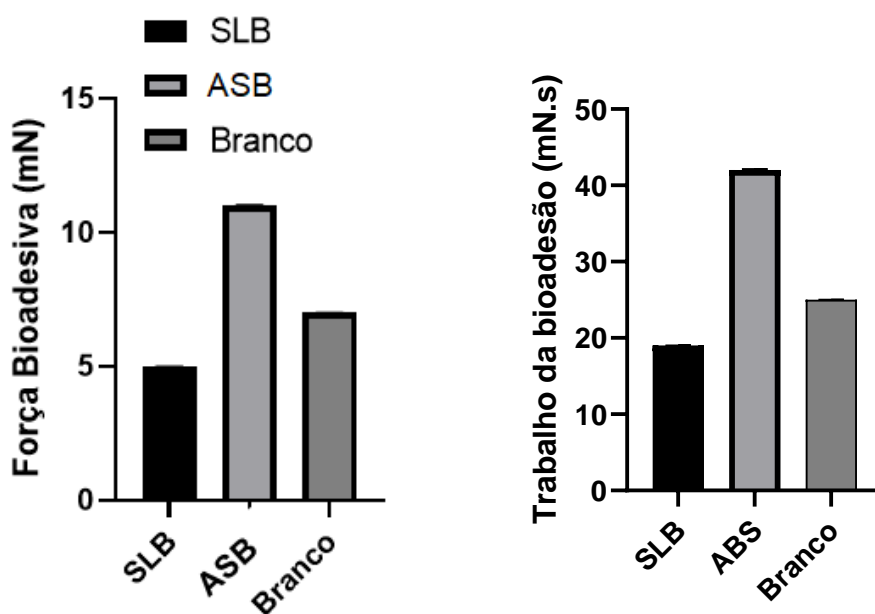


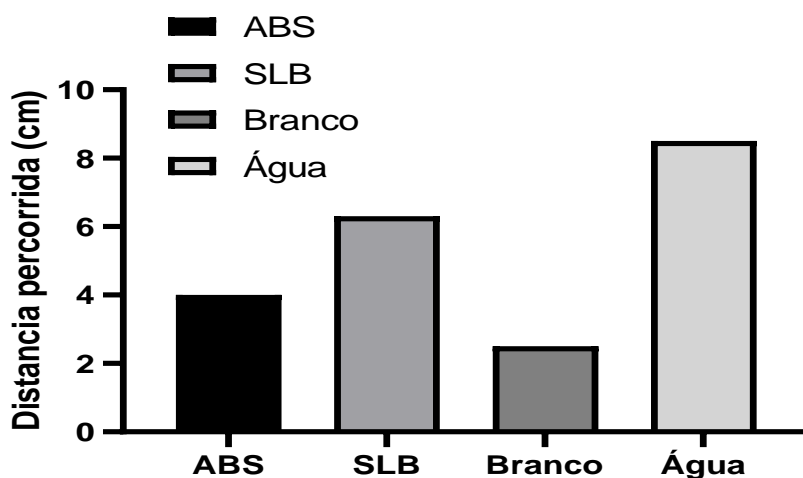
Figura 29. a) Força da bioadesividade das amostras sobre couro bovino. b) Trabalho da bioadesão das amostras sobre o couro.

### 5.7.4. Determinação da velocidade de escoamento das formulações

A determinação da velocidade de escoamento das formulações foi realizada em couro de boi *in natura* e foram mensuradas as distâncias (em cm)



que a formulação escoou, no tempo de 2 minutos e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 30 e 31.



**Figura 30.** Distância percorrida pelas formulações contendo extrato, branco (goma xantana e poloxamer) e água em contato com o couro do boi.



**Figura 31.** Teste de determinação da velocidade de escoamento de formulações em couro bovino. (Fonte: Rafaela Fantatto).

## 5.8. Aplicação dos extratos vegetais frente a *R. (B) microplus*

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

Os testes de imersão de fêmeas ingurgitadas realizados com extrativos vegetais associados e não associados ao fungo *B. bassiana* apresentaram os seguintes resultados apresentados nas Tabelas 10 a 18.

**Tabela 10.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *A. saturoioides* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^6$  células/mL.

<b>Extrato etanólico bruto de <i>A. saturoioides</i> (ASb)</b>				
<b>Concentração mg/mL</b>	<b>% redução de postura</b>	<b>% redução de eclodibilidade</b>	<b>% eficiência reprodutiva</b>	<b>%eficácia do produto</b>
10	0 ± 0	8,75 ± 1,5	89,56 ± 6,4	11,26 ± 1,5
10 c/ fungo	16,79 ± 8,7	5,56 ± 2,9	84,24 ± 12,1	14,14 ± 12,3
5	0 ± 0	7,07 ± 1,5	93,70 ± 17	7,16 ± 1,5
5 c/ fungo	16,54 ± 3,9	4,44 ± 10,7	85,36 ± 4,7	13 ± 4,8
2,5	0 ± 0	7,07 ± 1,1	93,70 ± 2,8	7,16 ± 0,5
2,5 c/ fungo	7,52 ± 6,01	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
1,25	0 ± 0	2,69 ± 1,5	93,32 ± 11,6	7,53 ± 3,7
1,25 c/ fungo	14,04 ± 7,1	2,22 ± 1,9	89,04 ± 9,4	9,25 ± 9,6

**Tabela 11.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição acetato de *A. saturoioides* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^6$  células/mL.

<b>Partição acetato de <i>A. saturoioides</i> (ASac)</b>				
<b>Concentração mg/mL</b>	<b>% redução de postura</b>	<b>% redução de eclodibilidade</b>	<b>% eficiência reprodutiva</b>	<b>%eficácia do produto</b>
10	0 ± 0	4,71 ± 1	96,59 ± 1,6	4,30 ± 1,6
10 c/ fungo	28,07 ± 9,06	5,19 ± 3,3	73,11 ± 10,6	25,49 ± 10,8
5	4,69 ± 3	2,02 ± 1,1	94,10 ± 2,0	6,76 ± 0,5
5 c/ fungo	20,30 ± 7,4	0 ± 0	89,73 ± 11,7	8,55 ± 11,9
2,5	8,50 ± 6,3	5,05 ± 1,5	87,81 ± 6,5	13 ± 6,4
2,5 c/ fungo	8,02 ± 9,7	1,85 ± 4,0	96,92 ± 10,3	1,22 ± 10,5
1,25	1,76 ± 12,3	4,71 ± 2,1	93,63 ± 13,4	7,22 ± 13,3
1,25 c/ fungo	14,29 ± 6,01	9,26 ± 1,6	83,75 ± 9,6	14,64 ± 9,7

**Tabela 12.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição hexânica de *A. saturoioides* associados e não associados ao fungo *B. bassiana*.

<b>Partição hexânica de <i>A. saturoioides</i> (ASh)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>% redução de</b>	<b>% redução de</b>	<b>% eficiência</b>	<b>%eficácia do</b>
<b>mg/mL</b>	<b>postura</b>	<b>eclodibilidade</b>	<b>reprodutiva</b>	<b>produto</b>
10	0 ± 0	1,68 ± 3	100 ± 0	0 ± 0
10 c/ fungo	25,06 ± 2,4	28,15 ± 13,8	58,24 ± 13,3	40,64 ± 16
5	11,29 ± 10,9	0,67 ± 3,6	84,99 ± 1,5	15,79 ± 6,3
5 c/ fungo	25,81 ± 4,1	30,74 ± 7,2	55,41 ± 6,2	43,53 ± 6,3
2,5	9,18 ± 6,3	0,34 ± 3,1	86,81 ± 0,5	13,98 ± 2,8
2,5 c/ fungo	14,04 ± 7,5	0 ± 0	94 ± 7,8	4,20 ± 7,9
1,25	12,64 ± 16,2	3,37 ± 3,6	81,08 ± 3,7	19,66 ± 11
1,25 c/ fungo	18,55 ± 10,5	0 ± 0	90,41 ± 15,3	7,85 ± 15,6

**Tabela 13.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição aquosa de *A. saturoioides* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL.

<b>Partição aquosa de <i>A. saturoioides</i> (ASágua)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>% redução de</b>	<b>% redução de</b>	<b>% eficiência</b>	<b>%eficácia do</b>
<b>mg/mL</b>	<b>postura</b>	<b>eclodibilidade</b>	<b>reprodutiva</b>	<b>produto</b>
10	0 ± 0	1,35 ± 2,5	100 ± 0	0 ± 0
10 c/ fungo	17,54 ± 12,8	2,59 ± 2,7	90,41 ± 12,2	7,85 ± 12,4
5	4,69 ± 8,3	2,02 ± 3	94,10 ± 6,5	6,76 ± 6,5
5 c/ fungo	20,30 ± 11	0 ± 0	89,73 ± 14,4	8,55 ± 14,6
2,5	8,50 ± 27,4	5,05 ± 1,7	87,81 ± 27,2	13 ± 26,9
2,5 c/ fungo	8,02 ± 4,59	1,85 ± 6,1	96,92 ± 8,9	1,22 ± 9,1
1,25	1,76 ± 9,4	4,71 ± 2,1	93,63 ± 5,7	7,22 ± 5,6
1,25 c/ fungo	14,29 ± 6,51	9,26 ± 4,4	83,75 ± 11,4	14,64 ± 11

**Tabela 14.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *S. lentiscifolius* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^6$  células/mL.

<b>Extrato etanólico bruto de <i>S. lentiscifolius</i> (SLb)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>% redução de</b>	<b>% redução de</b>	<b>% eficiência</b>	<b>%eficácia do</b>
<b>mg/mL</b>	<b>postura</b>	<b>eclodibilidade</b>	<b>reprodutiva</b>	<b>produto</b>
10	5,98 ± 4,3	5,84 ± 6,5	88,65 ± 6,4	10,69 ± 6,4
10 c/ fungo	13,03 ± 3,7	1,11 ± 6,1	96,51 ± 11,6	1,64 ± 11,8
5	16,81 ± 7,1	2,75 ± 3,1	81,37 ± 9,3	18,02 ± 9,3
5 c/ fungo	9,52 ± 4,1	7,04 ± 5,2	98,54 ± 9,7	0 ± 0
2,5	0,57 ± 4,9	0,34 ± 0,6	100 ± 0	0 ± 0
2,5 c/ fungo	8,27 ± 6,1	7,04 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
1,25	9,69 ± 10	0 ± 0	93,23 ± 3,8	6,08 ± 8,6
1,25 c/ fungo	17,29 ± 2,7	12,22 ± 2,2	93,27 ± 6,9	4,93 ± 6,9

**Tabela 15.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição acetato de *S. lentiscifolius* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^6$  células/mL.

