



Universidade Federal do Maranhão

Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

**Atividade repelente e carrapaticida de extratos e óleos essenciais
de plantas sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus***

Aldilene da Silva Lima

Chapadinha

2014

Aldilene da Silva Lima

Atividade repelente e carrapaticida de extratos e óleos essenciais de plantas sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Livio Martins Costa Júnior

Chapadinha

2014

Lima, Aldilene da Silva

Atividade repelente e carrapaticida de extratos e óleos essenciais de plantas sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* / Aldilene da Silva Lima - Chapadinha: MA, 2014.

80 f.: il.

Orientador: Livio Martins Costa Júnior

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, 2014.

1. Produtos Naturais 2. Compostos Ativos 3. Controle 4. Repelência

CDU: 595-7

Aldilene da Silva Lima

Atividade repelente e carrapaticida de extratos e óleos essenciais de plantas sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Livio Martins Costa Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof^a. Dr^a. Ligia Miranda Ferreira Borges
1º Examinador
Universidade Federal de Goiás - UFG

Prof^a. Dr^a. Alexandra Martins dos Santos Soares
2º Examinador
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

“A paciência é a fortaleza do débil e a impaciência, a debilidade do forte”

Immanuel Kant

Dedico este trabalho a minha mãe Raimunda, pela força e pelo grande apoio durante este período e as minhas irmãs Raelly, Antonia e Eloene pelo amor, carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado à oportunidade de existir.

Ao meu Orientador professor Dr. Livio Martins Costa Júnior pelo apoio nas horas difíceis e alegres, pela amizade, e por toda a ajuda durante a minha formação profissional.

As minhas irmãs Raelly da Silva Lima, Antonia Silva Lima e Eloene Silva Rodrigues, por seu amor, amizade e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas de laboratório, Jorgianne Furtado de Carvalho, José Gracione do N. Sousa Filho, Joseane Rodrigues Sousa, Suzana Gomes Lopes, Sebastião Ferreira Neto, Lilyan Bruna Gomes Barros, Itala Caroline Pereira D. Lobo e Giselle Cutrim de Oliveira que tanto contribuíram de forma direta ou indiretamente para execução deste projeto, em resumo a todos do L.P.A. – Laboratório de Parasitologia Animal.

A CAPES pelo apoio financeiro da minha bolsa e do projeto

Ao Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão que muito contribuiu com minha formação e desenvolvimento do trabalho.

Muitíssimo Obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
BIBLIOGRAFIA.....	16
CAPÍTULO 1.....	21
INTRODUCTION.....	22
MATERIALS AND METHODS.....	23
DISCUSSION.....	24
RESULTS.....	24
REFERENCES.....	26
CAPÍTULO 2.....	28
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
Coleta de Plantas.....	31
Extração e Análise do óleo essencial.....	31
Preparação dos Carrapatos.....	32
Teste de Repelência.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	36
CAPÍTULO 3.....	47
INTRODUÇÃO.....	49
METODOLOGIA.....	50
Óleos essenciais e identificação dos compostos.....	50
Obtenção dos carrapatos.....	50
Teste de Repelência.....	51
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAG - Banco Ativo de germoplasma
CL – Concentração Letal
CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa
CG-DIC - Cromatografia Gasosa acoplada a detector de ionização em chama
CG/EM – Cromatografia acoplada a espectroscopia de massa
Cm - Centímetro
Da – Dalton
DMSO – Dimetilsulfóxido
DEET - N-Diethyl-meta-toluamida
eV - Elétron-volt
g - Grama
LA – *Lippia alba*
mm – Milímetro
mL - Mililitro
mg/ml – Miligrama/ mililitro
ssp – Espécies
UFS – Universidade Federal de Sergipe
var - Variedade

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Aparato utilizado para a realização do teste de repelência segundo Mawela et al., 2008.....	41
FIGURA 2: Percentual de repelência de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> do óleo essencial de diferentes genótipos de <i>Lippia alba</i> e DEET.....	44
FIGURA 3: Percentual de repelência de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> das diferentes concentrações dos óleos essenciais dos genótipos LA-13 (A) e LA-57 (B) de <i>Lippia alba</i> e DEET.....	45
FIGURA 4: Percentual de repelência de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> de monoterpenos e DEET.....	46

RESUMO

O *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita de maior importância econômica à bovinocultura. O controle do carrapato bovino tem sido dificultado pela resistência de populações aos acaricidas sintéticos. Compostos bioativos de plantas podem ser uma alternativa para o controle deste ectoparasita. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito repelente e carrapaticida de extratos e óleos essenciais de plantas sobre o carrapato bovino *R. microplus*. Extratos da planta *Piper tuberculatum* foram obtidos com hexano, éter etílico, etanólico e metanólico. Depois todos os extratos foram rotoevaporado. Os óleos essenciais de *Lippia alba* foram obtidos por hidrodestilação, os de *Citrus* ssp. por prensagem a frio dos frutos e todos os componentes dos óleos essenciais foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). Os monoterpenos utilizados foram obtidos comercialmente. Todos os extratos foram utilizados no teste de larvas e imersão de fêmeas Ingurgitadas. Os óleos essenciais foram utilizados no teste de repelência. Todos os extratos demonstraram uma alta atividade sobre larvas de *R. microplus*. O extrato Hexânico de frutos de *P. tuberculatum* apresentou uma CL50 de 0,04 mg/mL, seguido de éter etílico com CL50 de 0,08 mg/mL, etanólico com CL50 de 2,73 mg/mL. O extrato éter etílico de frutos de *P. tuberculatum* também demonstrou uma alta atividade sobre fêmeas Ingurgitadas. Os genótipos LA-13 e LA-57 de *Lippia alba* apresentaram uma alta atividade repelente sobre larvas de *R. microplus* por mais de 40 horas numa concentração de 6,88 mg/cm². Os monoterpenos apresentaram baixa atividade repelente. O óleo essencial de *Citrus aurantium* var. *dulcis* apresentou uma alta atividade repelente com mais de 30 horas de repelência na concentração de 6,88mg/cm². Os demais óleos testados apresentaram um tempo de repelência menor que 5 horas. Nossos resultados demonstraram que as plantas possuem compostos ativos com alto potencial acaricida, e que podem vir a serem utilizados em produtos de uso comercial para o controle do carrapato bovino.

Palavras-chave: Produtos Naturais, compostos ativos, controle, Repelência.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is an ectoparasite of major economic importance to cattle. The control cattle tick has difficult by resistance of populations to synthetic acaricides. Plant bioactive molecules can be an alternative to control this ectoparasite. The aim of this study was to evaluate the repellent and acaricide effect of extracts and essential oils from plants on the cattle tick *R. microplus*. Hexane, ethyl ether, ethanolic, and methanolic extracts was obtained of *P. tuberculatum* fruits. After extraction, all of the extracts were dried. Essential oil from *L. alba* was obtained by hydrodistillation, all oil essential of *Citrus* ssp. were extracted by cold pressing fruits and all the identification of the major compounds of essential oils was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography flame ionization detector (GC-FID). Monoterpenes was obtained commercially. All the extracts was use larval packet tests and Adult immersion tests. Oil essential was used to repellency test. All extracts showed highest larvicidal activity against *R. microplus*. Hexane extract showed a CL50 of 0.04 mg/mL, CL50 ethyl ether of 0.08 mg/mL and ethanolic LC50 of 2.73 mg/mL. *P. tuberculatum* fruit extracts were also effective against engorged females *R. microplus*. Genotypes LA-13 and LA-57 of *L. alba* showed repellent activity against larvae of *R. microplus* more than 40 hours at concentration of 6.88 mg/cm². Monoterpenes showed lower repellent activity. Oil essential of *Citrus aurantium* var. *dulcis* showed repellent activity more than 30 hours at concentration of 6.88 mg/cm². Other essential oils tested showed a time of repellency lower 5 hours. Ours results reported than plants contains bioactive compounds with great potential acaricides, and they can be commercial products for the control of *R. microplus*.

Key-words: Natural Products, active compounds, control, repellency

INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* constitui-se um dos maiores problemas parasitários enfrentados pela pecuária bovina. Os prejuízos econômicos causados por este carrapato, ultrapassar os 2 bilhões de dólares (Alonso, 1992; Grisi et al., 2002). Os danos ocasionados pelo carrapato são visualizados diretamente na diminuição da produção de leite e carne, além de serem responsáveis pela transmissão agentes infecciosos (*Babesia* spp. e *Anaplasma* spp.) (Rodriguez-Vivas et al., 2004; Sousa, 2008; Madder, et al., 2011).

O controle do carrapato bovino é geralmente realizado utilizando acaricidas sintéticos. O manejo inadequado, uso de formulações caseiras e utilização indiscriminada (Furlong et al., 1996; Furlong; Prata, 2006) vêm acelerando a seleção de carrapatos resistentes aos princípios ativos disponíveis comercialmente (Oliveira, 1999; Graf et al., 2004).

A resistência de populações de carrapatos as bases sintéticas tem aumentado ao ponto da maioria dos acaricidas sintéticos apresentarem eficiência inferior a 75% (Graf et al., 2004). Estes acaricidas sintéticos deixam resíduos nos produtos de origem animal, causam a contaminação do ambiente, e provocam transtornos à saúde do homem (Pereira; Farmadas, 2004). Com o aumento da resistência a drogas antiparasitárias, a indústria tem hesitado em investir na pesquisa de novos produtos químicos, promovendo assim a busca por alternativas aos produtos sintéticos (Chagas, 2002). Produtos de origem vegetal possuem vantagens como suprimento sustentável, baixo custo, e maior biodegradabilidade (Heimerdinger, 2005). O uso de produtos de origem vegetal de uma forma isolada ou associada pode provocar um desenvolvimento bem mais lento da resistência de populações de insetos e ácaros (Broglio-Micheletti, 2009; Borges et al., 2003).

Os compostos de plantas tem se tornado uma interessante perspectiva como alternativa ao uso de produtos químicos para o controle do carrapato bovino (Schenkel et al., 2001;

Lebouvier et al., 2013). Uma variedade de plantas distribuídas por diversas partes do mundo são conhecidas por sua atividade repelente e acaricida (Kaaya, 2000).

A família Piperaceae é amplamente distribuída em regiões tropicais e sub tropicais do mundo. Plantas dessa família apresentam um enorme valor econômico, comercial e medicinal (Rodrigues et al., 2009). Estudos químicos realizados em algumas espécies do gênero *Piper* demonstraram que elas possuem uma grande diversidade de compostos secundários com ação biológica (Navickiene, 2003). No Brasil, o gênero é largamente utilizado em comunidades para fins medicinais (Trindade et al., 2012; Felipe et al., 2007). A espécie *Piper tuberculatum* tem sido usada como anticâncer, anti pirético, anti diurético, inseticida e carrapaticida (Park et al., 2002; Felipe et al., 2007; Trindade et al., 2012).

As atividades biológicas desta espécie têm sido atribuídas à presença de lignina e amidas tal como piperina, flavonóides, kawalactonas, butenólidos, epóxidos de ciclohexano, e outros. As amidas representam o principal grupo de metabólitos secundários, responsáveis pela atividade inseticida (Parmar et al., 1997).

Plantas do gênero *Lippia* compreendem cerca de 250 espécies de plantas distribuídas na América do Sul e na África (Aguiar; Costa, 2005). A espécie *Lippia alba* é uma planta aromática, que apresenta uma grande variabilidade química e ação farmacológica (Heldwein et al., 2012). Suas propriedades medicinais (analgésica, anti inflamatória, anti convulsante e tranquilizante) são conhecidas desde 1982 (Aguiar 2006; Saad et al., 2009; Hennebelle et al., 2008). Plantas desta família apresenta um grande valor comercial para indústrias farmacêuticas, aromáticas e perfumes, além de apresentarem moléculas promissoras para serem utilizadas em produtos químicos agrícolas (Yamamoto et al., 2008).

O óleo essencial de *L. alba* apresenta em sua composição diferentes tipos de carvona e citral (Abreu Matos et al., 1996) que podem servir como repelentes. A atividade biológica

pode ser afetada pela variação dos constituintes majoritários, que existe entre os três diferentes quimiotipo de *L. alba* (Saad et al., 2009).

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae com aproximadamente 16 espécies distribuídas em regiões subtropicais. É um gênero que tem como centro de origem o sudeste da Ásia, especialmente o leste da África (Fisher; Phillips, 2008). Espécies deste gênero são consideradas importantes culturas frutíferas em todo o mundo por fornecer vitaminas, minerais, pectinas e fibras para o corpo humano, mas também são conhecidas por apresentar importância fitoquímica com a presença de flavonoides e ácidos fenólicos em sua constituição, além de apresentar diversas propriedades biológicas (Aruoma et al., 2012).

O óleo essencial dos *Citrus* ssp. contém de 85 a 99% dos seus constituintes voláteis e 1 a 15% de componentes não voláteis. O óleo essencial desta planta caracteriza-se com uma predominância de uma mistura de monoterpenos principalmente limoneno com 32 a 98% (Borgmann et al., 2004; Fisher; Phillips, 2008).

Pesquisas sobre o efeito potencial acaricida e repelente de planta tornam-se fontes imprescindíveis de estudo no intuito de disponibilizar novos compostos ativos e desenvolver alternativas para o controle do carrapato *R. microplus*. Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade repelente e carrapaticida de extratos e óleos essenciais de plantas sobre o carrapato bovino *R. microplus*. Assim, essa dissertação esta dividida em três capítulos:

- Capítulo 1: A atividade carrapaticida de extratos de frutos de *Piper tuberculatum* sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Este capítulo foi publicado no periódico **Parasitology Research**, v. 113, p. 107-112, 2014.
- Capítulo 2: A atividade repelente de diferentes genótipos de *Lippia alba* sobre larvas de *R. microplus*. Este capítulo será submetido ao periódico **Parasitology Research**.

- Capítulo 3: Efeito repelente de óleos essenciais de *Citrus* ssp. sobre larvas de *R. microplus*. Este capítulo será submetido ao periódico **Bioresources Technology**.

BIBLIOGRAFIA

ABREU MATOS, F. J.; LACERDA MACHADO, M. I.; ARAGAO CRAVEIRO, A.; WILSON ALENCAR, J. **Essential oil composition of two chemotypes of *L. alba* grown in Northeast Brazil**. Journal of Essential Oil Research, v.8, p.695–698, 1996.

ALONSO, M.; ARELLANO-SOTA, C.; CERESER, V. H.; CORDOVES, C. O.; GUGLIELMONE, A. A.; KESSLER, R.; MANGOLD, A. J.; NARI, A.; PATARROYO, J. H.; SOLARI, M. A. et al. **Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean**. Review Science Technology. V.11, p.713–733, 1992.

AGUIAR, J. S.; COSTA, M.C.C.D. ***Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae): Levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.8, p.79–84, 2005.

AGUIAR, J. S. **Atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiin-flamatória de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**. Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade de Pernambuco, Recife, 2006.

ARUOMA, O. I.; LANDESB, B.; RAMFUL-BABOOLALL, D.; BOURDOND, E.; NEERGHEEN-BHUJUNE, V.; KARL-HEINZ, W.; BAHORUNG, T. **Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes**. Preventive Medicine, v.54, 2012.

BORGES, L.M.; FERRI, P. H.; SILVA, W.J.; SILVA, W.C.; SILVA, J.C. **In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus***. Medical and Veterinary Entomology, v.172, p.28–31, 2003.