<b>Partição acetato de <i>S. lentiscifolius</i> (SLac)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>% redução de</b>	<b>% redução de</b>	<b>% eficiência</b>	<b>%eficácia do</b>
<b>mg/mL</b>	<b>postura</b>	<b>eclodibilidade</b>	<b>reprodutiva</b>	<b>produto</b>
10	1,76 ± 4,3	3,03 ± 1,1	96,87 ± 2	4,02 ± 9
10 c/ fungo	8,02 ± 10,8	3,70 ± 3,3	100 ± 0	0 ± 0
5	0 ± 0	1,01 ± 1,1	100 ± 0	0 ± 0
5 c/ fungo	13,53 ± 10,9	4,07 ± 3,5	100 ± 0	0 ± 0
2,5	0 ± 0	2,36 ± 1,5	100 ± 0	0 ± 0
2,5 c/ fungo	1,25 ± 9,3	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
1,25	0 ± 0	2,69 ± 2,1	98,49 ± 1	2,41 ± 4,5
1,25 c/ fungo	10,03 ± 2,4	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0

**Tabela 16.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição hexânica de *S. lentiscifolius* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^6$  células/mL.

<b>Partição hexânica de <i>S. lentiscifolius</i> (SLh)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>% redução de</b>	<b>% redução de</b>	<b>%eficiência</b>	<b>%eficácia do</b>
<b>mg/mL</b>	<b>postura</b>	<b>eclodibilidade</b>	<b>reprodutiva</b>	<b>produto</b>
10	9,40 ± 1,4	0 ± 0	91,21 ± 1,9	8,11 ± 1,9
10 c/ fungo	26,32 ± 17,1	4,07 ± 14	100 ± 0	0 ± 0
5	10,26 ± 8,2	0 ± 0	90,80 ± 5,9	8,52 ± 6
5 c/ fungo	20,80 ± 7,71	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
2,5	3,99 ± 8,1	0 ± 0	97,41 ± 9	1,87 ± 9,1
2,5 c/ fungo	21,05 ± 5,8	1,48 ± 2,7	100 ± 0	0 ± 0
1,25	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
1,25 c/ fungo	14,54 ± 3,8	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0

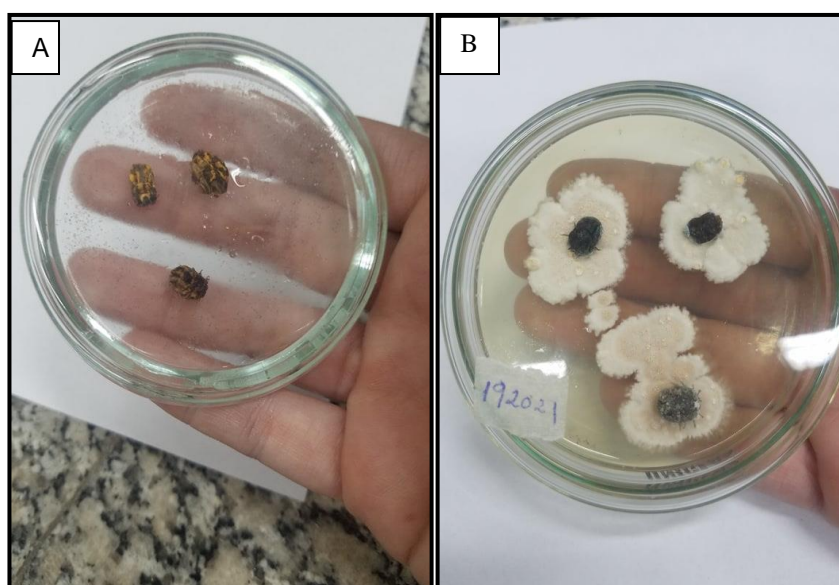
**Tabela 17.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes concentrações da partição aquosa de *S. lentiscifolius* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^6$  células/mL.

<b>Partição aquosa de <i>S. lentiscifolius</i> (SLágua)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>% redução de</b>	<b>% redução de</b>	<b>%eficiência</b>	<b>%eficácia do</b>
<b>mg/mL</b>	<b>postura</b>	<b>eclodibilidade</b>	<b>reprodutiva</b>	<b>produto</b>
10	0 ± 0	1,35 ± 2,2	100 ± 0	0 ± 0
10 c/ fungo	32,08 ± 16,3	7,41 ± 13,8	100 ± 0	0 ± 0
5	9,69 ± 11,6	0 ± 0	93,23 ± 11,6	6,08 ± 4,1
5 c/ fungo	21,30 ± 4,8	9,63 ± 1,6	100 ± 0	0 ± 0
2,5	0 ± 0	3,37 ± 4,0	98,67 ± 9,6	2,23 ± 2,1
2,5 c/ fungo	15,04 ± 3,2	16,67 ± 15	100 ± 0	0 ± 0
1,25	0 ± 0	5,72 ± 4,5	100 ± 0	0,17 ± 8,01
1,25 c/ fungo	11,03 ± 5	1,48 ± 5,5	100 ± 0	0 ± 0

**Tabela 18.** Porcentagem de parâmetros avaliados no ensaio de imersão de fêmeas ingurgitadas em diferentes controles na concentração de  $10^6$  células/mL..

Controle	% redução de postura	% redução de eclodibilidade	% eficiência reprodutiva	%eficácia do produto
Controle do fungo	$12,78 \pm 8,7$	$10 \pm 2,9$	$77,02 \pm 2,2$	$21,50 \pm 12$
Controle Tween®	$0 \pm 0$	$1 \pm 2,2$	$100 \pm 0$	$0 \pm 0$

Após a postura, as fêmeas que receberam suspensão fúngica foram colocadas em placas com fundo revestido por meio de cultura para verificar se teriam ou não sido infectadas pelo fungo. Todas as placas em que foram colocados carrapatos imersos com o fungo apresentaram crescimento de *B. bassiana* como pode ser notado na Figura 32.



**Figura 32.** A: Fêmeas do grupo controle pós-postura; B: Fêmeas do grupo extrato+fungo pós-postura. (Fonte: Rafaela Fantatto).

### 5.8.2. Teste de contato em papel impregnado

No teste de contato em papel impregnado foi determinada a porcentagem de mortalidade de larvas do carrapato *R. (B.) microplus* frente aos extrativos de *A. satureioides* e *S. lentiscifolius*, padrão quercetina,

associação extratos/enzima, sistema nanoestruturado e formulação. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir (Tabelas 19 e 21).

**Tabela 19.** Porcentagem de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* em contato com papéis impregnados com extrativos de *Achyrocline satureioides* de diferentes polaridades associados e não associados ao fungo *B. bassiana*.

Concentração mg/mL	ASb	ASac	ASh
20	2,43 <sup>c</sup> ± 1,74	0,42 <sup>d</sup> ± 0,72	1,33 <sup>d</sup> ± 0,93
20 c/ fungo	100 <sup>a</sup> ± 0	65,47 <sup>b</sup> ± 4,43	71,50 <sup>b</sup> ± 1,12
10	1,07 <sup>c</sup> ± 0,33	0 <sup>d</sup> ± 0	0,29 <sup>d</sup> ± 0,51
10 c/ fungo	99,55 <sup>a</sup> ± 0,78	47,56 <sup>c</sup> ± 5,88	49,96 <sup>c</sup> ± 5,44
5	0,18 <sup>c</sup> ± 0,30	0 <sup>d</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0
5 c/ fungo	92,53 <sup>a</sup> ± 2,26	51,03 <sup>c</sup> ± 1,58	40,76 <sup>c</sup> ± 7,48
2,5	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0
2,5 c/ fungo	93,31 <sup>a</sup> ± 8,66	40,76 <sup>c</sup> ± 8,12	44,19 <sup>c</sup> ± 4,71
Controle -	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0
Controle +	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0
Controle fungo	41,65 <sup>b</sup> ± 3,7	41,65 <sup>c</sup> ± 3,7	41,65 <sup>c</sup> ± 3,7

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle positivo: Cipermetrina (15%), Clorpirifós 25%, Citronela 0,1%). Controle fungo: apenas *B. bassiana*.

Os cálculos de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> foram realizados para determinar a quantidade de extrato associado ao fungo que seria capaz de causar mortalidade de 50 e 90% dos indivíduos e os resultados estão apresentados na tabela 20 a seguir:

**Tabela 20.** Concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos extrativos de *A. saturoioides* associados ao fungo.

	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
<b>ASb</b>	0,30 (0,17 – 0,53)	2,18 (1,27 – 3,71)
<b>ASac</b>	5,80 (3,53 – 9,52)	1193,6 (721,4 – 1974,8)
<b>ASh</b>	6,23 (4,19 – 9,27)	298,96 (200,0 – 446,8)

**Tabela 21.** Porcentagem de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* em contato com papéis impregnados com extrativos de *Schinus lentiscifolius* de diferentes polaridades associados e não associados ao fungo *B. bassiana*.

Concentração mg/mL	SLb	SLac	SLh
20	10,53 <sup>c</sup> ± 16,88	1,17 <sup>e</sup> ± 1,51	9,53 <sup>c</sup> ± 9,60
20 c/ fungo	100 <sup>a</sup> ± 0	63 <sup>b</sup> ± 6,76	50,81 <sup>b</sup> ± 8,54
10	0,72 <sup>c</sup> ± 0,70	0,38 <sup>e</sup> ± 0,65	5,81 <sup>c</sup> ± 6,95
10 c/ fungo	98,63 <sup>a</sup> ± 2,38	37,66 <sup>cd</sup> ± 7,33	49,96 <sup>b</sup> ± 5,44
5	0,18 <sup>c</sup> ± 0,30	0 <sup>e</sup> ± 0	2,58 <sup>c</sup> ± 1,75
5 c/ fungo	97,18 <sup>a</sup> ± 2,60	49,17 <sup>bc</sup> ± 6,66	40,76 <sup>b</sup> ± 7,48
2,5	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>e</sup> ± 0	1,55 <sup>c</sup> ± 1,94
2,5 c/ fungo	92,59 <sup>a</sup> ± 4,94	30,22 <sup>d</sup> ± 9,33	44,19 <sup>b</sup> ± 4,71
Controle -	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>e</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0
Controle +	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0
Controle fungo	41,65 <sup>b</sup> ± 3,7	41,65 <sup>c</sup> ± 3,7	41,65 <sup>c</sup> ± 3,7

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle positivo: Cipermetrina (15%), Clorpirifós 25%, Citronela 0,1%). Controle fungo: apenas *B. bassiana*.



**Tabela 22.** Concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos extrativos de *S. lentiscifolius* associados ao fungo.

	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
<b>SLb</b>	0,30 (0,061 – 0,633)	1,954 (1,166 – 2,58)
<b>SLac</b>	8,82 (6,39 – 12,18)	312,54 (225,7 – 432,6)
<b>SLh</b>	15,80 (9,11 – 97,42)	2254 (1360,0 – 7003,0)

Devido à alta presença de flavonoides nos extrativos, realizou-se o teste de contato em papel impregnado com padrão comercial flavonoide sigma nas concentrações de 20 a 2,5 mg/mL e as porcentagens de mortalidade obtida podem ser conferidas na tabela 23.

**Tabela 23.** Porcentagem de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* em contato com papéis impregnados com quercetina em diferentes concentrações

Concentração	% Mortalidade
<b>Quercetina</b>	
20	4,53 <sup>b</sup> ± 4,44
10	3,08 <sup>b</sup> ± 1,69
5	0,80 <sup>b</sup> ± 1,38
2.5	0 <sup>b</sup> ± 0
Controle -	0,23 <sup>b</sup> ± 0,4
Controle +	100 <sup>a</sup> ± 0

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle positivo: Cipermetrina (15%), Clorpirifós 25%, Citronela 0,1%). Controle fungo: apenas *B. bassiana*.

Observa-se que apenas o padrão quercetina não demonstrou alta porcentagem de mortalidade, porém a porcentagem encontrada foi maior que apenas o extrato. Entretanto, isso se deve às concentrações utilizadas que

foram maiores que as presentes em 20 mg de extrato, por exemplo. Considerando que os extratos associados ao fungo apresentaram maiores porcentagens de mortalidade, e sabendo que os fungos produzem enzimas com capacidade de degradação de quitina, o meio obtido pela fermentação do fungo *B. bassiana* 487 com indutor para quitinase foi utilizado na realização de um teste de contato em papel impregnado. Os resultados para as duas espécies vegetais estão apresentados na tabela 24.

**Tabela 24.** Porcentagem de mortalidade de larvas em contato com papel impregnado por meio fermentado contendo quitinase associada e não associada a extrativos de *Achyrocline satureioides*.

Tratamento	% mortalidade
ASb + enzima	6.64 ± 2,4
ASac + enzima	6.91 ± 1,6
ASh + enzima	3.12 ± 1,9
Enzima	7.89 ± 1,8
Quitinase comercial	0 ± 0
Controle -	0 ± 0

Foi calculado o desvio padrão. Controle enzima: 132,2956 unidades por mL (UI = nmol/mL.min). Controle negativo: apenas água.

**Tabela 25.** Porcentagem de mortalidade de larvas em contato com papel impregnado por meio fermentado contendo quitinase associada e não associada a extrativos de *Schinus lentiscifolius*.

Tratamento	% mortalidade
SLb + enzima	9,38 ± 2,4
SLac + enzima	1,65 ± 1,4
SLh + enzima	9,83 ± 7,4
Enzima	7.89 ± 1,8
Quitinase comercial	0 ± 0

Controle -

0 ± 0

Foi calculado o desvio padrão. Controle enzima: 132,2956 unidades por mL (UI = nmol/mL.min).  
Controle negativo: apenas água

O meio fermentado contendo quitinase apresentou diminuição da atividade quando associado aos extratos vegetais, exceto quando com SLb e SLh.

Dando continuidade à busca por melhores resultados do extrato sem associação ao fungo, avaliou-se uma nanoemulsão composta por ASb e uma formulação a base de ASb. A mortalidade das larvas para a nanoemulsão foi de apenas 4,38 ± 7,1% na concentração de 20 mg/mL, mas apresentou-se melhor do que quando avaliado somente o extrato que atingiu 2,43% de mortalidade (tabela 26).

**Tabela 26.** Porcentagem de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* em contato com papéis impregnados com nanopartículas de extrato etanólico de *A. saturoioides*.

Concentração	% Mortalidade
<b>Nanoemulsão ASb</b>	
20	4,38 ± 7,1
Controle -	0 ± 0

Com o uso da nanoemulsão, o resultado na concentração de 20 mg/mL apresentou-se melhor que quando avaliado somente o extrato que atingiu 2,43% de mortalidade.

A formulação apresentou melhores resultados atingindo 91,48% na concentração de extrato 20 mg/mL como podemos observar na tabela 27.

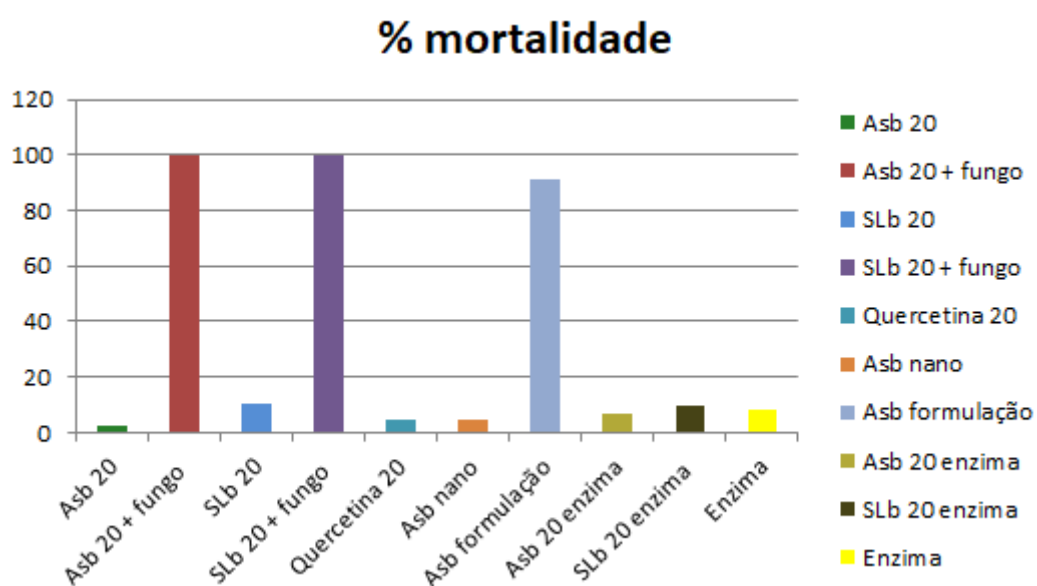
**Tabela 27.** Porcentagem de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* em contato com papéis impregnados com formulação de extrato etanólico de *A. saturoioides*.

Concentração	% Mortalidade
<b>Formulação ASb</b>	
20	91,48 <sup>a</sup> ± 14,7

10	71,48 <sup>b</sup> ± 2,1
5	11,84 <sup>d</sup> ± 8,5
2.5	19,04 <sup>c</sup> ± 2,7
Controle -	0,50 ± 8,9
Controle pol 8	20,89 <sup>c</sup> ± 4,4
Controle goma xant. 0,25	4,42 <sup>e</sup> ± 3,9

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle pol 8: Poloxamer em água, Controle goma xant: apenas goma xantana em água.

A figura 33 foi gerada com a finalidade de comparar a porcentagem de mortalidade de larvas frente os extratos brutos associados ou não ao fungo, quercetina, nanoemulsão, formulação, extratos brutos associados à enzima e apenas a enzima, pela metodologia de contato em papel impregnado. Podemos observar que ambos os extratos associados ao fungo e a formulação ASb foram os que demonstraram maior percentual de mortalidade, ficando acima de 90%.



**Figura 33.** Comparação da porcentagem de mortalidade de todos os tratamentos realizados no teste de contato em papel impregnado.

### 5.8.3. Teste de imersão de larvas

As Tabelas 28 e 30 demonstram os resultados obtidos no teste de imersão de larvas nas concentrações de 20 a 2.5 mg/mL dos extrativos de *A. saturoioides* e *S. lentiscifolius* associados e não associados ao fungo *B. bassiana* cepa 487.

**Tabela 28.** Porcentagem de mortalidade de larvas imersas em extrativos de *Achyrocline saturoioides* de diferentes polaridades associados ou não ao fungo *B. bassiana*.

Concentração mg/mL	ASb	ASac	ASh
20	9,03 <sup>d</sup> ± 36,42	4,25 <sup>d</sup> ± 3,96	48,37 <sup>c</sup> ± 19,92
20 c/ fungo	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0
10	9,28 <sup>d</sup> ± 5,26	4,63 <sup>d</sup> ± 3,10	6,47 <sup>d</sup> ± 5,90
10 c/ fungo	68,08 <sup>b</sup> ± 8,85	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0
5	5,71 <sup>d</sup> ± 1,18	0,54 <sup>d</sup> ± 0,93	4,04 <sup>d</sup> ± 1,93
5 c/ fungo	48,49 <sup>c</sup> ± 1,44	34,81 <sup>c</sup> ± 1,58	90,78 <sup>ab</sup> ± 8,84
2,5	2,79 <sup>bc</sup> ± 9,76	1 <sup>a</sup> ± 15,6	2,30 <sup>d</sup> ± 7,3
2,5 c/ fungo	59,63 <sup>bc</sup> ± 9,30	57,82 <sup>a</sup> ± 10,18	46,66 <sup>c</sup> ± 5,53
Controle Triton	5,24 <sup>d</sup> ± 0,31	5,24 <sup>d</sup> ± 0,31	5,24 <sup>d</sup> ± 0,31
Controle +	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0
Controle fungo	64,49 <sup>b</sup> ± 1,21	64,49 <sup>b</sup> ± 1,21	64,49 <sup>b</sup> ± 1,21

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle positivo: Cipermetrina (15%), Clorpirifós 25%, Citronela 0,1%). Controle Triton: Triton 0,02%. Controle fungo: apenas *B. bassiana*.

**Tabela 29.** Concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos extrativos de *A. saturoioides* associados ao fungo.

	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
ASb + fungo	2,86 (2,21 – 3,70)	20,29 (15,66 – 26,28)

<b>ASac +fungo</b>	3,61 (3,13 – 4,16)	10,29 (8,93 – 11,86)
<b>ASh + fungo</b>	2,65 (2,51 – 2,79)	5,08 (4,73 – 5,53)

**Tabela 30.** Porcentagem de mortalidade de larvas imersas em extrativos de *Schinus lentiscifolius* de diferentes polaridades associados ou não ao fungo *B. bassiana*.

<b>Concentração</b>	<b>SLb</b>	<b>SLac</b>	<b>SLh</b>
<b>mg/mL</b>			
20	75,73 <sup>b</sup> ± 15,20	37,96 <sup>cd</sup> ± 17,65	18,45 <sup>de</sup> ± 9,30
20 c/ fungo	100 <sup>a</sup> ± 0	57,19 <sup>bc</sup> ± 24,73	68,25 <sup>bc</sup> ± 16,52
10	7,36 <sup>e</sup> ± 1,84	5,08 <sup>e</sup> ± 2,07	2,13 <sup>f</sup> ± 2,54
10 c/ fungo	42,50 <sup>c</sup> ± 12,61	23,47 <sup>de</sup> ± 0,65	43,47 <sup>bcd</sup> ± 12,64
5	1,26 <sup>e</sup> ± 0,44	0,37 <sup>e</sup> ± 0,64	2,47 <sup>f</sup> ± 4,27
5 c/ fungo	26,31 <sup>cd</sup> ± 10,49	12,21 <sup>de</sup> ± 1,35	38,04 <sup>cde</sup> ± 4,76
2,5	3,43 <sup>e</sup> ± 4,46	1,75 <sup>e</sup> ± 3,03	0 ± 0
2,5 c/ fungo	24,84 <sup>cd</sup> ± 6,53	11,86 <sup>de</sup> ± 4,19	28,09 <sup>de</sup> ± 15,54
Controle Triton	5,24 <sup>d</sup> ± 0,31	5,24 <sup>d</sup> ± 0,31	5,24 <sup>d</sup> ± 0,31
Controle +	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0	100 <sup>a</sup> ± 0
Controle fungo	64,49 <sup>b</sup> ± 1,21	64,49 <sup>b</sup> ± 1,21	64,49 <sup>b</sup> ± 1,21

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle positivo: Cipermetrina (15%), Clorpirifós 25%, Citronela 0,1%). Controle Triton: Triton 0,02%. Controle fungo: apenas *B. bassiana*.