- BORGMANN, S.; NIKLAS, D.M.; KLARE, I.; ZABEL, L.T.; BUCHENAU, P.; AUTENRIETH, I. B. et al. **Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit.** International Journal of Hygiene and Environmental Health, v.207, n.4, p.386-389, 2004.
- BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; DIAS, N.S.; ARAUJO, A.M.N. **Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório.** Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria, v. 18, p. 44-48, 2009.
- CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. **Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
- FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; LEITE, R. C. **Diagnóstico "in vitro" da sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus*. Projeto de pesquisa.** Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 11p.
- FURLONG, J.; PRATA, M. **Controle estratégico do carrapato dos bovinos de leite.** Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 2006. 2 p. (Circular Técnica, 38).
- FELIPE, F.C.B.; SOUZA FILHO, J.T.; SOUZA, L.O.E.; SILVEIRA, J.A.; UCHOA, D.E.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; VIANA, G.S.B. **Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice.** Phytomedicine, v.14, p.:605–612, 2007.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. **Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?.** Trends in Food Science & Technology, v.19, 2008.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. **Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil.** A Hora Veterinária. v. 125, p. 8-10, 2002.

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

HEIMERDINGER, A. **Extrato Alcoólico de Capim-Cidreira (*Cymbopogon citratus*) no Controle do Carrapato (*Boophilus microplus*) de Bovinos Leiteiros.** Dissertação de Mestrado. p.1-78, 2005.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. **Ethnopharmacology of *Lippia alba*.** Journal of Ethnopharmacology, v.116, p.211–222, 2008.

HELDWEIN, C. G.; SILVA, L.L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F.M. C.; BURGUER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, M. A.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M. **Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.45, p. 436-443, 2012.

KAAYA, G.P. **The potential for antitick plants as components of an integrated tick control strategy.** Annals of the New York Academy of Sciences, v.916, p. 576–582, 2000.

LEBOUVIER, N.; HUE, T.; HNAWIA, E.; LESAFFRE, L.; MENUT, C.; NOUR, M. **Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Parasitology Research, 112:1379–1384, 2013.

MADDER, M.; THYS, E.; ACHI, L.; TOURE, A.; DEKEN, R. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: a most successful invasive tick species in West-Africa***. Experimental and Applied Acarology, v.53:139–145, 2011.

NAVICKIENE, H. M.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; PEREIRA, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANCA, S. C.; FURLAN, M. **Quantitative Determination of Anti-fungal and Insecticide Amides in Adult Plants, Plantlets and Callus from *Piper tuberculatum* by Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography**. Phytochemical Analysis, v.14, p.281-284, 2003.

OLIVEIRA, P.R. **Resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) a carrapaticidas em bovinos de leite da região da zona da mata de Minas Gerais**. Mestrado em Ecologia Animal, UFJF, 1999.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TUAGI, O.D.P.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLESEN, C.E.; BOLL, P.M. **Phytochemistry of the genus *Piper***. Phytochemistry, v.46, p. 597-673, 1997.

PARK, I.K.; LEE, S.G.; SHIN, S.C.; PARK, J.D.; AHN, Y.J. **Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p.1866–1870, 2002.

PEREIRA, J. R. e FAMADA, K. M. **Avaliação "in vitro" da Eficiência do Extrato da raiz do Timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (Leguminosae, Papilionoidae, Millettidae) sobre *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) na Região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil**. Arquivos do Instituto Biológico, v.71, n.4, p.443-450, 2004.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; MATA, M.Y.; PÉREZ, G.E.; WAGNER, G. **The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics**. Tropical Animal Health and Production, v.36, p.135–143, 2004.

RODRIGUES, R.V.; LANZMASTER, D.; LONGHI BALBINOT, D.T.; GADOTTI, V. M.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, A.R.S. **Antinociceptive Effect of Crude Extract, Fractions and Three Alkaloids Obtained from Fruits of *Piper tuberculatum***. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, n.10, p.1809-1812, 2009.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001, p. 301-332.

SOUSA, L.A.D. **Concentrado emulsionavel de *Melia azedarach* (meliaceae) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae)**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal - Universidade Federal de Goiás, 2008.

SAAD, G.A.; LÉDA, P.H.O.; SÁ, I.M.; SEIXLACK, A.C.C. **Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica**. Elsevier, p. 31–59, 2009.

TRINDADE, F.T.T.; STABELI, R.G.; FACUNDO, V.A.; CARDOSO, C.T.; SILVA, M.A.; GIL, L.H.S.; SILVA-JARDIM, I.; SILVA, A.A. **Evaluation of larvicida activity of the methanolic extracts of *Piper alatabaccum* branches and *Piper tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi***. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22:979–984, 2012.

CAPÍTULO 1

Acaricide activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*

Artigo publicado no Periódico *Parasitology Research*, v. 113, p. 107-112, 2014.

Acaricide activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*

Aldilene da Silva Lima · José Graciano do Nascimento Sousa Filho ·
Sinval Garcia Pereira · Giselle Maria Skelding Pinheiro Guillon ·
Lourivaldo da Silva Santos · Livio Martins Costa Júnior

Received: 4 August 2013 / Accepted: 1 October 2013 / Published online: 13 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract *Rhipicephalus microplus* is the main tick that affects cattle. Plant bioactive molecules can be used to control this ectoparasite. The aim of this study was to evaluate the in vitro efficacy of *Piper tuberculatum* fruit extracts obtained with different solvents on *R. microplus* larvae and engorged females. Hexane, ethyl ether, ethanolic, and methanolic extracts of *P. tuberculatum* fruits were evaluated. After extraction, all of the extracts were dried. Adult immersion tests and larval packet tests were performed with five different concentrations of each of the extracts. The hexane extracts of *P. tuberculatum* showed the highest larvicidal activity against *R. microplus* (lethal concentration (LC₅₀)=0.04 mg/mL), followed by the ethyl ether (LC₅₀=0.08 mg/mL), ethanolic (LC₅₀=2.73 mg/mL), and methanolic (LC₅₀=4.49 mg/mL) extracts. The *P. tuberculatum* fruit extracts were also effective against *R. microplus*-engorged females. Ethyl acetate extracts showed the highest efficiency (LC₅₀=18.4 mg/mL), followed by the methanolic (LC₅₀=105.6 mg/mL), ethanolic (LC₅₀=140.0 mg/mL), and hexane (LC₅₀=297.4 mg/mL) extracts. All of the extracts showed similar chromatographic profiles containing 24 % piperine. The *P. tuberculatum* fruit extracts contain bioactive compounds with great potential to improve the standard formulations of acaricides for the control of *R. microplus*.

Introduction

Rhipicephalus microplus is the most common tick that affects cattle in tropical and subtropical regions (Dominguez-García et al. 2010; Gazim et al. 2011). The main effects of this parasite are weight reduction, decreased milk production, and transmission of pathogens (Alonso et al. 1992; Olivo et al. 2008). *R. microplus* is generally controlled with synthetic acaricides, but indiscriminate use is selected for resistant ticks to the active compounds currently available on the market (Rodríguez-Vivas et al. 2006; Castro-Janer et al. 2010; Miller et al. 2013). Resistance has decreased the efficiency of acaricides in many countries to the point that some chemicals have no effect greater than 75 % (Graf et al. 2004).

The use of plants is an alternative to synthetic chemicals for tick control (Schenke et al. 2001; Ribeiro et al. 2008; Apel et al. 2009; Schmahl et al. 2010; Lebouvier et al. 2013). The natural products degrade quickly in the environment and resistance to these compounds develops at a slower rate compared to synthetic acaricides (Hernández et al. 1987; Gupta et al. 2000; Borges et al. 2003). Plants from the Piperaceae family are widely distributed through the tropical and subtropical regions of the world. The main genus of this family is the genus *Piper*, with approximately 700 species around the world (Lopes et al. 2012; Trindade et al. 2012). The genus *Piper* has economic, medical, and commercial uses. In folk medicine, *Piper tuberculatum* has been used as an antidiuretic, anticancer, antipyretic, and expectorant (Park et al. 2002; Felipe et al. 2007).

Extracts of the leaves of *P. tuberculatum* have been used as insecticides (Trindade et al. 2012) and anti-feeds against insects (Castro et al. 2008), and essential oils have been used as acaricides (Chagas et al. 2012). However, no studies have evaluated the use of *P. tuberculatum* fruit extracts against ticks. Acaricide efficiency can vary according to the method of extraction, solvent polarity, and the plant part used in the

A. da Silva Lima · J. G. do Nascimento Sousa Filho ·
S. Garcia Pereira · L. M. Costa Júnior (✉)
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do
Maranhão, Chapadinha, Brazil
e-mail: livioslz@yahoo.com

S. Garcia Pereira · G. M. Skelding Pinheiro Guillon ·
L. da Silva Santos
Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do
Pará, Belém, Brazil

extraction (Silva et al. 2009; Rosado-Aguilar et al. 2010; Ravindrana et al. 2011). Thus, the purpose of this study was to evaluate the in vitro acaricide activity of *P. tuberculatum* fruit extracts obtained with different solvents on *R. microplus* larvae and engorged females.

Materials and methods

Collection and identification of plant

Fruits from *P. tuberculatum* were collected, dried in a cool and ventilated place, and pulverized in an electric mill (Matos 1988; Cechinel-Filho and Yunes 1998). A voucher specimen was deposited at the Herbarium of Emílio Goeldi museum, Belém, Pará, Brazil, under the number 200417.

Preparation of extracts

Fruits (Fr; 1.866 kg) of *P. tuberculatum* (Pt) were extracted at room temperature using a sequence of solvents of increasing polarity (hexane (H); ethyl ether (EE); and methanol (M)) for 7 days each. The ethanol extract (E) was prepared in a water bath at 60 °C for 2 h (Fig. 1). After extraction, all of the extracts were dried by in a rotary evaporator to obtain the hexane (PtFrH), ethyl ether (PtFrEe), methanolic (PtFrM), and ethanolic (PtFrE) extracts. The extracts were dissolved in 2 % triton prior to testing.

Chemicals analysis

Column chromatography of the fractions was performed with silica gel 60, 70–230 mesh. The comparative thin layer chromatography was carried out in slurry of 30 g of silica gel with a fluorescence indicator. Piperine was then isolated from these partitions according to the methods of Facundo et al. (2008), Cotinguiba et al. (2009), and Xia Li-Zi et al. (2010).

Tick preparation

Engorged *R. microplus* females (≥ 4.5 mm) were collected from artificially infested calves, washed with water, and dried with a paper towel. The engorged females were selected morphologically and used in the adult immersion test (AIT) or maintained in the laboratory at 27 °C and relative humidity ≥ 80 % for 15 days until the eggs were laid. These eggs provided the larvae used for the larval packet test (LPT).

Larval packet test

LPT was performed according to the method described by Stone and Haydock (1962) and modified by FAO (1971) and Leite (1988), as described below. Approximately 100 tick

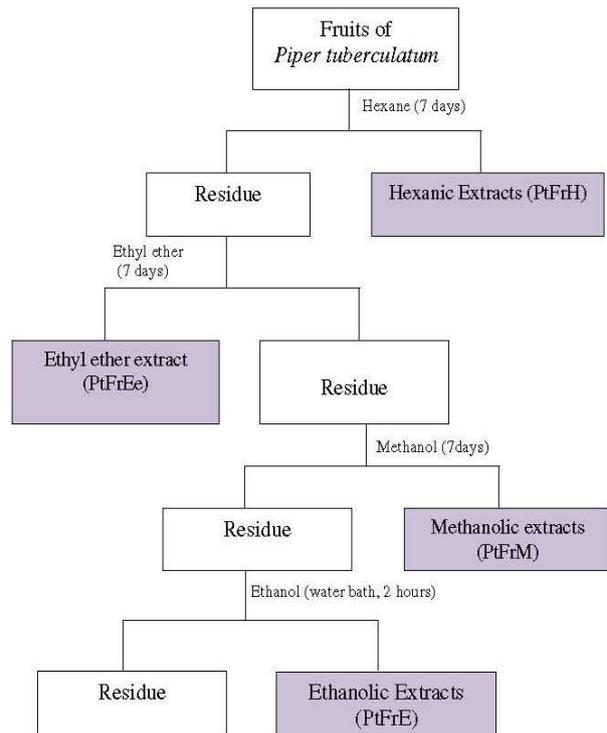


Fig. 1 Methods of preparation of the hexane (PtFrH), ethyl ether (PtFrEe), methanolic (PtFrM), and ethanolic (PtFrE) *Piper tuberculatum* fruit extracts

larvae were placed on one sheet of filter paper and then covered with another sheet, forming a sandwich. The sandwiched filter papers and larvae were then placed in an envelope of folded non-impregnated filter paper (72.25 cm²) and sealed with a plastic clothespin. The envelope was placed in an incubator and maintained at 27±1 °C with relative humidity (RH) ≥ 80 % for 24 h. After this time, alive and dead larvae were counted. Ticks that did not move were considered dead. The experiment was performed with four replicates for each treatment. The tests were performed with 12 concentrations ranging from 0.01 to 20.00 mg/mL of each extract dissolved in 2 % triton X-100. A solution of 2 % triton X-100 was used as a negative control. The lethal concentration (LC₅₀) of each compound against the larvae was calculated using GraphPad Prism 5.0. The extract was considered to be significantly ($P < 0.05$) more (or less) efficient than another extract when there was no overlap between the 95 % confidence limits of the LC₅₀ values (Roditakis et al. 2005).

Adult immersion test

The sensitivity of the engorged *R. microplus* females to each extract was determined using the AIT described by Drummond et al. (1973). Engorged *R. microplus* females were collected from artificially infested calves. Groups of ten engorged female ticks each were individually weighed in order to obtain groups with similar weights.

Each tick group was submerged for 5 min in one of five concentrations of each extract ranging from 5.00 to 75.00 mg/mL in 2 % triton X-100. Triton X-100 (2 %) was used as the negative control. The engorged females were subsequently dried on a paper towel, placed in Petri dishes and maintained in a biochemical oxygen demand incubator at 27 ± 1 °C and RH ≥ 80 % for 15 days for further evaluation of oviposition and hatchability of their eggs.

The egg production index (EPI), the reduction in oviposition, and the efficiency of the extract (EP) were calculated according to the following formulas: EPI = (weight of eggs/weight of engorged female) \times 100 (Bennett 1974); reduction in oviposition = (EPI control group – EPI experimental group/EPI control group) \times 100 (Roulston et al. 1968); reproduction efficiency index (REI) = (egg mass weight \times egg hatching (percentage)/engorged females weight) \times 20,000; and EP = (REI control – REI treated)/(REI control \times 100) (Drummond et al. 1973).

Lethal concentrations were calculated using GraphPad Prism 5.0. Significant differences ($P < 0.05$) between the average efficiency of each pair of extract were considered when there was no overlap between the 95 % confidence limits (CL 95 %) of the LC₅₀ values (Roditakis et al. 2005).