**Tabela 31.** Concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos extrativos de *S. lentiscifolius* associados ao fungo.

	<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>CL<sub>90</sub></b>
<b>SLb</b>	8,06 (7,14 – 9,11)	30,30 (26,83 – 34,22)
<b>SLac</b>	21,15 (17,22 – 25,98)	140,4 (114,1 – 172,7)
<b>SLh</b>	10,28 (3,60 – 32,7)	168,68 (35,61 – 170,33)

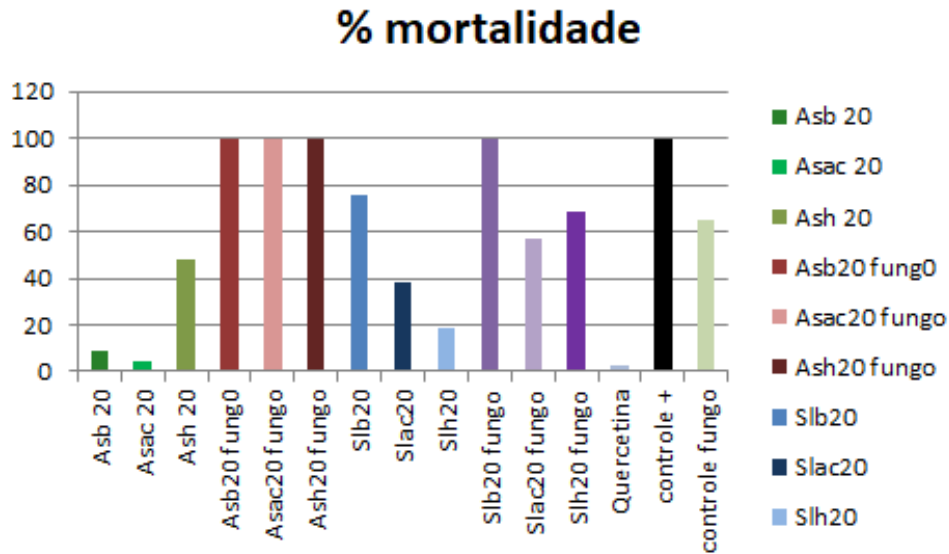
Na avaliação da quercetina a mortalidade não foi superior a 3% em todas as concentrações avaliadas (Tabela 32).

**Tabela 32.** Porcentagem de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* em teste de imersão de larvas com quercetina em diferentes concentrações.

Concentração	% Mortalidade
<b>Quercetina</b>	
20	2,25 <sup>b</sup> ± 2,74
10	2,67 <sup>b</sup> ± 2,36
5	0,71 <sup>b</sup> ± 1,21
2.5	0 <sup>b</sup> ± 0
Controle -	0 <sup>b</sup> ± 0
Controle Triton	0 <sup>b</sup> ± 0
Controle +	100 <sup>a</sup> ± 0

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle positivo: Cipermetrina (15%), Clorpirifós 25%, Citronela 0,1%). Controle Triton: Triton 0,02%. Controle fungo: apenas *B. bassiana*.

A figura 34 demonstra a porcentagem de mortalidade das maiores concentrações avaliadas de ambos os extratos e suas partições, associados e não associados ao fungo, porcentagem de mortalidade do padrão quercetina, controle fungo e controle positivo. Observa-se que as associações com esporos de *B. bassiana* aumentam a eficácia mesmo considerando o percentual do controle fungo.



**Figura 34.** Comparação de mortalidade entre todos os extrativos associados ou não ao fungo *B. bassiana* no teste de imersão de larvas.

Na Figura 35 podemos observar uma larva de *R. (B.) microplus* acometida pelo fungo *B. bassiana* corada com azul de metileno e visualizada sob microscópio óptico, onde é possível notar a coloração azul indicando a presença de hifas do fungo em regiões específicas da larva de *R. (B.) microplus*.



**Figura 35.** Larva acometida pelo fungo *B. bassiana* corada com azul de metileno e visualizada sob estereomicroscópio.

#### 5.8.4. Teste de contato em celulose impregnada

O teste de contato em celulose impregnada possui algumas vantagens frente aos outros avaliados nesse trabalho, a concentração de



extrato para a realização do teste é menor e o carrapato permanece em contato com a celulose impregnada durante toda a duração do ensaio, porém um empecilho para a realização do ensaio usando fungo é a utilização de diclorometano, solvente capaz de inibir o crescimento do fungo. Por estas razões as avaliações foram realizadas apenas com os extratos e partições, como pode ser notado nas Tabelas 33 e 34.

**Tabela 33.** Porcentagem de mortalidade de larvas colocadas em contato com celulose impregnada em extrativos de *Achyrocline satureioides* de diferentes polaridades.

Concentração mg/mL	ASb	ASac	ASh
20	47,65 <sup>a</sup> ± 6,9	60,14 <sup>a</sup> ± 5,50	39,25 <sup>a</sup> ± 3,30
10	67,44 <sup>ab</sup> ± 10	58,96 <sup>a</sup> ± 7,61	17,72 <sup>a</sup> ± 4,07
5	49,84 <sup>ab</sup> ± 6,7	50,10 <sup>a</sup> ± 22,1	35,33 <sup>b</sup> ± 13,49
2.5	43,42 <sup>b</sup> ± 13,86	37,10 <sup>ab</sup> ± 18,9	17,39 <sup>b</sup> ± 0,34
Controle -	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0	0 <sup>c</sup> ± 0
Controle DCM	5,46 <sup>c</sup> ± 1,66	5,46 <sup>bc</sup> ± 1,66	5,46 <sup>bc</sup> ± 1,66

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle negativo: água. Controle DCM: celulose impregnada em diclorometano após evaporação do solvente.

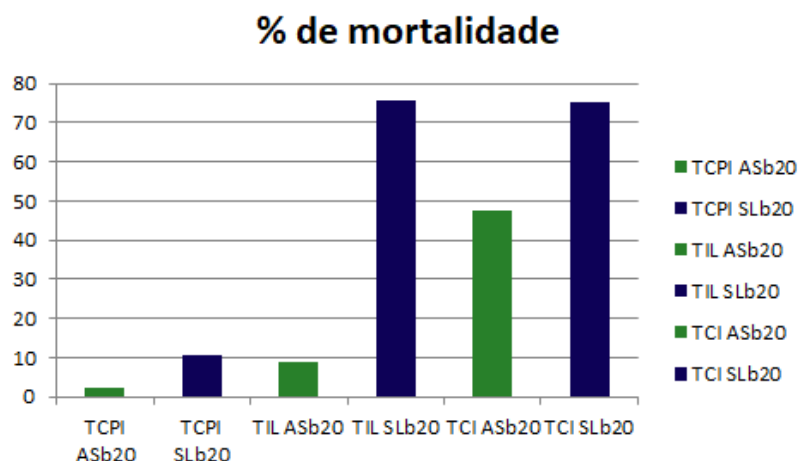
**Tabela 34.** Porcentagem de mortalidade de larvas colocadas em contato com celulose impregnada em extrativos de *Schinus lentiscifolius* de diferentes polaridades.

Concentração mg/mL	SLb	SLac	SLh
20	75,15 <sup>a</sup> ± 2,56	65,73 <sup>a</sup> ± 4,06	100 <sup>a</sup> ± 0
10	44,85 <sup>ab</sup> ± 8,54	53,03 <sup>a</sup> ± 2,62	100 <sup>a</sup> ± 0
5	58,97 <sup>b</sup> ± 5,51	56,11 <sup>b</sup> ± 17,66	78,83 <sup>a</sup> ± 6,53
2.5	67,38 <sup>c</sup> ± 4,72	44,65 <sup>c</sup> ± 21,28	59,22 <sup>a</sup> ± 2,77
Controle -	0 <sup>d</sup> ± 0	0 <sup>d</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0
Controle DCM	5,46 <sup>d</sup> ± 1,66	5,46 <sup>d</sup> ± 1,66	5,46 <sup>b</sup> ± 1,66

O Teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade foi aplicado e calculado o desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Controle

negativo: água. Controle DCM: celulose impregnada em diclorometano após evaporação do solvente.

A Figura 36 compara os resultados obtidos pelas três metodologias avaliadas com larvas de *R. (B.) microplus*.



**Figura 36.** Comparação entre as taxas de mortalidade entre o Teste de contato em papel impregnado (TCPI), Teste de imersão de larvas (TIL) e Teste de contato em celulose impregnada (TCI).

### 5.9. Avaliação da toxicidade frente ao modelo alternativo de *Galleria mellonella*

Para determinar o nível de toxicidade dos extratos e partições optou-se pelo modelo alternativo *Galleria mellonella*. A porcentagem de mortalidade ao longo dos 7 dias está demonstrada na Tabela 35. A porcentagem de mortalidade encontrada no grupo controle demonstra morte natural no decorrer dos dias. Com isso devemos considerar 10% como morte natural e, considerando isso todos os extratos apresentaram mortalidade menor que 20% e o tratamento ASb 20 não apresentou nenhuma mortalidade.

**Tabela 35.** Porcentagem de mortalidade de larvas de *G. mellonella* frente à extratos e partições hexano de *A. saturoides* e *S. lentiscifolius* no período de 7 dias.