Results

All of the extracts of *P. tuberculatum* fruits were highly effective against the larvae of the tick *R. microplus* (Table 1, Fig. 2). Extracts prepared with solvents with minor polarities had greater larvicidal activity than extracts prepared with higher polarity solvents. PtFrH showed the greatest efficacy (LC₅₀=0.04 mg/mL, CL 95 %=0.02–0.06 mg/mL), followed by PtFrEe (LC₅₀=0.08 mg/mL, CL 95 %=0.07–0.09), PtFrE (LC₅₀=2.73 mg/mL, CL 95 %=2.50–2.90 mg/mL), and PtFrM (LC₅₀=4.49 mg/mL, CL 95 %=3.90–5.00).

The *P. tuberculatum* fruit extracts also demonstrated activity against engorged female ticks (Table 2). The index of egg production and therefore the reduction in oviposition was lower after treatment with 75 mg/mL of PtFrH and PtFrEe. The ethyl acetate extract showed the highest efficiency against engorged females (LC₅₀=18.4 mg/mL, CL 95 %=11.40–29.50), followed by the methanolic extract (LC₅₀=105.6 mg/mL, CL 95 %=66.39–167.80), and the ethanolic extract (LC₅₀=140.0 mg/mL, CL 95 %=133.50–146.80) (Tables 3 and 4).

All of the *P. tuberculatum* fruit extracts showed similar chromatographic profiles. The major constituent after chromatographic separation was piperine, which constituted approximately 24 % of the extract.

Table 1 Efficacy of *Piper tuberculatum* fruit extracts against *Rhipicephalus microplus* larvae

Extract	Concentration (mg/mL)	Mortality (%)
PtFrH	0.12	100.0
	0.06	98.4
	0.05	50.9
	0.03	37.9
	0.01	0.0
PtFrEe	0.25	100.0
	0.12	99.2
	0.08	43.3
	0.06	29.3
	0.03	0.0
PtFrE	8.00	95.7
	6.00	94.7
	4.00	83.9
	2.00	15.7
	1.00	0.0
PtFrM	20.00	100.0
	8.00	96.2
	6.00	70.1
	4.00	48.2
	1.00	0.0

PtFrH hexane extracts, PtFrEe ethyl ether extracts, PtFrM methanolic extracts, PtFrE ethanolic extracts

Discussion

Research on plants that could be used for tick control is conducted with the goal of identifying extracts with acaricidal properties that could be used in association with or as a replacement for synthetic compounds (Borges et al. 2011; Martinez-Velazquez et al. 2011). In this paper, we present the first report of the in vitro efficiency of *P. tuberculatum* fruit extracts on *R. microplus* larvae and engorged females.

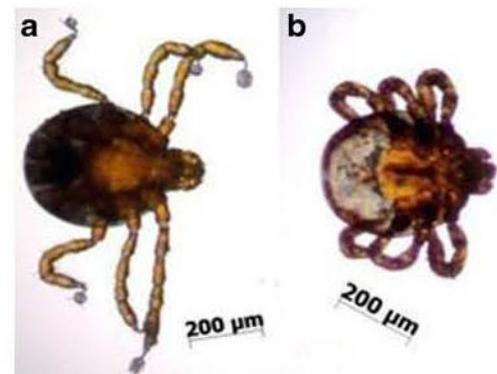


Fig. 2 *Rhipicephalus microplus* larvae after larval packet test, a control and b treated with *Piper tuberculatum* fruit extracts

Table 2 Egg production index, reduction in oviposition, eggs hatching, and efficiency of the extract (EP) from *Piper tuberculatum* fruits in engorged *Rhipicephalus microplus* females

Extract	Concentrations (mg/ml)	Egg productions index (%)	Reduction in oviposition (%)	Eggs hatching (%)	EP (%)
Control	–	54.1	–	92.9	
PtFrH	75	0.0	100.0	0.0	100.0
	50	44.1	13.5	95.7	17.2
	25	45.8	10.0	94.0	15.5
	10	51.1	-0.2	100.0	5.9
	5	48.0	5.9	100.0	0.0
PtFrEe	75	6.4	88.1	30.0	96.2
	50	46.5	14.0	35.0	67.6
	25	49.7	8.1	59.0	41.7
	10	49.0	9.4	63.8	37.8
PtFrE	75	52.5	5.9	78.9	11.4
	50	53.3	4.5	84.8	3.4
	25	55.6	0.4	88.2	0.0
	10	54.4	2.5	90.7	0.0
PtFrM	75	57.5	-3.0	85.5	0.0
	50	44.7	17.5	56.5	50.0
	25	50.3	7.1	67.5	32.6
	10	49.9	7.9	71.3	29.3
	5	53.3	1.5	72.5	23.2
	5	53.6	0.9	81.5	13.1

PtFrH hexane extracts, PtFrEe ethyl ether extracts, PtFrM methanolic extracts, PtFrE ethanolic extracts

P. tuberculatum is widely distributed throughout tropical and subtropical regions and is found in several regions of Brazil (Maia et al. 2001; Facundo et al. 2008). In the Northeast Brazilian communities, it is often used for medicinal purposes, mainly as an analgesic, a sedative, or an antidote for a snake bite (Felipe et al. 2007). The bioactive molecules from this plant have advantages over chemical compounds for tick control, namely, the variety of molecules in the plant may act

Table 3 Lethal concentration of *Piper tuberculatum* fruit extracts against *Rhipicephalus microplus* larvae

Extracts	LC ₅₀	CL 95 %	R ²
PtFrH	0.04 ^a	0.02–0.06	0.83
PtFrEe	0.08 ^b	0.07–0.09	0.92
PtFrE	2.73 ^c	2.50–2.90	0.99
PtFrM	4.49 ^d	3.90–5.00	0.92

PtFrH hexane extracts, PtFrEe ethyl ether extracts, PtFrM methanolic extracts, PtFrE ethanolic extracts, LC₅₀ concentration (mg/mL) at which 50 % of the *R. microplus* larvae died, CL 95 % confidence limits at 95 % probability, R² regression

Different letters between rows indicate difference statistically significant

Table 4 Lethal concentration of different *Piper tuberculatum* fruit extracts against engorged *Rhipicephalus microplus* females

Extracts	LC ₅₀	CL 95 %	R ²
PtFrH*	–	–	–
PtFrEe	18.4 ^a	11.4–29.5	0.78
PtFrE	140.0 ^b	133.5–146.8	0.99
PtFrM	105.6 ^b	66.39–167.8	0.89

PtFrH hexane extracts, PtFrEe ethyl ether extracts, PtFrM methanolic extracts, PtFrE ethanolic extracts, LC₅₀ concentration (mg/mL) at which 50 % of the *R. microplus*-engorged females died, CL 95 % confidence limits at 95 % probability, R² regression

*Not possible to calculate the LC₅₀

Different letters between rows indicate difference statistically significant

synergistically to increase the activity of the compound while also lag the development of resistance in ticks to the extract or compound isolated from the plant (Mgbojikwe and Okoye 2001).

The fruits of species belonging to the Piperaceae family have shown insecticidal action, but there have been no reports of activity against ticks. Here, we show that the hexane extracts of fruits (LC₅₀=0.04 mg/mL) and ethanolic extracts (LC₅₀=0.08 mg/mL) of the fruits of *P. tuberculatum* have high activity against *R. microplus* larvae. The hexane and ethanolic extracts of fruits of *P. tuberculatum* are approximately 50- to 100-fold more active than the extracts from leaves of *P. tuberculatum* evaluated by Chagas et al. (2012) (LC₅₀=0.41 %, ≈4.1 mg/mL) and approximately 60- to 150-fold more active than essential oils made from the leaves of *Piper mikanianum* (LC₅₀=2.33 μL/mL, ≈2.43 mg/ml) and *Piper xylosteoides* (LC₅₀ 6.15 μL/mL, ≈6.44 mg/mL), respectively, evaluated by Ferraz et al. (2010). These data shows that extracts from the fruits of *P. tuberculatum* have higher concentrations of acaricide compounds than leaves of the same species or other species of the genus *Piper*.

We observed a concentration of 24 % piperine in the extracts. Piperine amides have been investigated as models for the development of new insecticides (Scott et al. 2002; Castro 2007). However, isolated piperine showed no activity against *R. microplus* larvae or engorged females (Chagas et al. 2012). The high mortality of larvae and engorged female found in this study may be due to a combination of compounds such as piperines and other secondary amides that potentiate the toxicity of the extract.

The extracts of fruits from *P. tuberculatum* prepared with solvents with low polarity showed higher larvicidal activity than extracts prepared with high polarity solvents. Similar results were obtained with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (Cotinguiba et al. 2009; Regasini et al. 2009) and with extracts of *Piper aduncum* against *R. microplus* (Silva et al. 2009). The differences in the activities of the extracts can be attributed to the presence of different bioactive compounds after the

process of liquid–liquid partitioning with increasingly polar solvents. However, despite the high concentration of piperine in the extracts, the biological activity of some extracts may have been due to compounds present in smaller proportions in the plant. The increased efficiency of piperamides occur when three or more toxic compounds with similar effects are combined (Scott et al. 2002; Navickiene et al. 2007).

Leaf extracts of *P. tuberculatum* are effective against *R. microplus* adults at high concentrations (10 %) and decrease considerably as the concentration decreases (Chagas et al. 2012). In our study, the ethyl ether extract of *P. tuberculatum* fruit was the most effective against engorged females ($LC_{50}=18.4$ mg/mL) and reduced both oviposition and hatchability.

Piplartine and piperine did not show significant effects against engorged *R. microplus* females (Chagas et al. 2012), and the results reported here support the hypothesis that others active substances or a combination of substances can be more effective.

The fruit extract of *P. tuberculatum* contains bioactive compounds with great potential to improve the standard formulation of acaricides for the control of *R. microplus*.

Acknowledgments The authors wish to thank Dr. Alexandra Martins dos Santos Soares for her valuable contribution to the preparation of this manuscript. We also thank CNPq (The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) for awarding a fellowship to L.M. Costa-Júnior, CAPES (Brazilian Federal Agency for support and evaluation of graduate education) and FAPESPA (Pará State Research Foundation) for the scholarship to A.S. Lima and S.G. Pereira, respectively. We also thank CNPq and FAPEMA (Maranhão State Research Foundation) for their financial support.

References

- Alonso M, Arellano-Sota C, Cereser VH, Cordoves CO, Guglielmine AA, Kessler R, Mangold AJ, Nari A, Patarroyo JH, Solari MA, Veja CA, Vizcaino O, Camus E (1992) Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Sci Technol* 11:713–733
- Apel MA, Ribeiro VLS, Bordignon SAL, Henriques AT, Poser GV (2009) Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 105:863–868
- Bennett GH (1974) Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) I. Influence of temperature, humidity and light. *Acarologia* 16:250–257
- Borges LM, Ferri PH, Silva WJ, Silva WC, Silva JC (2003) In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med Vet Entomol* 17:28–31
- Borges LMF, Sousa LAD, Barbosa CS (2011) Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 20:89–96
- Castro MJP (2007) Potencial inseticida de extratos de *Piper tuberculatum* JACQ. (piperaceae) sobre a fase larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). Dissertation, Federal University of Piauí
- Castro MJP, Silva PHS, Pádua LEM (2008) Atividade de extrato de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Rev Ciênc Agron* 3:437–442
- Castro-Janer E, Martins JRS, Mendes MCD, Namindome AB, Klafke GMB, Schumaker TTS (2010) Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* using in vitro larval bioassays. *Vet Parasitol* 173:300–306
- Cechinel-Filho V, Yunes RA (1998) Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova* 21:99–105
- Chagas ACS, Barros LD, Cotinguiba F, Furlan M, Gigliotti R, Oliveira MCS, Bizzo HR (2012) In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 110:295–303
- Cotinguiba F, Regasini LO, Bolzani VS, Debonsi HM, Passerini GD, Cicarelli RMB, Kato MJ, Furlan M (2009) Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Med Chem Res* 18:703–711
- Dominguez-García D, Rosario-Cruz R, García C, Oaxaca J, De la Fuente J (2010) *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Trop Subtrop Agroecosyst* 12:181–192
- Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973) *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests for insecticides. *J Econ Entomol* 66:130–133
- Facundo VA, Polli AR, Rodrigues RV, Militão JSLT, Stabelli RG, Cardoso CT (2008) Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *Piper hispidum* H. B. K. *Acta Amazon* 38:733–742
- FAO (1971) Plant Protection Bulletin. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp. FAO method 7:15–18
- Felipe FCB, Souza Filho JT, Souza LOE, Silveira JA, Uchoa DEA, Silveira ER, Pessoa ODL, Viana GSB (2007) Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. *Phytomedicine* 14:605–612
- Ferraz ABF, Balbino JM, Zini CA, Ribeiro VL, Bordignon SA, Von Poser G (2010) Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. *Parasitol Res* 107:243–248
- Gazim ZC, Demarchi IG, Lonardon MVC, Amorim ACL, Hovell AMC, Rezende CM, Ferreira GA, Lima EL, Cosmo FA, Cortez DAG (2011) Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Parasitol* 129:175–178
- Graf JF, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini GA, Bordin EL, Arantes GJ (2004) Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129:427–442
- Gupta A, Agarwal AK, Shukla GS (2000) Effect of quinalphos and cyperme thrin exposure on developing blood-brain barrier: role of nitric oxide. *Environ Toxicol Pharmacol* 8:73–78
- Hernández LE, Parra DG, Marin AC (1987) Accion repelente y acaricida del *Melinis minutiflora* sobre el *Boophilus microplus*. *Colomb Cienc Quim Farm* 16:17–21
- Lebouvier N, Hue T, Hnawia E, Lesaffre L, Menut C, Nour M (2013) Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 112:1379–1384
- Leite RC (1988) *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): susceptibilidade, current and retrospective usage of acaricides in lands from baixada do Grande-Rio and Rio de Janeiro physiogeographic regions. An epidemiological approach. 1988, 151 f. Belo. (Thesis – Doctor Degree on Preventive Veterinary Medicine), Horizonte: UFMG
- Lopes JJ, Marxa C, Ingrassia R, Nascimento Picada J, Pereira P, Ferraz ABF (2012) Neurobehavioral and toxicological activities of two

- potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. *Exp Toxicol Pathol* 64:9–14
- Maia JGS, Zoghbi MGB, Andrade EHA (2001) Plantas aromáticas da Amazônia e seus óleos essenciais. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, p 173
- Martínez-Velazquez M, Castillo-Herrera GA, Rosario-Cruz R, Flores-Fernandez JM, Lopez-Ramirez J, Hernandez-Gutierrez R, Lugo-Cervantes EDC (2011) Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 108:481–487
- Matos FJ (1988) Introdução a Fitoquímica Experimental. Ed. UFC, p128
- Mgbojikwe LO, Okoye ZSC (2001) Acaricidal efficacy of the aqueous stem bark extract of *Adenium obesum* on the various life stages of cattle ticks. *Niger J Exp Appl Biol* 2:39–43
- Miller RJ, Almazán C, Ortíz-Estrada M, Davey RB, George JE, Pérez De León A (2013) First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Vet Parasitol* 191:97–101
- Navickiene HMD, Morandim AA, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DCB, Telascra M, Cavalheiro AJ, Lopes MN, Bolzani VS, Furlan M, Marques MOM, Young MCM, Kato MJ (2007) Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quim Nova* 29:467–470
- Olivo CJ, Carvalho NM, Silva JHS, Vogel FF, Massariol P, Meiner G, Agnolim C, Morel AF, Viau LV (2008) Óleo de citronela no controle do carrapato de bovino. *Cienc Rural* 38:406–410
- Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ (2002) Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J Agric Food Chem* 50:1866–1870
- Ravindrana R, Juliet S, Ajith Kumar KG, Sunil AR, Nair SN, Amithamol KK, Rawat AKS, Ghosh S (2011) Toxic effects of various solvents against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Ticks Tick Borne Dis* 2:160–162
- Regasini LO, Cotinguiba F, Passerini GD, Bolzani VS, Cicarelli RMB, Kato MJ, Furlan M (2009) Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Braz J Pharmacogn* 19:199–203
- Ribeiro VLS, Rolim V, Bordignon S, Henriques AT, Dorneles GG, Limberger RP, Poser GV (2008) Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitol Res* 102: 531–535
- Roditakis E, Roditake NE, Tsagkarakou A (2005) Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Manag Sci* 61:577–582
- Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Frago- Sánchez H, Santamaría VM, Rosario-Cruz R (2006) Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, México. *Vet Parasitol* 136:335–342
- Rosado-Aguilar JA, Aguilar-Caballero A, Rodrigues-Vivas RI, Borges-Argaez R, Garcia-Vazquez Z, Mendes-Gonzalez M (2010) Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Vet Parasitol* 168:299–303
- Roulston WJ, Schnitzerling HJ, Schuntner CA, Wilson JT (1968) Acetylcholinesterase insensitivity in the Biarra strain of the cattle tick *Boophilus microplus*, as a cause of resistance to organophosphorus and carbamate acaricides. *Aust J Biol Sci* 21:759–767
- Schenke EP, Gosmann G, Petrovick PR (2001) Produtos de Origem Vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 3ed, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, pp 301–332
- Schmahl G, Al-Rasheid KAS, Abdel-Ghaffar F, Klimpel S, Mehlhorn H (2010) The efficacy of neem seed extracts (Tre-san®, MiteStop®) on a broad spectrum of pests and parasites. *Parasitol Res* 107:261–269
- Scott IM, Puniani E, Durst T, Phelps D, Merali S, Assabgui RA, Sanches-Vindas P, Poveda L, Philogene BJR, Arnason JT (2002) Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agric For Entomol* 4:137–144
- Silva WC, Martins JRS, Souza HEM, Heinzen H, Cesio MV, Mato M, Albrecht F, Azevedo JL, Barros NM (2009) Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 164:267–274
- Stone BF, Haydock KP (1962) A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). *Bull Entomol Res* 53:563–578
- Trindade FTT, Stabeli RG, Facundo VA, Cardoso CT, Silva MA, Gil LHS, Silva-Jardim I, Silva AA (2012) Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of *Piper alatabaccum* branches and *Piper tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi*. *Braz J Pharmacogn* 22:979–984
- Xia Li-Zi ZM, Xiao Y-H, Li G-Y, Xiao-Zhen, Zhang G-L (2010) Chemical constituents from *Helwingia japonica*. *Chin J Nat Med* 8:8933–8952

CAPÍTULO 2

Efeito Repelente *in vitro* de genótipos do óleo essencial de *Lippia alba* sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus*

Artigo a ser submetido ao periódico Parasitology research

1 **Efeito repelente de genótipos do óleo essencial de *Lippia alba* sobre o carrapato dos**
2 **bovino *Rhipicephalus microplus***

3
4 **Aldilene da Silva Lima¹**

5 **¹Universidade Federal do Maranhão-UFMA**

6
7 **RESUMO**

8 O *R. microplus* é dos principais problemas da pecuária bovina. O principal controle tem sido
9 realizado com uso de acaricidas sintéticos, mas o aumento de populações resistentes aos
10 princípios ativos tem direcionado as pesquisas em busca de alternativas a estes produtos.
11 Compostos bioativos de plantas podem ser uma alternativa para o controle deste ectoparasita.
12 O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito repelente de três diferentes genótipos de *L. alba*
13 sobre larvas do carrapato bovino. O óleo essencial *L. alba* foi obtido por hidrodestilação e
14 seus componentes foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de
15 massa (CG-MS). Os óleos essenciais e os monoterpenos foram utilizados no teste de
16 repelência com larvas. Os monoterpenos encontrados em maior percentual foram limoneno,
17 carvona e linalool. O óleo essencial de LA-13 apresentou 100% de repelência em 43 horas
18 pós-tratamento na concentração de 6,88 mg/cm². LA-57 apresentou uma alta atividade
19 repelente na mesma concentração. Os monoterpenos testados numa concentração de 6,88
20 mg/cm² apresentaram baixa atividade repelente sobre as larvas de *R. microplus*. O óleo
21 essencial de *L. alba* pode ser considerado promissor para o desenvolvimento de um repelente
22 comercial para proteção dos hospedeiros vertebrados.

23
24 **Palavras-chaves: monoterpeno, produtos naturais, carrapato bovino.**

49 INTRODUÇÃO

50 *Rhipicephalus microplus* é um importante ectoparasito bovino amplamente distribuído
51 em agroecossistemas tropicais e subtropicais do mundo (Lovis 2011; Rodriguez-Vivas 2012).
52 Esta espécie de carrapato ocasiona diversas perdas econômicas à produção bovina, como
53 perda peso, redução da produção de leite, depreciação do couro, além de ser transmissor de
54 patógenos (Rodriguez-Vivas et al. 2004; Olivo et al. 2008). O controle deste parasito tem sido
55 realizado com o uso extensivo de carrapaticidas, entretanto o uso incorreto tem selecionado
56 populações de carrapatos resistentes à maioria das classes de carrapaticidas (Rodriguez-Vivas
57 et al. 2006b; Chevillon et al. 2007; Castro-Janer et al. 2010).

58 Devido a baixa eficiência dos carrapaticidas disponíveis no mercado, o uso e o
59 interesse de plantas como fonte natural de compostos com atividade carrapaticida e/repelentes
60 tem aumentado (Soares et al. 2010). Repelentes naturais oriundos de plantas podem torna-se
61 uma alternativa aos repelentes sintéticos (Garboui et al. 2007), já que são consideradas fontes
62 de compostos bioativos biodegradáveis, não tóxico e com uso sustentável para teste de
63 repelência de artrópodes (Govindarajan e Sivakumar 2011). Por outro lado o conhecimento de
64 substâncias naturais repelentes pode servir para aumentar o período residual de formulações
65 carrapaticidas naturais ou sintéticas que tenham apenas efeito Knock Down. Além disso, o
66 uso destes produtos com diferentes modos de ação pode dificultar a seleção de populações
67 resistentes de *R. microplus* (Chagas 2004).

68 Plantas do gênero *Lippia* apresentam distribuição na América do sul e central e em
69 parte da África. No Brasil *Lippia alba* é conhecida popularmente como cidreira, sendo
70 comumente utilizada para fins tranquilizantes e tratamentos de desordem gastrointestinais
71 (Gurgel do Vale et al. 2002; Braga et al. 2005). O óleo essencial de *L. alba* apresenta uma
72 predominância de monoterpenos, dentre eles, citral, β -mirceno, limoneno e carvona (Gurgel
73 do Vale et al. 2002). Esta espécie de planta apresenta uma grande variedade morfológica e

74 química, sendo reportados três principais quimiotipo, que são classificados de acordo com o
75 composto majoritário (citrinal, carvona e linalol) (Matos et al. 1996; Vale et al. 1999).

76 O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito repelente de diferentes genótipos do óleo
77 essencial de *L. alba* sobre o carrapato dos bovinos *R. microplus*.

78

79 **MATERIAIS E MÉTODOS**

80 **Coleta de Plantas**

81 Foram coletadas folhas de três genótipos de *L. alba* de diferentes origens (Tabela 1),
82 mantidos sob os mesmos procedimentos no banco ativo de germoplasma (BAG) de Plantas
83 medicinais da Universidade Federal de Sergipe (UFS). As folhas foram coletadas no mesmo
84 dia e horário, secas a 40°C em estufa de circulação de ar por cinco dias, e reduzidas a pó em
85 moinho.

86 **Extração e Análise do óleo essencial**

87 O óleo essencial de *L. alba* foi obtido pela hidrodestilação através do aparelho
88 Clevenger, por 2 horas (Guenther 1972). Os teores de óleos essenciais foram estimados com
89 base no peso da matéria seca (mL.100 g⁻¹) e obtidos utilizando-se três amostras de 75 g. As
90 amostras dos óleos essenciais foram analisadas utilizando-se cromatografia gasosa em
91 equipamento Shimadzu QP5050A interfaceada com espectroscopia de massa (CG/EM),
92 dotada de coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 m) nas seguintes condições: gás de
93 arraste hélio (fluxo 1,0 mL.min⁻¹); tipo de injeção split a 250°C (1/20); detector a 280°C,
94 programação da coluna 80°C durante 1,5 minuto, com aumento de 4°C por minuto para
95 180°C, seguido de 10°C por minuto até 300°C, finalizando com 10 minuto. de isoterma a
96 300°C. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV, velocidade de
97 varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa
98 de 40 a 350 Da. A identificação dos constituintes foi determinada com base na comparação do
99 índice de retenção (Van Den Dool e Kratz 1963) relativo a uma série de n-alcanos homólogos

100 obtido pela co-injeção de amostras do óleo com uma mistura linear de hidrocarbonetos, bem
101 como com o banco de dados NIST21 e NIST107 da biblioteca do CG/EM e publicação de
102 espectro de massas (Adams, 2007).

103 **Preparação dos Carrapatos**

104 Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (≥ 4.5 mm) resistentes a piretróides sintéticos e
105 amidínicos foram coletadas de bezerros infestados artificialmente. As fêmeas Ingurgitadas
106 foram selecionadas morfológicamente e mantidas em estufa com temperatura de 27°C e
107 umidade relativa $\geq 80\%$ até o final da ovoposição. Em seguida os ovos foram coletados e
108 mantidos novamente na estufa para a eclosão dos ovos. As larvas entre 14 a 21 dias de idade
109 obtidas dos ovos foram usadas para os testes de repelência.

110 **Teste de Repelência**

111 O teste de repelência foi realizado de acordo com a técnica desenvolvida por Mawela
112 (2008). Um bastão de vidro (23 centímetros) foi fixado verticalmente, usando parafina sólida
113 em um béquer de 80 ml. Em cada bastão foi colado a 5 cm abaixo do topo um papel filtro
114 neutro (12,5 cm²), e acima do papel neutro foi colado o papel filtro teste (12,5 cm²) (Figura
115 1). Utilizou-se inicialmente uma concentração de 6,8 mg/cm² dos três diferentes genótipos de
116 *L. alba* ou dos monoterpenos isolados Limoneno R(+), Limoneno S(-), Carvona R(-), L-
117 Carvona, e β -cariofileno adquiridos comercialmente (Sigma, St. Louis, MO). Os dois
118 genótipos com maior tempo de repelência foram testados nas concentrações 4,6; 3,1; 1,6; e
119 0,9 mg/cm². Como controle negativo foi utilizado DMSO 3%, e como controle positivo foi
120 utilizado N-Diethyl-meta-toluamida (DEET) na concentração de 0,86 mg/cm².

121 Aproximadamente 100 larvas de carrapatos foram colocadas na base do aparato,
122 permitindo a subida para o bastão. A contagem das larvas no papel tratado ou no papel neutro
123 foi realizada a cada hora até o percentual de repelência ser menor que 20%. A cada avaliação
124 todas as larvas foram retiradas e adicionadas novas larvas. O teste foi realizado em

125 temperatura ambiente variando entre 27 a 31°C. O percentual de repelência (%) foi calculado
126 usando a seguinte fórmula: $[(\% \text{ controle} - \% \text{ tratado})/(\% \text{ controle})] \times 100$ (Sharma e Ansari
127 1994).

128

129 **RESULTADOS**

130 Através de análises cromatográficas foram identificados aproximadamente 25
131 compostos diferentes nos óleos essenciais de *L. alba* (Tabela 2). Os genótipos LA-13 e LA-57
132 apresentaram carvona (52,6 e 62,8%, respectivamente) e limoneno (26,6 e 26,5%,
133 respectivamente) como compostos majoritários. O genótipo LA-27 apresentou como
134 compostos majoritários linalol (25,7%), geranial (17,0%) e carvona (16,7%).

135 O óleo essencial dos genótipos LA-13 e LA-57 repeliram as larvas de *R. microplus* por
136 mais de 37 horas. O poder de repelência do óleo essencial do genótipo LA-13 foi semelhante
137 ao observado pelo DEET (Figura 2). O óleo essencial do genótipo LA-27 apresentou menor
138 poder de repelência com redução significativa após 8 horas (Figura 2).

139 O óleo essencial do genótipo LA-13 demonstrou uma alta repelência na concentração
140 4,66 e 3,12 mg/cm² de mais de 30 horas. A ação repelente do óleo essencial reduziu conforme
141 foi diminuindo as concentrações, após 5 horas (Figura 3A). A taxa de repelência para o
142 genótipo LA-57 apresentou uma menor atividade com redução expressiva após 6 horas
143 (Figura 3B).

144 O limoneno R(+), L-carvona, β-cariofileno e carvona R(-) isolados apresentaram
145 baixo poder de repelência quando comparados aos óleos essenciais (Figura 4). O tempo de
146 ação repelente do limoneno R(+) foi parecido ao observado pelo óleo essencial do genótipo
147 LA-27 no tempo de 5 horas, e demonstrou-se inferior aos genótipos LA-13 e LA-57.

148 A taxa de repelência do constituinte majoritário Limoneno R(+) no tempo de 6 horas
149 foi maior que 80%, os demais monoterpenos apresentaram baixa atividade repelente. O
150 limoneno S(-) não demonstrou atividade repelente sobre as larvas de *R. microplus* (Figura 4).

151

152 **DISCUSSÃO**

153 A atividade repelente é ocasionada pela liberação de uma substância química volátil,
154 que provoca na espécie alvo um movimento desordenado para longe da fonte de odor
155 (Jaenson et al. 2005). O modo de ação repelente de substâncias ativas de plantas podem
156 promover subsídios para a formulação de produtos que podem ser utilizados para repelir
157 carrapatos no homem ou animal (Novelino et al. 2007). O efeito do óleo essencial de *L. alba*
158 sobre o comportamento de subida dos carrapatos é um indicador da importância da atividade
159 repelente deste óleo sobre larvas de *R. microplus*.

160 Diversos tipos de compostos ativos de plantas incluindo compostos secundários são
161 utilizados como repelentes de insetos (Curtis 2002). Alguns repelentes têm sido identificados
162 de fontes naturais, e assim explorado o potencial do composto ativo de interferir na
163 localização do hospedeiro (Birkett et al. 2011). Neste trabalho apresentamos a primeira
164 descrição de repelência do óleo essencial de *L. alba* sobre larvas de *R. microplus*.

165 *L. alba* é uma planta aromática distribuída em áreas tropicais e subtropicais, no Brasil
166 são encontradas das florestas secas até o Amazonas (Antolinez Delgado e Rodríguez López
167 2008). Plantas do gênero *Lippia* ssp. tem sido relatadas com atividade repelente contra insetos
168 (Caballero-Gallardo et al. 2011), mais não tem sido descrita com atividade repelente sobre
169 carrapatos. O nosso trabalho demonstrou 100% de atividade repelente do óleo essencial dos
170 genótipos LA-13 e LA-57 de *L. alba* por mais de 30 horas sobre larvas de *R. microplus*
171 (Figura 1 e 2).