Tratamento	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	% mortalidade
<b>ASb 20</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>ASh 20</b>	0	0	0	10%	0	0	10%	20%
<b>SLb 20</b>	0	0	0	10%	0	0	20%	30%
<b>SLh 20</b>	0	0	0	20%	0	0	0	20%
<b>Controle -</b>	0	0	0	0	0	0	10%	10%

## 6. Discussão

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. No presente trabalho o rendimento de ambos os extratos etanólicos brutos ficaram abaixo de 25%, sendo 9,64% para *A. saturoides* e 21,76% para *S. lentiscifolius*, enquanto as partições de acetato de etila apresentaram maiores rendimentos em ambas as espécies. A espécie de aroeira, a *Schinus terebinthifolius* apresentou rendimento de 24,86% ficando muito próximo ao encontrado e *S. lentiscifolius* (SANTOS, 2003). Outras Asteraceas apresentaram valores maiores como a *Callendula officinalis* que apresentou 54% de rendimento no extrato bruto (VOLPATO, 2005) e outras menores como a espécie *Calea uniflora* que apresentou 15% (CARDOSO, 2019), demonstrando assim a grande variabilidade de índices de rendimento. Apesar do baixo rendimento, alternativas como a identificação, isolamento e síntese de moléculas com atividade acaricida ou a associação com outras moléculas e organismos podem driblar esse problema (AMARAL et al., 2003). Algumas moléculas já possuem relatos de atividade acaricida como o citronelal relatado por Olivo et al. (2013), porém outras plantas que não possuem essas moléculas ainda podem apresentar atividade devido ao sinergismo de seus constituintes. As análises realizadas pelo método HPLC-MS do extrato etanólico bruto de *A. saturoides*

(ASb) demonstraram a presença das moléculas quercetina, 3-O-metilquercetina e campferol corroborando com outros autores, porém nesse extrato não foi detectada a presença de ácido caféico nem de luteolina, comumente encontrado nessa espécie (RETTA et al., 2012; SABINI et al., 2013; CARINI et al. 2014). Alguns fatores podem ter propiciado essa ausência, como a época de cultivo, clima, temperatura e solo, os quais podem alterar seus constituintes (ELLOF, 1999). No extrato etanólico de *S. lentiscifolius* (SLb) foram identificados quercetina, FLA-1, ácido morônico e galato de etila corroborando com Gehrke et al. (2012).

Ambas as espécies estudadas nesse trabalho apresentaram entre os constituintes de maior abundância os flavonoides. Os flavonoides são pigmentos naturais das flores, mas também atuam como inibidores enzimáticos, como um sistema de proteção contra a exposição a altas intensidades de radiação UV, como repelentes de insetos e pragas, na defesa contra fungos, bactérias e vírus (DI CARLO et al., 1999). Geralmente, para obter um alto potencial acaricida, são necessárias altas concentrações de extratos vegetais como 100 e 50 mg/mL, porém como já mencionamos anteriormente, um empecilho ao se trabalhar com produtos naturais é seu baixo rendimento. Deste modo, uma maneira de diminuir as concentrações a serem avaliadas e potencializar seu efeito acaricida é fazer formulações e associações, sendo as com fungos entomopatogênicos muito promissoras.

A nanotecnologia tem se destacado por desenvolver produtos com estabilidade, maior poder de penetração e absorção, maior disponibilidade e liberação controlada (PORTO et al., 2020), porém para garantir essas características são necessários alguns testes, como o de tamanho de partícula e potencial zeta. As análises realizadas na nanoemulsão desenvolvida nesse trabalho segundo a metodologia de Greatti et al. (2020), os valores do potencial zeta foram muito abaixo do recomendado que é de -0,001, demonstrando assim que a metodologia seguida não é a mais recomendada para a nanoincorporação de extratos vegetais brutos e que a nanoemulsão não se apresentou estável.

As formulações também são consideradas formas farmacêuticas capazes de melhorar a eficácia de extratos vegetais, pois devido a sua melhor adesividade, o composto permanece maior tempo no alvo e normalmente

utilizam-se compostos que promovem essas características. O poloxamer 407 tem excelentes propriedades gelificantes termossensíveis, porém ele é pobre em relação a propriedades mucoadesivas devido a sua elevada permeabilidade à água, sendo recomendada a adição de algum composto que possua essa função (MAZIA et al., 2016). No presente trabalho optamos pela utilização da goma xantana, essa goma é um material biodegradável, barato e de fácil aquisição que possui como característica a capacidade de formar gel na presença de água (WADHER; KAKDE; UMEKA, 2011).

A adesividade de uma formulação é determinada pelos testes de determinação da bioadesividade da formulação (força da bioadesividade e trabalho de bioadesão) e velocidade de escoamento das formulações. Ao avaliar a adesividade, observou-se que quando comparado com o branco, a formulação de SLb apresentou uma menor bioadesão, assim como no teste de velocidade de escoamento, em que a formulação SLb escoou mais rapidamente, 6 cm em 2 min., muito próximo da água que escoou 8 cm no mesmo tempo. A associação de substâncias ativas, como as encontradas em extratos vegetais brutos podem prejudicar a estabilidade e alterar características de uma formulação (LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001). Porém mesmo perdendo parte da adesividade, ainda apresenta melhor tempo de adesão e escoamento comparado ao extrato solubilizado apenas em água.

Ainda buscando alternativas para melhorar a eficácia de extratos vegetais sobre o ectoparasita *R. (B.) microplus*, os fungos entomopatogênicos são agentes promissores (ROT et al., 2013), pois são os patógenos mais abundantes naturalmente associados a artrópodes (LACEY et al., 2015). Bioprodutos à base de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são os mais comuns, compreendendo mais de 60% dos produtos no mercado (FARIA; WRAIGHT, 2007). Os fungos entomopatogênicos atuam sobre os insetos pela adesão de conídios à cutícula a formação de hifas que penetram o tegumento com o auxílio de enzimas secretadas como proteases, quitinases e lipases (MORAES et al., 2003). As quitinases têm recebido crescente atenção por causa de sua ampla aplicação nas áreas da medicina, agricultura, biotecnologia, tratamento de resíduos quitinosos, e controle da transmissão de doenças por insetos devido a sua capacidade de degradar quitina (DAHIYA et al., 2006). No presente estudo, a produção de quitinases foi realizada a partir

de duas cepas de *B. bassiana* em três meios de cultivo diferentes e pelo período de dez dias, os resultados demonstraram que a cepa *B. bassiana* 487 em meio 2 suplementado com casca de camarão apresentou melhor produção e com isso repetiu-se o ensaio apenas com as melhores condições de produção por mais tempo.

Nesse trabalho avaliamos o potencial dos extratos, dos extratos associados ao fungo *B. bassiana*, das formulações e do meio fermentado contendo a enzima quitinase, promovendo uma diminuição na quantidade de extratos e esporos fungicos utilizados.

Antes de promover a associação, é de extrema importância verificar se os extratos não possuem atividade antifúngica e se possuem, em quais concentrações eles não são capazes de inibir o crescimento fúngico. Para isso se recomenda realizar o ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a concentração de 60 mg/mL de ambos os extratos não seria capaz de inibir o crescimento, sendo assim por razão de segurança determinamos o uso de 20 mg/mL e iniciamos os ensaios *in vitro* com fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus*.

O teste de imersão de fêmeas consiste em avaliar diversos parâmetros, dentre eles porcentagem de oviposição, porcentagem de eclodibilidade e eficácia do produto; com esses dados podemos inferir se a substância avaliada tem ou não algum efeito deletério sobre o parasita. Nesse ensaio os percentuais de eficácia do produto, em algumas concentrações, foram ligeiramente maiores quando associados ao fungo *B. bassiana*, sendo os maiores encontrados nos extrativos de *A. saturoioides* nas concentrações de 10 mg/mL e 5mg/mL do ASb, da ASac e apresentando maior porcentagem eficácia do produto na partição ASh atingindo 43,53%. O controle do fungo apresentou 21,50% de eficácia do produto, sendo assim podemos considerar que a associação extrato+fungo promove um aumento de eficácia interessante, que poderia ser ainda melhor se as fêmeas ingurgitadas fossem tratadas em fase de semi-ingurgitamento, pois quando já ingurgitadas estão bem próximas de iniciar a postura. Ainda, levando em consideração o tempo de crescimento fúngico, quatro dias para começar a crescer e sete para atingir o seu estado mais infectante, necessita-se de um tempo maior para exercer influência e

secretar metabólitos que poderiam aumentar a eficácia inibindo a postura. Em relação à redução de postura, apenas para a maior concentração avaliada (10 mg/mL), os valores atingidos pelos extratos brutos e partições de *A. satureioides* representou cerca de 29,04% em média, enquanto para *S. lentiscifolius* este valor ficou em torno de 19,86%. Quando avaliado o parâmetro da eclosão das larvas, constatou-se que a associação extrato/fungo também não teve alta eficácia e isso pode ser explicado porque juntamente com a massa de ovos, o carrapato secreta uma “cera protetora” que na natureza serve para proteger os ovos de radiação solar, ataque de fungos e bactérias (VASCONCELOS et al., 2018) e possivelmente essa cera não permitiu o crescimento fúngico. Para verificar se o fungo havia se desenvolvido nos carrapatos, fêmeas dos grupos controle e fêmeas selecionadas aleatoriamente de grupos tratados foram acondicionadas em placas com meio de cultivo e constatou-se o crescimento fúngico nas fêmeas tratadas.

Para avaliar a eficácia dos extratos e partições frente a larvas, foram realizadas três metodologias, Teste de contato em papel impregnado (FAO,1971), Teste de imersão de larvas (SABATINI et al., 2001) e o Teste de contato em celulose impregnada (RUIZ-VASQUEZ et al., 2017).

No teste de contato em papel impregnado apenas com os extrativos, a maior porcentagem de mortalidade encontrada foi de 10,53% no extrato etanólico bruto de *S. lentiscifolius* a 20 mg/mL. Estudo apresentado por Politi et al. (2019) demonstrou que o extrato etanólico de *Tagetes patula*, também da família Asteraceae apresentou 90,76% de mortalidade na concentração de 25 mg/mL. Devido a presença da molécula quercetina nos extratos, avaliou-se o padrão quercetina comercial, que atingiu 4,53% de mortalidade na concentração de 20 mg/mL.

Quando associados ao fungo *B. bassiana*, os extrativos de *A. satureioides* em todas as concentrações apresentaram resultados significativos sendo os maiores encontrados na associação ASb + fungo (100% de mortalidade) e ASh + fungo (71,50% de mortalidade) enquanto que para *S. lentiscifolius* a associação SLb + fungo (100% de mortalidade) e SLac + fungo (63% de mortalidade) foram as mais eficientes. O meio fermentado contendo a enzima quitinase quando em contato com as larvas acarretou a morte de 7,89% e quando esse mesmo meio fermentado foi associado aos extrativos de

*A. satureioides*, ASb e ASac a mortalidade caiu para 6,64 e 6,91% respectivamente. O controle constituído apenas por esporos fungicos apresentou 41,65% de mortalidade.

Seguindo a metodologia proposta pela FAO, avaliou-se também a nanoemulsão e a formulação contendo ASb. A porcentagem de mortalidade da nanoemulsão ficou em 4,38% e a formulação apresentou um melhor taxa de morte, ficando em 91,48% na maior concentração avaliada. Pode-se observar que apesar do poloxamer e goma xantana não possuem toxicidade, ambos apresentaram taxa de mortalidade, podendo ter sido ocasionada pela obstrução dos espiráculos, prejudicando as trocas gasosas e levando o indivíduo à morte.