172 A composição química do óleo de *L. alba* apresentou um percentual majoritário de
173 carvona e limoneno (LA-13 e LA-57), e linalol, geranial e limoneno (LA-27). No Brasil,
174 plantas dessa espécie podem ser classificadas em três diferentes quimiotipos que tem como
175 predominância os monoterpenos citral, limoneno, carvona ou linalol (Matos et al. 1996; Vale
176 et al. 1999). Propriedades repelentes de óleos essenciais estão associadas à presença de
177 monoterpenos e sesquiterpenos (Jaenson et al. 2006). Limoneno e linalool já são descritos
178 com atividade repelente sobre insetos (Hebeish et al. 2008; Muller et al. 2009; Giatropoulos et
179 al. 2012). O monoterpeno linalool testado sobre *Rhipicephalus appendiculatus* apresentou
180 uma atividade repelente de 85% (Lwande et al. 1999).

181 Os óleos essenciais dos genótipos testados apresentaram uma alta concentração de
182 carvona. Carvona isolado tem apresentado repelência sobre ninfas de *Amblyomma*
183 *americanum* (Weldon et al. 2011), contudo apresentou um baixo efeito repelente sobre larvas
184 de *R. microplus*.

185 O limoneno é registrado como composto ativo de produtos pesticidas usados como
186 repelentes para insetos, e foi o primeiro monoterpeno registrado com atividade repelente para
187 ser utilizado em cães e gatos (Prevention, Pesticides and Toxic Substances 1994). Contudo, o
188 limoneno testado sobre ninfas de *A. americanum* e *A. aegypti* não apresentou atividade
189 repelente (Weldon et al. 2011). Em plantas o limoneno encontrado em altas concentrações
190 pode realizar o processo contrário de repelência, tornando-se um sinalizador atrativo para
191 pragas e patógenos (Rodríguez et al. 2011).

192 Os genótipos dos óleos essenciais de *L. alba* apresentaram alta atividade repelente
193 sobre as larvas do carrapato bovino demonstrando que óleos essenciais de *L. alba* tem outros
194 compostos ativos que podem atuar sinergicamente ou mesmo isoladamente aumentando o
195 poder de ação repelente dos óleos essenciais.

196

197 Estudos utilizando óleos essenciais tem comprovado sua atividade repelente sobre
198 espécies de artrópodes. E o aumento da ação repelente desses óleos essenciais está altamente
199 dependente da composição química dos compostos ativos (Nerio et al. 2010). As diferenças
200 na atividade dos genótipos pode esta relacionada a uma maior volatilização dos compostos
201 ativos, a um sinergismo dos compostos, resultando em uma maior atividade quando
202 comparados ao usado isoladamente (Gillij et al. 2008), ou a uma possível modificação na
203 estrutura química do composto, capaz de modular a repelência.

204 Foi observada neste estudo uma grande concentração de limoneno e carvona nos
205 genótipos com maior poder de repelência. O limoneno tem sido descrito na literatura como
206 composto ativo de produtos inseticidas e repelentes (Prevention, Pesticides and Toxic
207 Substances, 1994). Porém, os dois compostos majoritários utilizados isoladamente não
208 apresentaram alta atividade repelente sobre larvas de *R. microplus*, quando comparado com os
209 resultados obtidos dos óleos essenciais. A presença de compostos ativos em menores
210 quantidades nos óleos essenciais pode contribuir para o efeito repelente, conferindo a
211 importância de misturas complexas naturais de terpenóides (Nerio et al. 2010).

212 O óleo essencial de *L. alba* contém compostos bioativos com alta atividade repelente
213 de carrapatos, variando de acordo com o genótipo utilizado. Outros estudos observando a
214 capacidade in vivo de repelência deverão ser realizados.

215

216 **BIBLIOGRAFIA**

217 Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass
218 spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 4th edn. p. 804

219 Antolinez Delgado CA, Rodríguez López N (2008) Phenotypic plasticity in *Lippia alba* and
220 *Lippia origanoides* (Verbenaceae): response to nitrogen availability. Act Biol Colom 13:53–64

221 Braga MEM, Ehlert PAD, Ming LC, Meireles MAA (2005) Supercritical fluid extraction
222 from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. J Supercrit
223 Fluid 34:149-156

224 Birkett MA, Hassanali A, Høglund S, Pettersson J, Pickett JA (2011) Repellent activity of
225 catmint, *Nepeta cataria*, and iridoid nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes,
226 ixodid ticks and red poultry mites. Phytochem 72:109–114

227 Curtis PD, Rowland ED, Good GL (2002) Developing a plant-based vole repellent: screening
228 of ten candidate species. Crop Prot 21: 299–306

229 Chagas ACS (2004) Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. Rev Bras Parasitol
230 Vetv 13:156-160

231 Chevillon C, Ducornez S, Meeûs T, Koffi BB, Gaia H, Delathière JM, Barré N (2007)
232 Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
233 (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. Vet. Parasitol 147:276-288

234 Castro-Janer E, Martins JRS, Mendes MCD, Namindome AB, Klafke GMB, Schumaker TTS
235 (2010) Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus)*
236 *microplus*) using in vitro larval bioassays. Vet. Parasitol 173:300-306

237 Caballero-Gallardo K , Olivero-Verbel J, Stashenko EE (2011) Repellent activity of essential
238 oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. J Agric
239 Food Chem 59: 1690-1696

240 Gurgel do Vale T, Couto Furtado E, Santos Jr, JG, Viana GSB (2002) Central effects of citral,
241 myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E.
242 Brown Phytomed 9:709–714

243 Guenther E, (1972) The production of essential oils: methods of distillation, enfleurage,
244 maceration, and extraction with volatile solvents. In: Guenther, E. (ed) The essential oils.
245 History-origin in plants. production analysis. Krieger Publ. Co, Malabar, FL, 1:85-188

246 Gillij YG, Gleiser RM, Zygadlo JA (2008) Mosquito repellent activity of essential oils of
247 aromatic plants growing in Argentina. Bioresour Technol 99:2507– 2515

248 Garboui SS, Jaenson TGT, Borg-Karlson AK, Palsson K (2007) Repellency of methyl
249 jasmonate to *Ixodes ricinus* nymphs. (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol 42:209–215

250 Govindarajan M, Sivakumar R (2011) Mosquito adulticidal and repellent activities of
251 botanical extracts against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera:Culicidae).
252 Asian Pacif J of Trop Med 4: 941-947

253 Giatropoulos A, Papachristos DP, Kimbaris A, Koliopoulos G, Polissiou MG, Emmanouel N,
254 Michaelakis A (2012) Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the
255 dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components
256 enantiomeric distribution. Parasitol Res 111:2253–2263

257 Hebeish A, Fouda MMG, Hamdy IA, EL-Sawy SM, Abdel-Mohdy FA (2008) Preparation of
258 durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. Carbohydr Polym 74:268–273

259 Jaenson TG, Palsson K, Borg-Karlson AK (2006) Evaluation of extracts and oils of mosquito
260 (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. J. Med. Entomol
261 43:113–119

262 Jaenson TGT, Palsson K, Borg-Karlson AK (2005) Evaluation of extracts and oils of tick-
263 repellent plants from Sweden. Med Vet Entomol 19: 345–352

264 Lwande W, Ndakala AJ, Hassanali A, Moreka L, Nyandat E, Ndungu M, Amiani H, Gitu PM,
265 Malonza MM, Punyua DK (1999) *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as
266 tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. *Phytochem* 50:401–405

267 Lovis L, Perret JL, Bouvier J, Fellay JM, Kaminsky R, Betschart B, Sager H (2011) A new in
268 vitro test to evaluate the resistance level against acaricides of the cattle tick, *Rhipicephalus*
269 (*Boophilus*) *microplus*. *Vet. Parasitol* 182:269– 280

270 Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA, Alencar JW, (1996) The essential oil composition
271 of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J of Essent Oil Res* 8: 695–698

272 Mawela KG (2008) The toxicity repellent properties of plant extracts used in ethnoveterinary
273 medicine to control ticks. Dissertation, University of Pretoria, p. 1-118.

274 Müller GC, Junnila A, Butler J, Kravchenko VD, Revay EE, Weiss RW, Schlein Y (2009)
275 Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *J of*
276 *Vector Ecol* 34(1): 2-7

277 Novelino MAS, Daemon E, Soares GLG (2007) Avaliação da atividade repelente do timol,
278 mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini,
279 1887) (Acari: Ixodidae). *Arq Bras Med Vet Zootec* 59(3):700–704

280 Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: A review.
281 *Bioresour Technol* 101: 372–378

282 Olivo CJ, Carvalho NM, Silva JHS, Vogel FF, Massariol P, Meiner G, Agnolim C, Morel AF,
283 Viau LV (2008) Óleo de citronela no controle do carrapato de bovino. *Ciênc. Rural* 38: 406-
284 410

285 Prevention, pesticides and toxic substances (1994) United States Environmental Protection
286 Agency[September], EPA-738-F-94-030

287 Rodriguez-Vivas RI, Mata MY, Pérez GE, Wagner G, (2004) The effect of management
288 factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican
289 tropics. *Trop Anim Health Prod* 36:135–143

290 Rodriguez-Vivas RI, Rodriguez-Arevalo F, Alonso-Díaz MA, Fragoso- Sanchez H,
291 Santamaria, VM, Rosario-Cruz, R (2006b) Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in
292 cattle farms from the state of Yucatan, Mexico: prevalence and potential risk factors. *Prev Vet*
293 *Med* 75: 280–286

294 Rodríguez A, Andrés VS, Cervera M, Redondo A, Alquézar B, Shimada T, Gadea J, Rodrigo
295 M, Zacarías L, Palou L, López MM, Castenera P, Pena L (2011) The monoterpene limonene
296 in orange peels attracts pests and microorganisms. *Plant Signal Behav* 6:11:1820-1823

297 Rodriguez-Vivas RI, Hodgkinson JE, Rosado-Aguilar JA, Villegas-Perez SL, Trees AJ (2012)
298 The prevalence of pyrethroid resistance phenotype and genotype in *Rhipicephalus*
299 (*Boophilus*) *microplus* in Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 184:221– 229

300 Sharma VP, Ansari MA (1994) Personal protection from mosquitoes (Diptera: Culicidae) by
301 burning neem oil in kerosene. *J Med Entomol* 31:105–107

302 Soares SF, Borges LMF, Braga RS, Ferreira LL, Louly CCB, Tresvenzol LMF, Realino de
303 Paula J, Ferri PH (2010) Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma*
304 *cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Vet Parasitol* 167:67–73

305 Yamamoto PY, Colombo CA, Azevedo Filho JÁ, Lourenção AL, Marques MOM, MORAIS
306 GDS, Chiorato AF, Martins ALM, Siqueira WJ (2008) Performance of ginger Grass (*Lippia*
307 *alba*) for traits related to the production of essential oil. *Sci Agríc* 65 (5): 481-489

308 Van Den Dool H, Kratz DJ (1963) A generalization of the retention index system including
309 linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 11:463-
310 467

311 Vale TG, Matos FJ, de Lima TC, Viana GS (1999) Behavioral effects of essential oils from
312 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. J Ethnopharmacol 67: 127-133

313 Weldon PJ, Carroll JF, Kramer M, Bedoukian RH, Coleman RE, Bernier UR (2011) Anointing
314 Chemicals and Hematophagous Arthropods: Responses by Ticks and Mosquitoes to Citrus
315 (Rutaceae) Peel Exudates and Monoterpene Components. J Chem Ecol 37:348–359

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

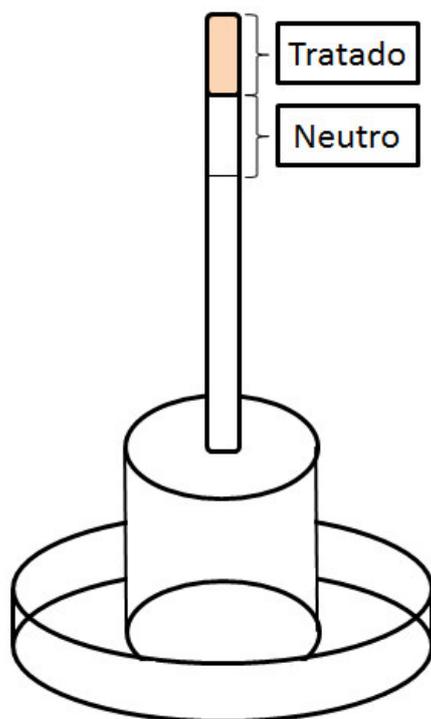
326

327

328

329

330



331 Figura1: Aparato utilizado para a realização do teste de repelência segundo Mawela et al.,
332 2008.

333

334

335

336

337

338 Tabela 1: Acessos de *Lippia alba* mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de plantas
339 medicinais da Universidade Federal de Sergipe e utilizados no presente estudo.
340

Código do acesso	Local de origem	Procedência	Nº Voucher Herbário UFS
LA – 13	Fortaleza – CE	UFC	13488
LA – 27	Piracicaba – SP	UnB	13443
LA – 57	Rio Real – BA	UFS	13469

341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381

382 Tabela 2: Composição química (%) dos diferentes genótipos de *Lippia alba* utilizados nos
383 testes de repelência.
384

385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431

Composto	LA-57	LA-13	LA-27
Limoneno	26,5	26,6	10,9
Carvona	62,8	52,6	16,7
g-muuruleno	2,3	2,7	2,1
Linalol	0,8	1,7	25,7
Sabineno	0,0	2,3	0,7
Elemol	0,0	4,5	0,7
1,8-cineol	0,0	0,0	2,0
g-terpineno	0,0	0,3	1,5
Geranial	0,0	0,0	17,0
β -cariofileno	0,3	0,0	1,0
Neral	0,0	0,0	12,7
Outros Compostos	7,3	9,3	9,0