No teste de imersão de larvas com *A. satureioides*, a partição ASh foi a que apresentou maior mortalidade atingindo 48,37% na concentração de 20 mg/mL, os demais extrativos não ultrapassaram 10% de mortalidade sendo considerados pouco eficazes. Quando associados ao fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^6$  CFU/mL todos os extrativos causaram 100% de mortalidade das larvas. O mesmo ensaio, sem associação do fungo, quando realizado com os extrativos de *S. lentiscifolius*, demonstrou para o SLb e a SLac as maiores taxas, ficando, respectivamente, em 75,73% e 37,96% de mortalidade na concentração de 20 mg/mL. Neste tipo de teste, quando os extrativos foram associados ao fungo, apenas o extrato bruto atingiu 100% de mortalidade. As partições SLac e SLh, associadas ao fungo, demonstraram efeitos sinérgicos sendo 1,92 e 2,32 vezes superior, respectivamente, ao controle do fungo na maior concentração dos mesmos. São raros os estudos com associações entre extrato/fungo com a finalidade de controlar o carrapato do boi, porém estudo usando associação de espécie vegetal, *Melia azedarach*, numa emulsão junto ao fungo *B. bassiana* no controle de infestações de *R. microplus* em bovinos mostrou um aparente efeito sinérgico (SOUSA, et al., 2011). O controle experimental do fungo para *A. satureioides* e *S. lentiscifolius*, atingiu 41,65%. Os extrativos, nas maiores concentrações, quando associados ao fungo, apresentam um efeito potencializado sobre a mortalidade das larvas, mesmo quando comparados ao controle fungo. No entanto, esse cenário pode ser explicado devido à aderência dos extrativos nas larvas. Em maiores concentrações, a solução tende a ser mais espessa, facilitando assim a



aderência nas larvas e maior possibilidade dos esporos do fungo penetrar, enquanto que quando colocados em soluções mais fluidas os esporos acabam não aderindo de forma adequada.

Outra metodologia avaliada, o ensaio de contato em celulose impregnada, que apresenta a vantagem de necessitar de menores quantidades de extratos para sua realização e por permitir que os extrativos permaneçam mais tempo em contato com as larvas, apresentou melhores resultados comparando com as outras metodologias avaliadas. Porém, como ainda está sendo adaptado pelo nosso grupo de pesquisa para ensaios com essa espécie de carrapato, ainda não foram realizados os ensaios com associação ao fungo. Estudo realizado por Barci et al. (2009) com a cepa fúngica de *B. bassiana* IBCB66 demonstrou que apenas o fungo na concentração de  $10^7$  CFU/mL apresentou 38,1% de mortalidade de larvas, enquanto nas concentrações de  $10^9$  CFU/mL foram atingidos 100% de mortalidade. Essa comparação demonstra que a cepa fúngica utilizada em nosso estudo apresentou quase que o dobro de mortalidade em concentração menor, já que utilizamos  $10^6$  CFU/mL, reforçando a hipótese de que o fungo juntamente com o extrato aumenta significativamente a taxa de mortalidade.

Em diversos ensaios realizados no presente estudo com fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. (B.) microplus*, nota-se que concentrações menores dos extratos associados ao fungo apresentam maiores percentuais de mortalidade que quando utilizadas concentrações maiores. Esse fato curioso pode ser explicado pelo efeito Hormesis, nome utilizado quando ocorre um melhor efeito em subdoses (SOUTHAM; ERLICH, 1943). Hormesis tem sido encontrada em todos os grupos de organismos, desde bactérias e fungos até plantas superiores e animais (CALABRESE, 2005). Esse efeito se torna interessante, pois permite uma diminuição na concentração utilizada.

A toxicidade dos extratos que apresentaram melhores resultados foi avaliada pelo modelo animal alternativo *Galleria mellonella*. Apesar de apresentar mortalidade de alguns indivíduos em um momento do teste, também ocorreu mortalidade no controle, podendo ser considerado que tal evento pode ter ocorrido por causas naturais ou ambientais e não pelo efeito dos extratos.

A toxicidade de extratos aquosos da espécie *A. saturoioides* foi avaliada em ratos por Rivera et al. (2004) nas doses de 30-300 mg kg<sup>-1</sup>. Quando administrado intraperitonealmente, apresentou baixa toxicidade e quando a forma de administração foi oral a toxicidade foi zero. Além disso, Vargas et al. (1991) não encontraram nenhuma atividade mutagênica causada pelo extrato bruto de *A. saturoioides*, permitindo considerar essa espécie como segura.

Comparando ambas as espécies vegetais se nota que associados ou não ao fungo, os extrativos de *S. lentiscifolius* demonstraram uma porcentagem de mortalidade superior que os de *A. saturoioides*. Outro fator considerado é que o teste de imersão de larvas permite uma melhor percepção dos resultados, visto que não possui rápida volatilização dos compostos. O uso da linhagem 487 do fungo *B. bassiana* apresentou uma potencialização dos resultados quando comparado apenas com os extrativos.

## 7. Conclusões

Comparando as eficácias dos diferentes extrativos de ambas as espécies vegetais, pode-se concluir que:

- Quando associados ou não ao fungo *B. bassiana*, os extrativos de *S. lentiscifolius* demonstraram uma porcentagem de mortalidade superior que os de *A. saturoioides*.
- O teste de imersão de larvas e o de contato com celulose impregnada permitem uma melhor percepção dos resultados, visto que não possui rápida volatilização dos compostos.
- O uso da linhagem 487 do fungo *B. bassiana* apresentou uma potencialização dos resultados quando comparado com os extrativos não associados ao fungo.
- A utilização de quitinase para mortalidade de larvas só foi efetiva quando o tratamento consistiu de associação de partição hexânica de *A. saturoioides* e enzima.

## 8. Referências bibliográficas

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Frigoríficos exportadores de carne bovina. 2018. Disponível em: <http://abiec.com.br/exportacoes/> Acesso em: 20 nov. 2020
- ADAMOLI, R. Unconventional therapies in HIV infection: a working perspective. In: XII National Conference ANLAIDS. 1998.
- ADAMS, P. B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p.59–83, 1990.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras, conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus Editora Ltda, 1993, p.341.
- AMARAL, P. A., NEVES, G., FARIAS, F., EIFLER-LIMA. Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 39, n. 4, p. 351-363, 2003.
- ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande: Embrapa: CNPGC, 2010. 36 p.
- 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.
- ANGELO, I. C; BITTENCOURT, V. R. E. C. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos. In: VERÍSSIMO, C. J. (Org.). **Controle de carrapatos nas pastagens**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2013. p. 69-94.
- ANGUS, B. M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p.1341-1355, 1996.
- ARORA, T. A. K. M.; MEHTA, A. K.; JOSHI, V.; MEHTA, K. D.; RATHOR, N.; MEDIRATTA, P. K.; SHARMA, K. K. Substitute of animals in drug research: an approach towards fulfillment of 4R's. **Indian Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 1, p.73, 2011
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.;

LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advanced**. v. 33, p. 1582–1614, 2015.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015.

BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, É. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.243-245, 2007.

BALADRIN, N.F.; KLOCKE, J.A.; WURTLE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. **Science**, v. 228, p. 1154–1660,1985.

BARCI, L.A.G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C.; PRADO, A. P. Determination of LC 90 and LT 90 of IBCB66 *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) isolate for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 18, p. 34-39, 2009.

BARON, S.; VAN DER MERWE, N. A.; MADDER, M.; MARITZ-OLIVIER C. SNP Analysis infers that recombination is involved in the evolution of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus*. **Plos One**, v. 10, p. 131-341, 2015.

BARON, J. A.; CHEN, J. S.; CULOTTA, V. C. Cu/Zn superoxide dismutase and the proton ATPase Pma1p of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, p. 251-256, 2015.

BARRANCO-FLORIDO, J.E.; ALATORRE-ROSAS, R.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZALÉZ, G.; SAUCEDO-CASTANEDA, G. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p. 910-915, 2002.

BATISTA, A.N.L.; SANTOS-PINTO J.R.A.; BATISTA J.M., SOUZA-MOREIRA, T.M.; SANTONI, M.; ZANELLI, C.F.; KATO, M.; LOPEZ, S.N.; PALMA, M. S.; FURLAN, M. The combined use of proteomics and transcriptomics reveals a complex secondary metabolite network in *Peperomia obtusifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1275–1286, 2017.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 388-394, 2007.

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

BOUCHAMA, F.; VAN AKEN, G. A.; AUTIN, A. J. E.; KOPER, G. J. M. On the mechanism of catastrophic phase inversion in emulsions. *Colloids and Surfaces. Physicochemical Engineer Aspects*, v. 231. p.11-17, 2003

BRAGHIERI, A.; CIFUNI, G.F.; GIROLAMI, A.; RIVIEZZI, A.M.; MARSICO, I.; NAPOLITANO, F. Chemical, physical and sensory properties of meat from pure and crossbred Podolian bulls at different ageing times. **Meat Science**, v.69, p. 681– 689, 2005.

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.

BRITO, L.G.; BARBIERI, F.S.; ROCHA, R.B. et al. Evaluation of the efficacy of acaricides used to control the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, in dairy herds raised in the Brazilian Southwestern Amazon. **Veterinary Medicine Internacional**, v.2011, p.1-6, 2011.

BROWNE, M. A.; GALLOWAY, T.S.; THOMPSON, R.C. Microplastic—an emerging contaminant of potential concern? **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 3, p. 559–561, 2007.

BURGER, T.D.; SHAO R.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 76, p. 241- 253, 2014.

CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: The reemergence of

hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environmental Pollution**, v. 138 p. 378-411, 2005.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 253-259, 2004.

CARDOSO, P. S. **Avaliação biológica do extrato de *Calea uniflora* e de benzopiranos sintetizados do tipo *calea* spp.** Tese (Doutorado) - UESC, 2019.

CARINI, J.; LEITAO, G.; SCHNEIDER, P.; SANTOS, C.; COSTA, F.; HOLZSCHUH, M.; KLAMT, F.; BASSANI, V. Isolation of achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high-speed countercurrent chromatography. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, p. 66–71, 2015.

CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, p.1750-1757, 2013.

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

CHAGAS, A. C. S.; FURLONG, J.; NASCIMENTO, C. B. Predation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae) tick engorged female by the ant *Pachycondyla striata* (Smith, 1858)(Hymenoptera: Formicidae) in pastures. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, 2002.

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, M.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 Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 247–253, 2002.

CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential

oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 427-432, 2016.

COLE, E. R. **Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebithifolius* Raddi) e sua eficácia ao combate à dengue**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, 1997. 197p.

CUNHA JÚNIOR, A. D. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 385-391.2003.

CURTICE, C. The biology of the cattle tick. **Journal of Comparative Medicinal**, v. 12, p. 313-31,1891.

DADSHAHI, Z.; HOMAEI, A.; ZEINALI, F.; SAJEDI, R.H.; KHAJEH, K. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Penaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry**, v. 202, p. 110–115, 2016.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.

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. In: **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, Anais do Congresso, p.163, 1998.