432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481

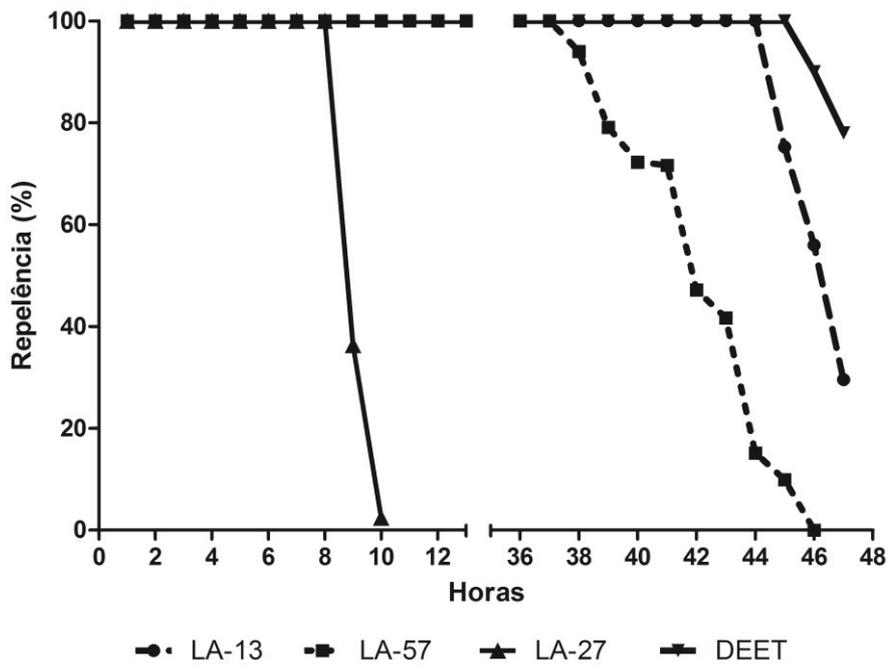
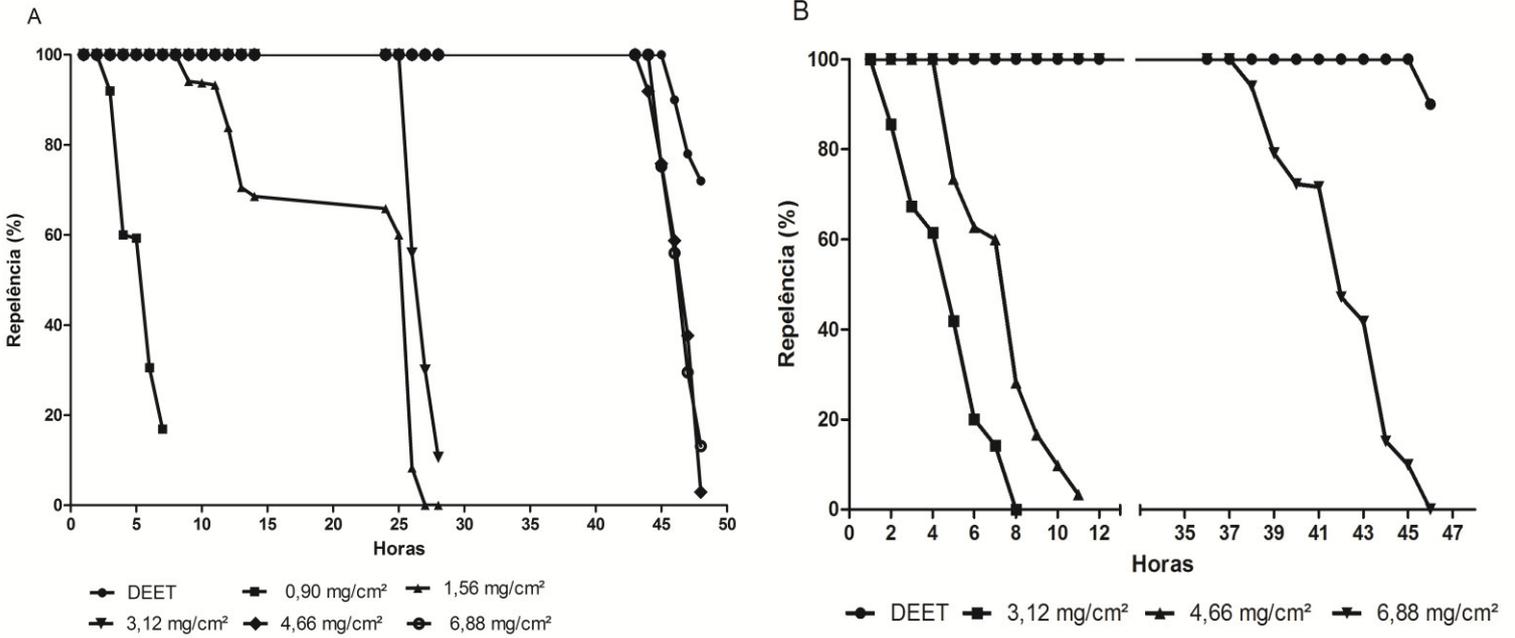


Figura 2: Percentual de repelência do óleo essencial de diferentes genótipos de *Lippia alba* (6,88 mg/cm²) e DEET (0,86 mg/cm²) sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*.

482



483

484

485 Figura 3: Percentual de repelência das diferentes concentrações dos óleos essenciais dos
486 genótipos LA-13 (A) e LA-57 (B) de *Lippia alba* e DEET (0,86 mg/cm²) sobre larvas de
487 *Rhipicephalus microplus*.

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540

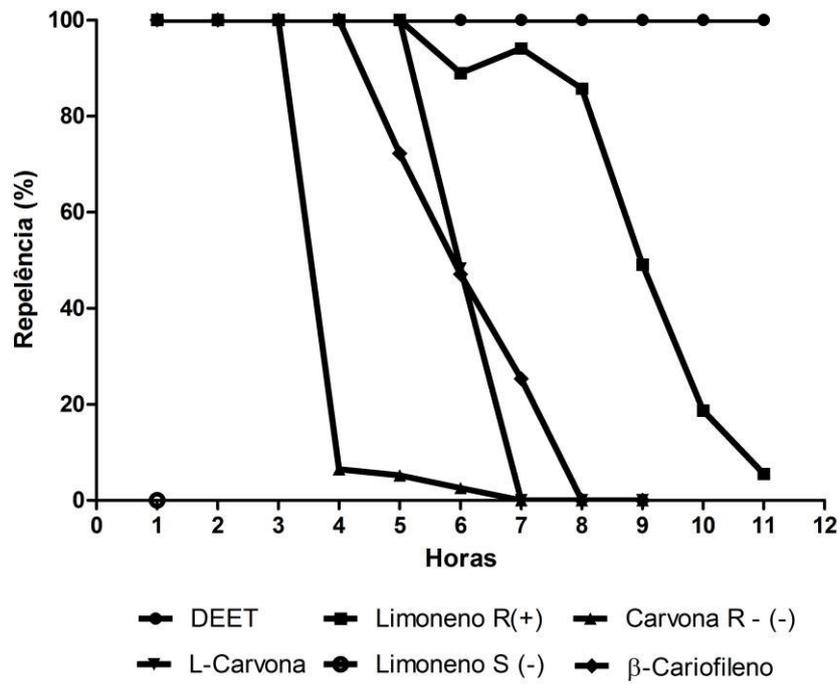


Figura 4: Percentual de repelência de larvas de *Rhipicephalus microplus* de monoterpenos e DEET testados na concentração de 6,88 mgcm².

CAPÍTULO 3

Efeito repelente dos óleos essenciais de *Citrus* ssp. sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*

Artigo a ser submetido ao periódico Bioresource Technology

**Efeito repelente dos óleos essenciais de *Citrus* ssp. sobre o carrapato bovino
*Rhipicephalus microplus***

Aldilene da silva Lima¹

¹Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Resumo

O *R. microplus* é dos principais problemas da pecuária bovina. Compostos de plantas com atividade repelente pode ser uma alternativa para o controle deste ectoparasita. A atividade repelente é ocasionada por uma substância volátil, que provoca movimentos desordenados do carrapato para longe do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade repelente de óleos essenciais de *Citrus*. Os óleos essenciais foram obtidos por prensagem a frio da casca dos frutos de *Citrus* ssp. e seus e seus componentes foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). Larvas obtidas de bezerros infestados artificialmente com idade de 14 a 21 dias, foram utilizadas no teste de Repelência. O óleo essencial de *Citrus aurantium* var. *dulcis* apresentou uma alta atividade repelente com mais de 30 horas de repelência na concentração de 6,88mg/cm², as espécies de *Citrus aurantifolia* e *Citrus aurantium* var. *amara* apresentaram uma ação repelente menor que 60% em 5 horas. Os óleos de *Citrus limon* e *Citrus reticulata* var. *tangerine* apresentaram menos de 20% de repelência em 4 horas após o tratamento. *Citrus aurantium* var. *dulcis* apresentou um poder de repelência em concentrações menores testadas, porém com um tempo bem reduzido. *Citrus aurantifolia* também apresentou um efeito repelente numa concentração de 4,66 mg/cm² de 61% no tempo de 5 horas. Os óleos essenciais de *Citrus* ssp. apresentaram um efeito repelente contra larvas de *R. microplus*, contudo ainda são necessários mais estudos para investigar maneiras de diminuir a volatilização dos compostos ativos para aumentar seu tempo de repelência.

Palavras-Chaves: Compostos ativos, repelência, controle.

INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus microplus* é um importante carrapato que está largamente distribuído no mundo entre os paralelos 30°S e 40°N (Cunha et al., 2010; Lovis et al., 2011). É uma das principais espécies de carrapatos que causa diversos danos econômicos a produção de bovinos com danos diretos ou transmissão de patógenos (Rodríguez-Vivas et al., 2012; Rodríguez-Vivas et al., 2004). Acaricidas têm sido o principal meio de controle de carrapatos, porém o uso inadequado tem acelerado a resistência de carrapatos a quase todas as classes químicas disponíveis no mercado (Alonso-Díaz et al., 2006; Castro-Janer et al., 2010).

O uso de biopesticidas tem sido pesquisado como uma alternativa para o controle de carrapatos (Rosado-Aguilar et al., 2010). Compostos ativos de origem botânica tem despertado o interesse de pesquisas, devido à degradação rápida e a resistência ser bem mais lenta que os pesticidas químicos (Silva et al., 2011; Borges et al., 2003).

O gênero *Citrus* ssp. pertence a família Rutaceae com aproximadamente 16 espécies distribuídas em regiões subtropicais (Fisher e Phillips, 2008). O óleo essencial dos *Citrus* contém de 85 a 99% dos seus constituintes voláteis e 1 a 15% de componentes não voláteis. Caracteriza-se por uma predominância de monoterpenos, principalmente limoneno com 32 a 98%, sesquiterpenos e inclui ainda aldeídos, ácidos, ésteres, éteres e álcoois (Fisher e Phillips, 2008; Moufida e Marzouk, 2003).

A composição do óleo essencial pode ser alterada significativamente pelas condições de maturação da planta, condições de estocagem e método de extração do óleo (Venkateshwarlu e Selvaraj, 2000). O óleo essencial também pode ser afetado pela presença do limoneno, que pode variar de acordo com as espécies, e variedades de *Citrus* spp. e as condições agroclimáticas de cada região (Dharmawan et al., 2007)

As espécies de citrus têm despertado o interesse de pesquisas devido seu grande potencial econômico e nutracêutico (Hosni et al., 2010). O óleo essencial de *Citrus* spp. tem

sido comprovado com atividades antimicrobial (Majnooni et al., 2012), antifúngica (Chutia et al., 2009), anti-oxidante (Rehman, 2006; Majnooni et al., 2012), inseticida (Lans et al., 2008) e acaricida (Magadum et al., 2009).

A atividade repelente do óleo essencial de folhas de *Citrus* ssp. tem sido apresentada sobre insetos (Hazarika et al., 2012) e ninfas de *Amblyomma americanum* (Weldon et al., 2011). Contudo, os dados com óleos essenciais de diversas espécies de *Citrus* e principalmente considerando a diversidade de variedades de espécies deste gênero ainda são escassos. Aliado ao fato de ainda não ter sido investigado atividade repelente com esta espécie vegetal sobre larvas de *R. microplus*. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade repelente de diferentes óleos essenciais de *Citrus* ssp. sobre larvas de *R. microplus*.

METODOLOGIA

Óleos essenciais e identificação dos compostos

Os óleos essenciais de *Citrus aurantium* var. *dulcis*, *Citrus aurantium* var. *amara*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus limon*, *Citrus reticulata* var. *tangerine* foram obtidos comercialmente (Ferquima, São Paulo - Brasil). Todos os óleos foram obtidos pela prensagem a frio da casca dos frutos.

Os teores dos componentes majoritários foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). A identificação dos constituintes foi determinada com base na comparação do índice de retenção (Van Den Dool e Kratz, 1963) relativos a n-alcenos homólogos adquirido pela co-injeção de amostras do óleo com uma mistura linear de hidrocarbonetos, bem como a publicação de espectro de massas (Adams, 2007).

Obtenção dos carrapatos

Foram utilizadas fêmeas adultas de *R. microplus* resistente a piretróides sintéticos e amidínicos de bezerros infestados artificialmente. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas em

incubadoras com temperatura de 27°C e umidade relativa de $\geq 80\%$. As larvas com idade entre 14 a 21 dias obtidas dos ovos foram utilizadas no teste de repelência.

Teste de Repelência

O teste *in vitro* foi realizado de acordo com a técnica desenvolvida por Mawela (2008). Um bastão de vidro vertical de 23 centímetros foi fixado dentro de um béquer de 80 ml preenchido com parafina, no qual serviu de base para colocar os carrapatos. Neste bastão foi colado a 5 cm abaixo do topo um papel filtro neutro (12,5 cm²), e acima deste foi colado um papel impregnado (12,5 cm²) com 98 µl dos diferentes óleos essenciais, em uma concentração de 6,88 mg/cm² do óleo essencial testado. Os tratamentos com maiores tempos de repelência foram testados nas concentrações de 1,56; 3,12; 4,66 mg/cm². Aproximadamente 100 larvas foram colocadas na base da parafina para uma avaliação posterior do efeito repelente do óleo. As avaliações do teste foram realizadas em dois tempos de 30 minutos na primeira hora e de uma em uma hora a partir da segunda hora do início do teste, sendo contadas todas as larvas do papel neutro e impregnado. A cada avaliação todas as larvas foram retiradas e adicionadas novas larvas. O teste foi realizado em temperatura ambiente variando entre 27 a 31°C. O controle negativo foi utilizado DMSO 3% e como controle positivo foi utilizado um produto comercial com princípio ativo DEET na concentração de 0,86 mg/cm². O percentual de repelência (%) foi calculado usando a seguinte fórmula: $[(\% \text{ controle} - \% \text{ tratado})/(\% \text{ controle})] \times 100$ (Sharma e Ansari, 1994).

RESULTADOS

A composição química dos óleos essenciais identificou 46 compostos presentes nos diferentes óleos (Tabela 1). *Citrus aurantium* var. *amara*, *C. aurantium* var. *dulcis*, *Citrus reticulata* var. *tangerine*, *Citrus limon*, e *Citrus aurantifolia* apresentaram o limoneno como composto majoritário (96, 94, 96, 69, e 55% respectivamente). Os óleos essenciais de *C.*

limon e *C. aurantifolia* também apresentaram o γ -terpineno e β -pineno em altas concentrações.

O óleo essencial de *C. aurantium* var. *dulcis* apresentou uma alta atividade repelente sobre larvas de *R. microplus* com mais de 30 horas. Após 30 horas, a porcentagem de repelência reduziu gradativamente (Figura 1).

C. aurantifolia na concentração de 6,88 mg/cm² demonstrou em 4 horas 87% de repelência, baixando consideravelmente o poder de repelência nas horas seguintes. Os óleos essenciais de *C. aurantium* var. *amara* e *C. reticulata* var. *tangerine* na concentração de 6,88 mg/cm² com 4 horas apresentou 52, e 19% respectivamente (Figura 1). *C. limon* não apresentou mais atividade repelente após 4 horas.

Dos óleos essenciais testados apenas dois apresentaram atividade repelente nas menores concentrações. O óleo essencial de *Citrus aurantium* var. *dulcis* com 4,66 mg/cm², 3,12 mg/cm² e 1,56 mg/cm² em 2 horas tinha 48, 36 e 25% de repelência, respectivamente, com 3 horas não havia mais atividade (Figura 2). *Citrus aurantifolia* na concentração de 4,66 mg/cm² apresentou 93% de atividade com 4 horas pós tratamento, com 8 horas obtivemos apenas 14%. A concentração de 3,12 mg/cm² com 4 horas tinha apenas 10% de repelência (Figura 3).

Os demais óleos essenciais *C. aurantium* var. *amara*, *C. limon* e *C. reticulata* var. *tangerine* não apresentaram atividade repelente nas concentrações menores testadas. O controle positivo DEET apresentou 100% de repelência em todos os testes realizados por mais de 30 horas (Figura 1 e 2).

DISCUSSÃO

A atividade repelente de compostos ativos de plantas proporciona adquirir informações para um possível uso desses compostos em produtos repelentes de carrapatos

utilizados em animais e humanos (Novelino et al., 2007). O presente trabalho indica que os óleos essenciais de *Citrus* ssp. apresentam um efeito repelente sobre larvas de *R. microplus*.

A ação repelente dos *Citrus* ssp. é proporcionada pela presença de compostos ativos presentes nos óleos essenciais (Naef e Velluz, 2001; Jaenson et al., 2006). O óleo essencial de *Citrus* ssp. é composto por frações voláteis e não volátil tais como, monoterpenos, sesquiterpenos, derivados oxigenados, hidrocarbonos, ésteres, ácidos graxos, flavonoides e outros (Tranchida et al., 2012).

A composição química de todos os óleos essenciais de *Citrus* ssp. apresentou alta concentração de limoneno. O limoneno é um monoterpeno descrito na literatura com atividade inseticida (Müller et al., 2009), mais com pouca descrição de atividade repelente sobre carrapatos. Apesar de todos os óleos apresentarem uma grande quantidade de limoneno, apenas *Citrus aurantium* var. *dulcis* apresentou uma alta atividade repelente por mais de 30 horas, os demais óleos apresentaram menos de 20% de atividade em 6 horas (Figura 1).

O poder de repelência dos óleos essenciais pode ter sido afetado pela volatilização dos compostos ativos, a um sinergismo, um antagonismo ou uma possível modificação na estrutura química do composto (Gillij et al., 2008). Ou ate mesmo por uma característica inerente ao óleo essencial de não apresentar atividade repelente. Porém, o óleo essencial apresenta uma melhor atividade repelente do que o composto utilizado isoladamente (Nerio et al., 2010).

O limoneno utilizado isoladamente apresentou baixa atividade repelente sobre larvas de *R. microplus*, enquanto que dois dos óleos essenciais de *L. alba* testados apresentaram 100% de repelência por mais de 40 horas (Lima et al., em preparação). Weldon et al., (2011), demonstrou em seus ensaios que o limoneno não apresentou atividade repelente sobre ninfas de *Amblyomma americanum*.

A atividade repelente dos óleos essenciais de *Citrus* ssp. não está relacionada com a concentração de limoneno presente no óleo essencial (Tabela 2). O efeito repelente pode estar relacionado à presença de compostos encontrados em menores concentrações. Compostos minoritários do óleo essencial de *C. aurantium* como o β -mirceno tem sido demonstrados 10 vezes mais potentes para tratamento de lesões gástricas do que o limoneno (Moraes et al., 2009; Bonamin et al., 2014). Efeito semelhante pode acontecer com a atividade repelente sobre larvas de *R. microplus*.

O monoterpeno α -terpineol e o mirceno encontrado em baixas concentrações no nosso estudo podem ter contribuído no efeito repelente dos óleos essenciais testados. O efeito repelente de α -terpineol foi observado em *Rhipicephalus appendiculatus* e ninfas de *Amblyomma americanum* (Lwande et al., 1999; Weldon et al., 2011).

Uma série de fatores podem determinar o efeito repelente de compostos ativos contra carrapatos, isso inclui a taxa de evaporação do composto no momento da aplicação, a repelência espacial, a taxa de distribuição do composto para os receptores dos carrapatos e o potencial do composto para ativar o comportamento de repelência (Bissinger e Roe, 2010).

Os óleos essenciais de *Citrus* ssp. apresentaram uma atividade repelente sobre larvas de *R. microplus*. Não foi observada relação entre o tempo de repelência e a concentração de limoneno. Mais estudos são necessários para determinar os compostos bioativos e o desenvolvimento de formulações que ajudem a aumentar o poder de ação, além de diminuir a volatilização dos compostos ativos.

BIBLIOGRAFIA

Adams, R.,P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 4th ed. p. 804.

- Alonso-diaz, M.A., Rodriguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sanches, H., Rosario-Cruz, R., 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch. Med. Vet. 38,105–114.
- Bissinger, B.W., Roe, R.M., 2010. Tick repellents: Past, present, and future. Pestic Biochemand. Physiol. 96, 63–79.
- Bonamin, F., Moraes, T.M., Santos, R.C., Kushima, H., Faria, F.M., Silva, M.A., Junior, I.V., Nogueira, L., Bauab, T.M., Brito, A.R.M.S., Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A., 2014. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of b-myrcene in preventing peptic ulcer disease. Chem-Biol. Interact. 2014, *In press*
- Borges, L.M., Ferri, P.H., Silva, W.J., Silva, W.C., Silva, J.C., 2003. In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. Med. Vet. Entomol. 172, 28–31.
- Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T., 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. Vet. Parasitol. 173, 300–306.
- Choochote, W., Chaithong, U., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Tuetun, B., Champakaew, D., Pitasawat, B., 2007. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes. aegypti*. Fitoterap. 78. 359–364.
- Chutia, M., Bhuyan, P.D., Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah, P., 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. LWT – Food. Sci. and Technol. .42, 777–780.
- Cunha, A.P., Paiva Bello, A.C.P., Domingues, L.N., Martins, J.R., Oliveira, P.R., Freitas, C.M.V., Bastianetto, E., Silva, M. X., Leite, R. C., 2010. Effects of urea on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 174, 300–304.

- Dharmawan, J., Kasapis, S., Curran, P., Johnson, J.R., 2007. Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: freshly-squeezed juice. *Flavour. and Fragr. J.* 22, 228–232.
- Di Bella, G., Serrao, L., Salvo, L., Lo Turco, V., Croce, M., Dugo, G., 2006. Pesticide and plasticizer residues in biological citrus essential oils from 2003–2004. *Flavour. Fragr. J.* 21, 497–501.
- Fisher, K., Phillips, C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends. in Food. Sci. & Technol.* 19, 156-164.
- Gillij, Y.G., Gleiser, R.M., Zygadlo, J.A., 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresour. Technol.* 99, 2507– 2515.
- Hazarika, S., Dhiman, S., Rabha, B., Bhola, R.K., Singh, L., 2012. Repellent Activity of Some Essential Oils Against Simulium Species in India. *J. Insect. Sci.* 12(5), 1-9.
- Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., Brahim, N.B., Sebei, H., 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food. Chem.* 123, 1098–1104.
- Jaenson, T.G.T., Palsson, K., Borg-Karlson, A.K., 2005. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. *Med. Vet. Entomol.* 19, 345–352.
- Lans, C., Turner, N., Khan, T., 2008. Medicinal plant treatments for fleas and ear problems of cats and dogs in British Columbia, Canada. *Parasitol. Res.* 103, 889–898.
- Lovis, L., Perret, J.L., Bouvier, J., Fellay, J.M., Kaminsky, R., Betschart, B., Sager, H., 2011. A new in vitro test to evaluate the resistance level against acaricides of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasit.* 182, 269– 280.

- Lwande, W., Ndakala, A.J., Hassanali, A., Moreka, L., Nyandat, E., Ndungu, M., Amiani, H., Gitu, P.M., Malonza, M.M., Punyua, D.K., 1999. *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. *Phytochem.* 50, 401–405.
- Magadum, S., Mondal, D.B., Ghosh, S., 2009. Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. *Parasitol. Res.* 105, 1085–1091.
- Majnooni, M.B., Mansouri, K., Gholivand, M.B., Mostafaie, A., Mohammadi-Motlagh, H.R., Afanzade, N.S., Abolghasemi, M.M., Piriyaie, M., 2012. Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 498-503.
- Moraes, T.M., Kushima, H., Moleiro, F.C., Santos, R.C., Rocha, L.R.M., Marques, M.O., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem-Biol. Interact.* 180, 499–505.
- Moufida, S., Marzouk, B., 2003. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochem.* 62, 1283–1289.
- Mawela, K.G., 2008. The toxicity repellent properties of plant extracts used in ethnoveterinary medicine to control ticks. Dissertation, University of Pretoria.
- Müller, G.C., Junnila, A., Butler, J., Kravchenko, V.D., Revay, E.E., Weiss, R.W., Schlein, Y., 2009. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *J. of Vector. Ecol.* 34(1), 2-7.
- Naef, R., Velluz, A., 2001. Volatile Constituents in Extracts of Mandarin and Tangerine Peel. *J. Essent. Oil. Res.* 13, 154-157.

- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E., 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 372–378.
- Novelino, M.A.S., Daemon, E., Soares, G.L.G., 2007. Avaliação da atividade repelente do timol, mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(3), 700–704.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Hodgkinson, J.E., Rosado-Aguilar, J.A., Villegas-Perez, S.L., Trees, A.J., 2012. The prevalence of pyrethroid resistance phenotype and genotype in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol.* 184, 221– 229.
- Rehman, Z., 2006. Citrus peel extract: a natural source of antioxidant. *Food. Chemistry.* v. 99, 450-454.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Mata, M.Y., Pérez, G.E., Wagner, G., 2004. The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics. *Trop. Anim. Health. Prod.* 36, 135–143.
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A., Rodriguez-Vivaz, R.I., Borges-Argaez, R., Garcia-Vazquez, Z., Mendez-Gonzalez, M., 2010. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Vet. Parasitol.* 168, 299–303.
- Sharma, V.,P., Ansari, M.,A., 1994. Personal protection from mosquitoes (Diptera: Culicidae) by burning neem oil in kerosene. *J. Med. Entomol.* 31, 105–107.
- Silva, W.C., Martins, J.R.S., Cesio, M.V., Azevedo, J.L., Heinzen, H., Barros, N.M. 2011. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 179, 189–194.

- Tranchida, P.Q., Bonaccorsi, I., Dugo, P., Mondello, L., Dugo, G., 2012. Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour. Fragr. J.* 27, 98–123.
- Van Den Dool, H., Kratz, D.J., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11, 463-467.
- Venkateshwarlu, G., Selvaraj, Y., 2000. Changes in the peel oil composition of Kagzi lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during ripening. *J. Essent. Oil Res.* 12, 50–52.
- Weldon, P.J., Carroll, J.F., Kramer, M., Bedoukian, R.H., Coleman, R.E., Bernier, U.R., 2011. Anointing Chemicals and Hematophagous Arthropods: Responses by Ticks and Mosquitoes to Citrus (Rutaceae) Peel Exudates and Monoterpene Components. *J. Chem. Ecol.* 37, 348–359.

Tabela 1: Composição química dos óleos essenciais de *Citrus aurantium* var. *amara*, *Citrus aurantium* var. *dulcis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus reticulata* var. *tangerine*.

Compostos	<i>C. aurantium</i> var. <i>amara</i>	<i>C. aurantium</i> var. <i>dulcis</i>	<i>C. limon</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. reticulata</i> var. <i>tangerine</i>
Limoneno	96,0	94,0	69,4	55,0	96,4
γ -terpineno	0,0	0,0	9,1	14,8	0,2
α -terpineol	0,2	0,0	0,4	1,2	0,0
α -pineno	0,4	0,4	1,7	1,9	0,5
β -pineno	0,6	0,0	10,5	10,4	0,1
Mirceno	1,5	1,2	1,3	1,2	1,5
o-cimeno	0,0	0,0	1,1	1,7	0,0
Outros	1,3	4,4	6,5	13,8	1,3

Tabela 2: Tempo de repelência sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* e concentração de limoneno dos óleos essenciais de espécies de *Citrus*.

Compostos	<i>C. reticulata</i> var. <i>tangerine</i>	<i>C. limon</i>	<i>C. aurantium</i> var. <i>amara</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. aurantium</i> var. <i>dulcis</i>
Limoneno (%)	96,4	69,4	96,0	55,0	94,0
Tempo de repelência (hs)	4	4	6	6	36

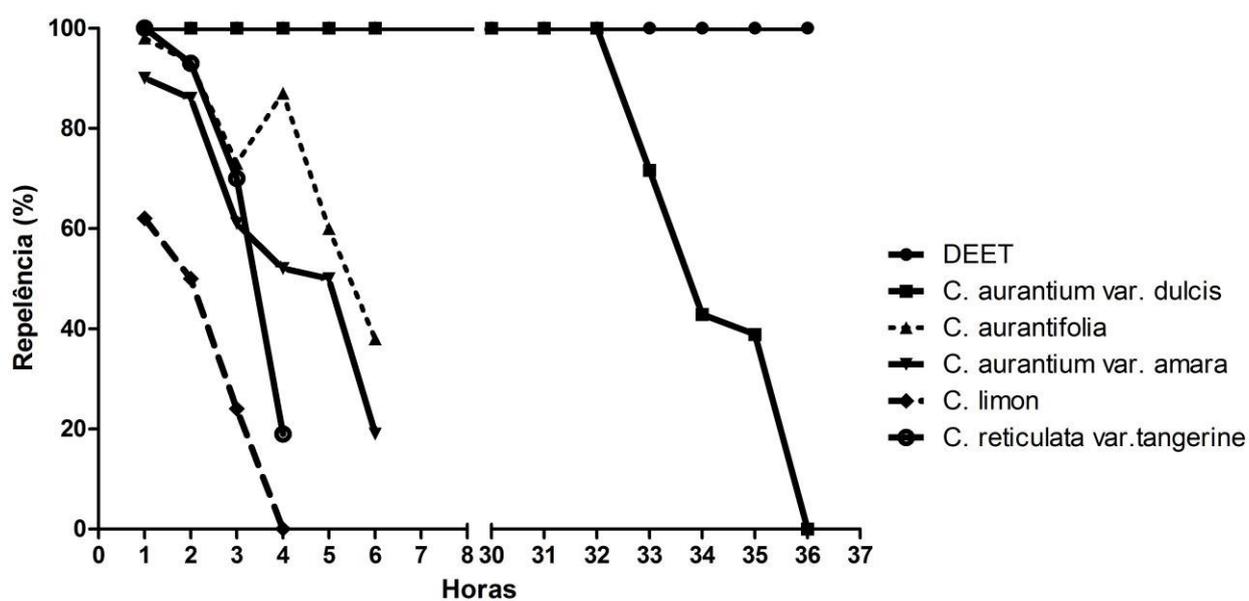


Figura 1: Percentual de repelência de larvas de *Rhipicephalus microplus* dos diferentes óleos essenciais de *Citrus* ssp. e DEET testados na concentração de 6,88 mg/cm².