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 Pharmacology Biomedicinal**, v. 28, p. 771-777, 2002.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS pathogens**, v. 8, p.2448

2451, 2012.

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 of Medical and Biological Research**, v.31, p.1163-1170, 1998.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drug. **Life Science**, v.65, p.337-353, 1999.

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**, v. 66, p. 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.

ELEFThERIANOS, I; REVENIS C. Role and importance of phenoloxidase in insect homeostasis. **Journal Innate Immunity**, v.3, p. 28-33, 2011.

ELOFF, J. N. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 355-360, 1999.

EMBRAPA. **Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. Organized by: Mariante, A.S.; Sampaio, M.J.A.; Inglis, M.C.V. Brasília. 2009.

ESTRADA-PEÑA, A.; GARCÍA, Z.; SÁNCHEZ, H. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, n. 4, p. 307-316, 2006.

EVANS, B. A., e ROZEN, D. E. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 2653-2660. 2012

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.



FANTATTO, R. R.; DOMINGUES, L. F.; GIGLIOTI, R.; POLITI, F. A.; MONTANARI JUNIOR, I. ; CHAGAS, A. C. S. A; PIETRO R. C. L. R. **Avaliação do extrato etanólico de *Achyrocline satureioides* sobre o nematódeo *Haemonchus contortus* e o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. In: XXIII Jornadas de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades do Grupo Montevideo, 2015, La Plata. XXIII Jornadas de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades do Grupo Montevideo, 2015.

FANTATTO, RR; POLITI, F. A. S.; SANCHES, G. S.; MONTANARI JUNIOR, I.; CHAGAS, ANA CAROLINA DE SOUZA; PIETRO, R. C. L. R. **Avaliação do óleo essencial e do extrato etanólico de *Achyrocline satureioides* sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus***. Anais Jornada Científica da Embrapa, 2016.

FAO. **Second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture**, Roma. 2010. 370p

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. **Resistance management and integrated parasite control in ruminants: guidelines. Module 1. Ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention.** 2004. p. 25-77.

FARIA, M. R.; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v.43: p.237-256, 2007.

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

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, v. 20, p.163-170, 2004.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v.87, p. 245-254, 1990.

- FURLONG, J. **Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 36). p.5, 2003
- FURLONG, J. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v.27, n.159, p.26-32, 2007.
- FURLONG, J. Poder infestante de larvas de *Boophilus microplus* (ACARI:IXODIDAE) em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, p.635- 640, 1998.
- FURLONG, J.; COSTA-JÚNIOR, L.M. Avaliação da Eficiência da homeopatia e do enxofre extraído do alho (*Allium sativum*) no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, II SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 15º, **Anais [...]**. 2008.
- FURLONG, J.; PRATA, M. C. A. Conhecimento básico para o controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Org.). **Carrapatos: Problemas e Soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. p. 9-20.
- FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?. **A Hora Veterinária**, v.27, p.26-32, 2007.
- FUXA, J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Review of Entomology**, v.32, p.225-251, 1987.
- GANDHI, M.; SANGWAN, V.; KAPOOR, K.K.; DILBAGHI N. Composting of household wastes with and without earthworms. **Environment and Ecology**, v. 15, p. 432–434. 1997.
- GANDHI, N. N. Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 74, n. 6, p. 621-634, jun. 1997
- GARCIA, G. H.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; TORRES, R.; COUSSIO, J.; CAMPOS. R. Antiviral activity of *Achyrocline flaccida* Wein DC aqueous extract. **Phytotherapy Research**. v.9, p. 251-254. 1995.
- GARCIA, G. H.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; CAMPOS, R. Biological and chemical characterization of the fraction with antiherpetic activity from *Achyrocline flaccida*. **Planta Medica**,

v.65, p.343-346, 1999.

GEHRKE, I.T.S. **Estudo fitoquímico e biológico das espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) do RS.** Tese (Tese em Química Orgânica) - UFSM, Santa Maria, RS. 2012.184 p.

GEHRKE, I.T.S. ; NETO, A. T.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C. P.; DA CRUZ, I. B.; SILVA, U. F.; MOREL, A. F. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: BOWMAN, A. S.; NUTTALL, P. A. **Ticks: biology, disease and control.** Cambridge. University Press, 415-416 p. 2008.

GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Recent Advances on Model Hosts**, p. 11-17.2012.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzymology.** 2nd Ed. New York: Macmillan Publishers Inc., 1996.

GOMES, A.; KOLLER, W.W.; BARROS, A.T.M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.41, p.1447-1452, 2011.

GONZALES, J. C., SILVA, N. R., FRANCO, N. **A vida livre do *Boophilus microplus*.** Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. v.3: 21-28. 1974

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. **O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* em bovinos estabulados.** Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, 2: 25 – 34. 1975.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**, 3a ed. Universidade de Passo Fundo, RS. 128p. 2003.

GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH- BING, N. Tick control; an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, p. 427-442. 2004.

GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH- BING, N. Tick control; an industry point of view. **Parasitology**, v. 129: p. 427-442, 2004.

GRAND VIEW RESEARCH, 2020. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-enzymes-market>. Acesso: 15 de março, 2021; Brasil.

GREATTI, V. R.; ODA, F.; SORRECHIA, R.; KAPP, B. R.; SERAPHIM, C. M.; WECKWERTH, A. C. V. B.; PIETRO, R. C. L. R. Poly- $\epsilon$ -caprolactone Nanoparticles Loaded with 4-Nerolidylcatechol (4-NC) for Growth Inhibition of *Microsporium canis*. **Antibiotics**, v. 9, p. 894, 2020.

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, p.150-156, 2014.

GUERRERO, F. D.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.38, p.44-50, 2001.

GUERRERO, F.D. **Acaricide research and development, resistance and resistance monitoring**. In: Biology of Ticks v.2. 2. ed. Edited by Sonenshine, D.E., Roe, R. M. New York, Ny: Oxford University Press. p.353-381, 2014.

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

HAIDO, R. M. T.; E BARRETO-BERGTER, E. Amphotericin B-induced damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 71, p. 91-103, 1989.

HAMID, R.; KHAN, M.A.; AHMAD, M.; AHMAD, M.M.; ABDIN, M.Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S.; Chitinases: An update. **Journal Pharmaceutical Bioallied Science**, v. 5, p. 21-9, 2013.

HARTMEIER, W. **Immobilized biocatalysts: an introduction**. Berlin: Springer Verlag, 1988.

HAYES Jr, W. J. **Pesticides studied in man**. Baltimore/London, Williams and Wilkins, 672 p.,1982.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.; PRAPANTHADARA, L.; JAYAWARDENAL, K. G. I.; RANSON, H. The role of gene slicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal*

Society of London. **Biological Sciences**, v. 353, p.1695-1699, 1998.

HENRISSAT, B. Sequence homology between a beta-galactosidase and some betaglucosidases. **Protein Sequential Data Analysis**. v. 4. 61–62 p. 1991.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicine Chemistry**, v. 5, p. 326-333. 2015.

HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 5260-5266, 2005.

HUYNH, L., et al. Computational approaches to the rational design of nanoemulsions, polymeric micelles, and dendrimers for drug delivery. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 8, p. 20-36, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal2010**. 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. 2020.

INSUA, J. L.; LLOBET, E.; MORANTA, D.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, C.; TOMÁS, A.; GARMENDIA, J.; E BENGOCHEA, J. A. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 3552-3565, 2013.

JONSSON, N. N.; KLAFKE, G.; CORLEY, S. W.; TIDWELL, J.; BERRY, C. M.; KOH-TAN, H. H. C. Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 23, p. 796-810, 2018.

KAAYA, G. P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, p. 913–926, 2000.

KHACHATOURIANS, G. G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: **Human and animal relationships**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1996. 331p.

KOGA, C.; ADATI, N.; NAKATA, K.; MIKOSHIBA, K.; FURUHATA, Y.; TEI, H.; SAKAKI, Y.; KUROKAWA, T.; SHIOKAWA, K.; YOKOYAMA, K.K. Characterization of a novel member of the family, XFGF-20, in *Xenopus laevis*. **Biochemical Biophysical Research. Community**, v. 261, p.756-65, 1999.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in

targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine**, v.1, n.3, p.193- 212, 2005.

KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; BERLITZ, S. J.; CONTRI, R. V.; ALVES, L. R.; HENRIQUE, E. G.; BARREIROS, V. R. M.; GUTERRES, S. S. Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. **International Journal of Cosmetic Science**, v.35, n.1, p.105-111. 2013.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

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, p.133 – 142.1999.

KUNZ, S.E.; KEMP, D.H. Insecticides e acaricides: resistance and environmental. **International des Epizooties**, v.13, p.1249-1286, 1994.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEONARDI, G. R.; MAA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **Internacional Journal Pharma Compounding**., v.3, n.4 p.154-156.2001.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.7, p. 1650-1662, 2008.

LONC, E.; GUZ-REGNER, K.; KIEWRA, D.; SZCZEPAŃSKA, A. Insight into tick biocontrol with special regard to fungi. **Annals of Parasitology**, v. 60, p. 169-177, 2014.

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.

LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, M. Protease degradomics: a new challenge for

proteomics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 7, p. 509-519, 2002.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002.

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.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal Biology Chemical**, v. 193. p.265–275, 1951.

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: **49º Congresso Brasileiro de Química**, Porto Alegre / RS 04 a 08 de outubro de 2009.

MAZIA, R. S.; DE ARAÚJO PEREIRA, R. R.; DE FRANCISCO, L. M. B.; NATALI, M. R. M.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T. Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermoresponsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 1, p. 113–121, 2016.

MELLO, D. R.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Soskin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 157-162, 2006.

MICHELIN, M. **Estudo da glucoamilase e da  $\alpha$ -amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas**. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MINHO, A. P.; DOMINGUES, L. F.; GAINZA, Y. A.; FIGUEIREDO, A; BOLIGON, A A.; DOMINGUES, R; CHAGAS, A. C. S. *In vitro* screening of plant extract on *Haemonchus contortus* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

**Journal of Essential Oil Research**, v. 32, p. 269-278, 2020.

MONTANHA, J. A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S. A. L.; SCHENKEL, E. P.; ROEHE, P. M. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 183-186, 2004.

MORAES, C. K.; SCHARK, A.; VAINSTEIN M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathology and acaricid *Methahizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v 46, p. 205-210, 2003.

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

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 80-88, 2004.

NICARETTA, J. E. **Dinâmica populacional de *Rhipicephalus microplus* em uma região de clima tropical semiúmido**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás 2018.

OAKESHOTT, J. G.; HOME, I.; SUTHERLAND, T. D.; RUSSELL, R. J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**, v.4, p. 1-4. 2003.

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

OUEDRAOGO, R. M. et al. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 103-109, 2003.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases De Látex Vegetais: Propriedades E Aplicações Industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.93-99, 2006.

PATEL, A. K.; SINGH, V. K.; YADAV, R. P.; MOIR, A. J. G.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 675-681, 2010.

PAWLOWSKI, Â.; SANTOS, E. K.; BRASIL, M. C.; CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A.; SOARES, G. L. G. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South**



**African Journal of Botany**, v. 88, p. 198–203, 2013.

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

PERICH, M. J. A.; KARDEC, I. A.; BRAGA, I. F.; PORTAL, R.; BURGE, B. C.; ZEICHNER, W.; BROGDON, A.; WIRTZ, R. A. Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vectors in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology** v.17, p. 205– 210, 2003

PERRAKIS, A.; TEWS, I.; DAUTER, Z.; OPPENHEIM, A. B.; CHET, I.; WILSON, K. S.; VORGIAS, C. E. **Structure**, v.2, p. 1169, 1994.

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

PETROS, R.A.; DESIMONE, J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**,v. 9, p. 615-627, 2010.

PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S. D.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K. D.; CARVALHO, V. F. M.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 249-259, 2008.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.A. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v.160, p.151-157, 2005a.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, SALLY-ANN. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.5, p. 276-284, 2005b.

POLITI, F. A. S.; SOUZA, A. A.; FANTATTO, R. R.; PIETRO, R. C. L. R.; BARIONI, W.; RABELO, M. D.; BIZZO, H. R.; SOUZA-CHAGAS, A. C.; FURLAN, M. Chemical composition and in vitro anthelmintic activity of extracts of *Tagetes patula* against a multidrug-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **Chemistry e Biodiversity**, v. 15, p.170-180, 2018.

PORTO, A. S.; DE ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsões

formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. **Revista Fitos**, v. 14, p. 513-527, 2020.

PRETEL, A. G.; PULGAR, H. P.; OLMEDA, A. S.; GONZALEZ-COLOMA, A.; BARRERO, A. F.; QUILEZ DEL MORAL, J. F. Novel insect antifeedant and ixodidal nootkatone derivatives. **Biomolecules**, v. 26, p. 1-6. 2019.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A.C.; GARCIA, M.V.; SOARES, V.E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 855-861, 2005.

PUCHETA DIAZ, M.; FLORES MACIAS, A.; RODRIGUEZ NAVARRO, S.; DE LA TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciência**, v. 31, p. 856- 860, 2006.

RAMANUJAM, B.; RANGESHWARAN, R.; SIVAKMAR, G.; MOHAN, M.; YANDIGERI, M. S. Management of insect pests by microorganisms. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, p. 455-471, 2014.

RANGASAMY, M. Nano Technology: A Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 2, p. 08-16. 2011.

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

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

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* telemorphs. **Mycologia**, v.97, p. 84-98, 2005.

REIS, F. S.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. D. C.; DA PENHA, T. A.; TEIXEIRA, W. C.; DOS SANTOS, A. C. G. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, estado do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de**

**Parasitologia Veterinária**, v.17, p. 69-74, 2008.

RETTA, D.; DELLACASSA, J.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, A. L.; BANDONI, A. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Industrial Crops Products**, v. 38, p. 27-38, 2012.

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.; GERVAZ, E.; SERE, C.; DAJAS, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 359-362, 2004.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. **The effect of selection pressure on the genotype and phenotype of acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. PhD Thesis University of Liverpool, p. 189. 2008.

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.

ROMAO, R.; MARTINELLI, G.; CREPALDI, I.; MARTINEZ-LABORDE, J.B. Brazilian biodiversity for ornamental use and conservation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.15: p.100-105, 2015.

ROSSINI, C.; MENEDEZ, P.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *Schinus lentiscifolius* of Uruguayan origin. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 71-73, 1996.

ROT, A.; GINDIN, G.; MENT, A.; MISHOUTCHENKO, L.; GLAZER SAMISH, L. On-host control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) by *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 229–37, 2013.

SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC<sub>50</sub> and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 53-62, 2001.

SABINI, M.C.; CARIDDI, L.N.; ESCOBAR, F.M.; MANAS, L.; COMINI, E.; REINOS, S.B.; SUTIL, A.C.; ACOSTA, S.; NUNEZ MONTOY, M.S.;

CONTIGIANI, S.M.; ZANON, L.; SABINI, I. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food Chemical Toxicology**, v.60, p.463-470, 2013.

SAID, S.; PIETRO, R. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. In: SAID, S.; PIETRO, R. (Ed.). *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, v.2, 2014. p.1-6

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. **Phase inversion in p-xylene water emulsion with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate** (Span20/Tween20). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Amsterdam, v. 218, p. 241-254, 2003

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 389-403, 2004.

SAMISH, M.; GLAZER, J. Killing ticks with parasitic nematodes of insects. **Journal Invertebrated Pathology**, v.58, p.281-282, 1991.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Produção de enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351- 362.

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.

SANTOS, E. **Produção e avaliação das aplicações de enzimas quitinolíticas e queratinolíticas**, Tese (Doutorado) Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2011, Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; SILVA, A.G.; TEIXEIRA, C.A.D.; ALPIREZ, I.P.V.; FACUNDO, V.A. Composição química e atividade inseticida do extrato acetônico de *Piper alatabaccum* Trel e Yuncker (Piperaceae) sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, p.332-336, 2013

SAUPE, A. C. **O chá de macela *Achyrocline satureioides* (Lam) D C no controle do pulgão verde *Myzus persicae* em cultivo protegido: uma**

**alternativa aos agrotóxicos.** Florianópolis, 2003. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHENKEL, E.P.; GERHARD, R.; MANNS, D.; FALKENBERG, M. B.; MATZENBACHER, N. I.; SOBRAL, M.; MENTZ, L. A.; BORDIGNON, A.; HEINZMANN, L. Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 191-196, 2002.

SEIFERT, G. W.; SPRINGELL, P. H.; TATCHEL, I R.J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Parasitology**. v. 58, p. 415-430.1968.

SHEN, H. B.; CHOU, K. C. Identification of proteases and their types. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 153–160, 2009.

SiBBR, **Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR)**. Disponível em: <https://www.sibbr.gov.br/page/infografico.html>. Acesso em 15 de outubro de 2019.

SILVA, T.P.P.; MOREIRA, J.C.; PERES, F. Are tick medications pesticides? Implications for health and risk perception for workers in the dairy cattle sector. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 17, p.311-325. 2012.

SILVA; S.; AMSTALDEN, M. J.; VALADARES, M. C. **The state of Brazil's plant genetic resources**, Embrapa Technological Information, Brasília, DF. 2009.

SIMÕES, C. M. O. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. **Fitoterapia**, v. 54, p. 419-421.1988.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela)**. Porto Alegre, 186p. Dissertação de Mestrado em Farmácia, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande de Sul, 1984.

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.

SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Mercado Brasil 2017 e Anuário, 2018.** Disponível em: <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2017/>. Acesso em: 26 out. 2020.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal, 2010. **Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal**, 2009. Disponível em: Acessado em: 12 jul. 2020.

SINGH, J. S.; KOUSHAL, S.; KUMAR, A.; VIMAL, S. R.; GUPTA, V. K.. Book review: microbial inoculants in sustainable agricultural productivity-Vol. II: functional application. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.2105, 2016.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v.95, p. 173-183, 2004.

SOUSA, L. A.D.; PIRES JUNIOR, H. B.; SOARES, S. F.; FERRI, P. H.; RIBAS, P.; LIMA, E. M.; FURLONG, J.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, P. W. M.; BORGES, L. M. F. Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 320-324. 2011.

SOUTHAM, C. M.; EHRLICH, J. Effects of Extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. **Phytopathology**, v.33, p.517-524, 1943.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH Is a Major Determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 709-713. 1998.

ST. LEGER, R.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; RIZZO, N.; ROBERTS, D. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 907-912. 1996.

SUN M, REN Q, GUAN G, LI Y, HAN X, MA C, YIN H, LUO J. Effectiveness of *Beauveria bassiana sensu lato* strains for biological control against

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. **Parasitology International**. v. 62, p. 412-415. 2013.

SUTHERST, R. W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN, D. A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.34, p.317-327.1983

TORRES, F. C.; LUCAS, A. M., V.; RIBEIRO, V. L. S.; MARTINS, J. R.; POSER, G. V.; GUALA, M. S.; ELDER, H. V.; CASSEL, E. Influence of essential oil fractionation by vacuum distillation on acaricidal activity against the cattle tick. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, p.613-621. 2012.

TORRES-MARTÍNEZ, S.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. The RNAi universe in fungi: a varied landscape of small RNAs and biological functions. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 371-391, 2017.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TURK, B. Targeting proteases successes, failures and future prospects. Nature Reviews. **Drug Discovery**, v.5, p. 785-799, 2006.

URBAN, M.C.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona. 2004.** 136p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; LEITAO, A. C.; HENRIQUES, J. A.P. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureoides* in prokaryotic organisms. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 240, p. 13-18.1990.

VASCONCELLOS, J. S.P.; FERNANDES, F.; CADORE, G. C.; RATZLAFF, F. R.; FELIPETTO, L. G.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A.; SANGIONI, L. A. Atividade acaricida de diferentes solventes sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *Rhipicephalus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 38, p. 1125-1129. 2018.

VATSYA, S.; YADAV.; KUMAR, R. R.; BANERJEE. *In vitro* acaricidal effect of some medicinal plants against *Boophilus microplus*. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 141-143. 2006.

VEGA, F. E.; MEYLINGY, N. V.; LUANGSA-ARD, J. J.; BLACKWELLZ, M. Fungal Entomopathogens. Chapter 6. **Insect Pathology**. Elsevier, 2012.

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.

VERÍSSIMO, C. J.; OTZUK, I. P.; DEODATO, A. P.; LARA, M. A. C.; BECHARA, G. H. Infestação por carrapatos *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em vacas das raças Gir, Holandesa e mestiça sob pastejo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 87-89, 2002.

VERÍSSIMO, C. J. **Controle de carrapato nas pastagens**. Instituto de Zootecnia. Nova Odessa, São Paulo, 99p, 2013. Disponível em: <http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1392745090.pdf>. Acesso em: 11/01/2021.

VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. 2005. Tese de Doutorado.

WADHER, K. J.; KAKDE, R. B.; UMEKAR, M. J. Formulation os sustained release metformin hydrochloride matrix tablets: Influence of hidrophilic polymers on the release rate and in vitro evaluation. **International Journal of Research in Controlled Release**, v. 1, p. 9-16, 2011.

WANG C, ST. LEGER, RJ. The MAD1adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**, v.6, p. 808–816, 2007.

WOLSTENHOLME, A. J. Glutamate-gated chloride channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40232-40238, 2012.

XIAO, G.; YING, S.-H.; ZHENG, P.; WANG, Z.-L.; ZHANG, S.; XIE, X.-Q. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Science Report**. v.2, p.483. 2012.

ZIMMERMANN, G. Review of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553-596, 2007a.



ZIMMERMANN, G. Review of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, v.17, p. 879-920. 2007.