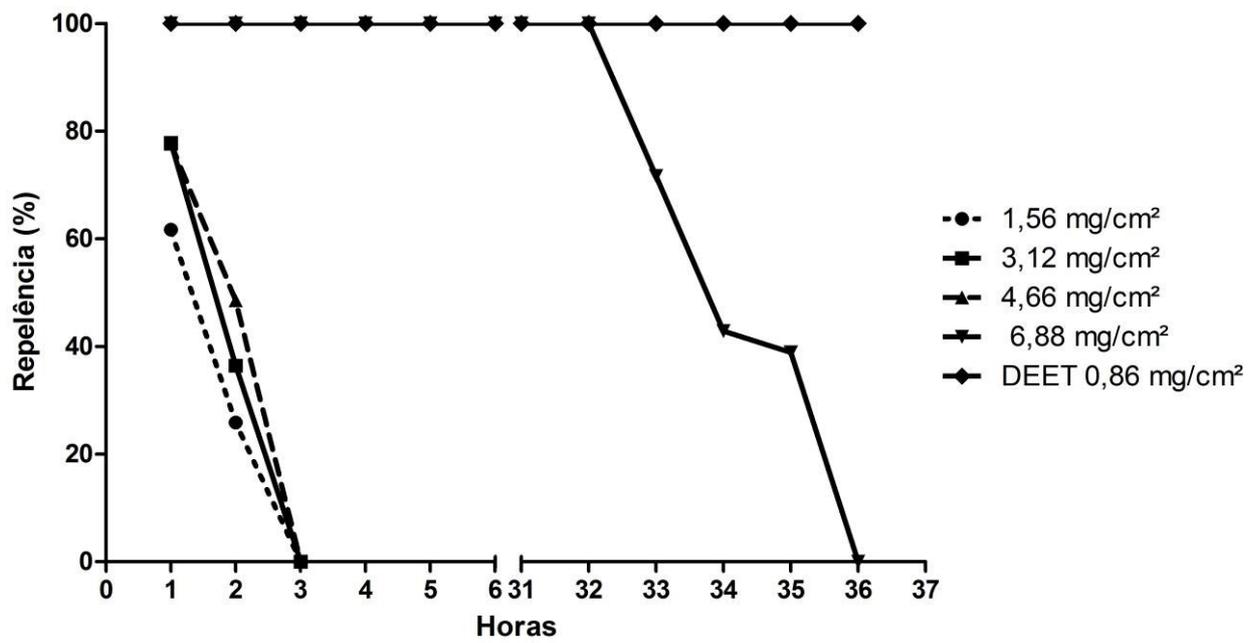


Figura 2: Porcentagem de repelência de larvas de *Rhipicephalus microplus* das concentrações do óleo essencial de *Citrus aurantium* var. *dulcis* e DEET.

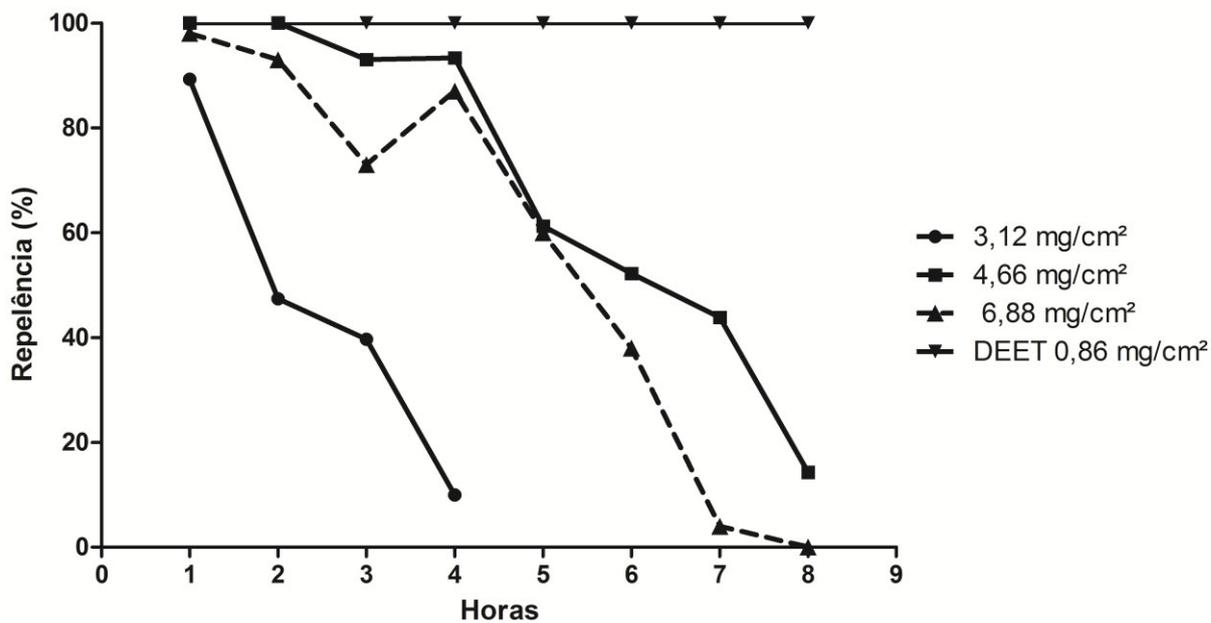


Figura 3: Porcentagem de repelência de larvas de *Rhipicephalus microplus* das concentrações do óleo essencial de *Citrus aurantifolia* e DEE

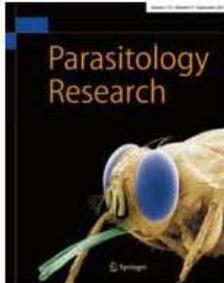
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de frutos de *Piper tuberculatum* apresentaram uma alta atividade carrapaticida sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, demonstrando que os extratos de frutos de *P. tuberculatum* possuem compostos ativos com um grande potencial para produtos com atividade acaricida.

Os óleos essenciais testados apresentaram uma alta atividade repelente sobre larvas de *R. microplus*. O genótipo LA-13 de *L. alba* demonstrou ser um promissor para a produção de uma formulação repelente, que seja capaz de aumentar o seu efeito sobre o hospedeiro.

Os óleos essenciais de *Citrus* ssp. apresentou um efeito repelente sobre larvas de *R. microplus*. Contudo esta ação pode estar relacionada a um efeito sinérgico entre os compostos encontrados no óleo essencial. Mais estudos ainda deveriam ser realizados para um possível desenvolvimento de um produto que seja capaz de diminuir a ação do ambiente sobre o óleo.

NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO 1



Parasitology Research

Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde

Editors: H. **Mehlhorn**; B. **Chobotar**

ISSN: 0932-0113 (print version)

ISSN: 1432-1955 (electronic version)

Journal no. 436

Instructions for Authors

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Costs of Colour Illustrations

- Online publication of color illustrations is always free of charge.
- For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

• Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329

• Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

• Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

• Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

• Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

• Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of

in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

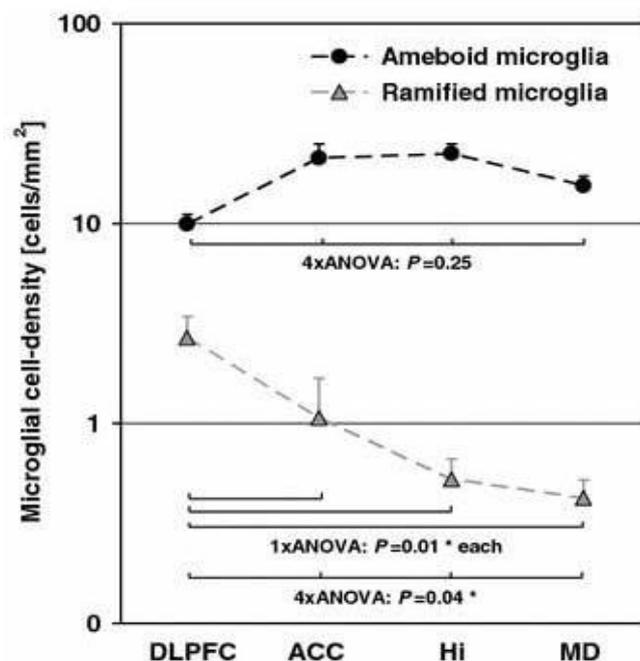
ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



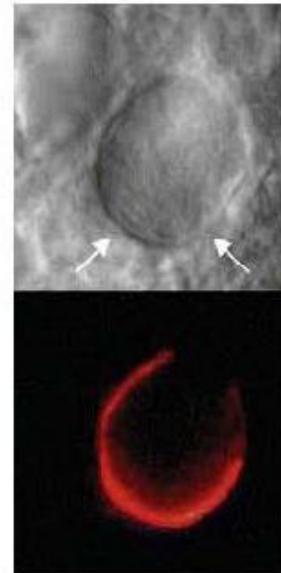
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the

figures are legible at final size.

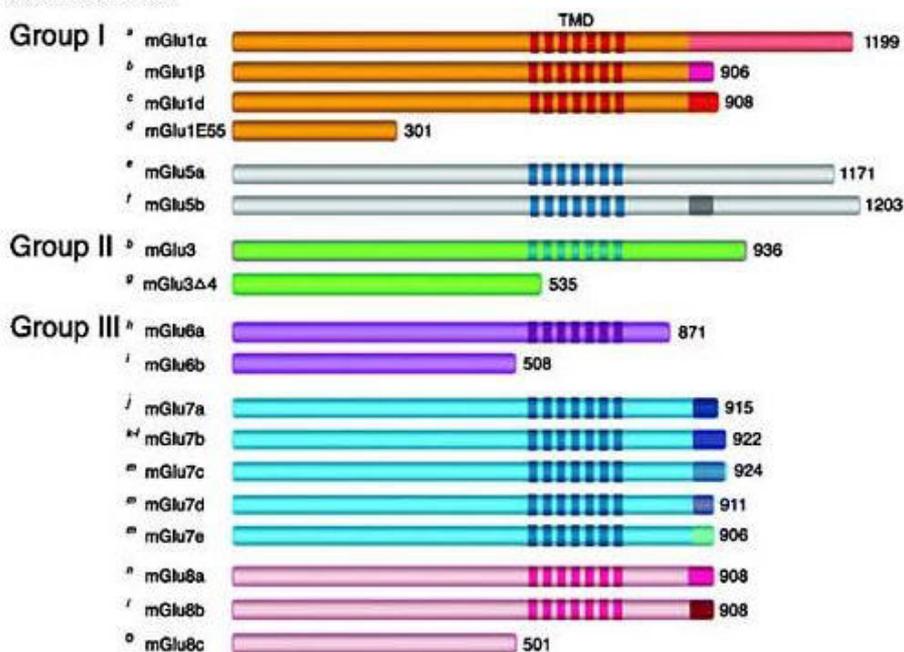
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main

information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

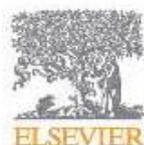


TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0960-8524

DESCRIPTION

Bioresource Technology publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of **bioresource technology**.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of **biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations** and **bioresource systems analysis**, and **technologies** associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis.

For more details, authors should consult the [Subject Classifications](#) in the [Guide for Authors](#).

The Journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

Bioresource Technology does not consider part papers.

AUDIENCE

Biotechnologists, applied microbiologists, chemical and biochemical engineers, process technologists, agro-industrial waste management technologists.

IMPACT FACTOR

2012: 4.750 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/bite>.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 5 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

The Executive Editor first evaluates all manuscripts on technical aspects such as compliance to the Guide For Authors, quality of grammar or English language. Revision can be requested. Manuscripts accepted at this stage are passed to the handling editor who can also reject on the basis of insufficient originality, serious scientific flaws, or because the work is considered outside the aims and scope of the journal. Those that meet the minimum criteria are passed on to experts for review. Referees advise the editor, who is responsible for the final decision to accept or reject the article. **Please note:** Any Editor's decision is final.

Manuscripts previously rejected by the Journal will not be re-considered by the Editors, and therefore will be rejected without review.

PREPARATION

Manuscript Preparation

General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity.

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 15, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts

(see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls* (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <http://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results and Discussion

Results should be clear and concise, and be part of a single section, discussing the significance of the results of the work, not repeat them. Extensive citation and discussion of the published literature should be avoided.

Conclusions

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section (**maximum 100 words**).

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. Each paper should be provided with an abstract of about 100-150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords to be included in an article, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6. The Journal discourages publication of simple one line graphs/figures, pattern figures, conventional spectra (X-ray, FTIR, UV, NMR, etc) and SEM photographs of a routine nature.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. The Journal discourages publication of simple one parameter tables; such information should be preferably described in the text itself.

References

Maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically).

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically, THEN NUMBERED NUMERICALLY, and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

References in the list should be placed first alphabetically, then numbered chronologically.

1. Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.
2. Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.
3. Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.
- 4....

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO	
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 01
PROJETO DE PESQUISA	Registro do CEUA: 01/12
	Nº do Protocolo: 23115 018061 / 2011-01
	Data de entrada no CEUA: 21/12/2011
	Parecer: APROVADO

I – Identificação

Título do projeto: Desenvolvimento de tecnologias para o combate de carrapatos e helmintos utilizando produtos naturais.		
Identificação da equipe executora: Livio Martins Costa Junior, Alberto Jorge Oliveira Lopes, Cleydlene Costa Vasconcelos, Aldilene da Silva Lima, Iara Santos Silva Oliveira, Sandra Alves Araújo, Suzana Gomes Lopes, Ítala Caroline Pereira Duarte Lobo, José Gracione do Nascimento Sousa Filho, Antônio Pereira da Silva Júnior, Josena Rodrigues Sousa, Adalberto A. Perez de León, Adibe Luiz Abdalla, Alana das Chagas Ferreira Aguiar, Alexandra Martins dos Santos Soares, Giselle Cutrim de Oliveira, Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.		
Instituição onde será realizado: UFMA		
Área temática: Não se aplica	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 21/12/2011
Cooperação estrangeira:		Data de devolução

II – Objetivos:

GERAL: Desenvolver tecnologias para o combate de carrapatos e helmintos utilizando produtos naturais diminuindo a contaminação nos alimentos com carrapaticidas e anti-helmínticos sintético.

ESPECÍFICO: Verificar o efeito dos óleos essenciais de *Citrus spp.*, *Croton spp.*, *Lippia spp.* e *Xylopiia spp.* Sobre larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus*, bem como identificar os constituintes principais que podem estar relacionados a essa atividade;

Verificar o efeito de monoterpenos semi-sintéticos oriundos de produtos naturais sobre populações de *R. microplus* resistentes;

Determinar o efeito anti-helmintico de taninos condensados provenientes de extratos de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Clitoria fairchildiana* e *Acacia mangium* sobre caprinos jovens infectados;

Avaliar a infecção helmíntica e qualidade de carcaça de caprinos em sistemas agrosilvopastoril com leguminosas ricas em taninos condensados, e a capacidade de mitigação de metano imposta pela dieta dos animais.

III – Sumário do projeto:

O controle da verminose gastrointestinal dos pequenos ruminantes e dos carrapatos é realizado principalmente com o uso de anti-helmintico. Os produtos químicos disponíveis no mercado utilizados para o controle de helmintos apresentam altos custos, agridem o ambiente, propiciam o surgimento de populações resistentes além de serem tóxicos para o hospedeiro vertebrado, então, o projeto visa contemplar alternativas de controle com intuito de reduzir a incidência de verminoses ou carrapatos e o uso de medicamentos, implicando em diminuição de custo e agregando valor ao produto final. Este projeto busca essa alternativa através de validação de plantas produtoras de princípios ativos com ação acaricida e anti-helmintico

IV -Comentário do relator frente à resolução 779 de 26 de agosto de 2010 e complementares em particular sobre:

- 1- **Subprojeto 1-** Ação acaricida de óleos essenciais de espécies dos gêneros Citrus, Croton, Lippias e Xylopias sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* = Esta etapa não trará sofrimento ou mesmo sacrifício dos animais;
- 2- **Subprojeto 2** – Semi-síntese de monoterpenos de produtos naturais e eficiência sobre populações de *R. microplus* resistentes = Esta etapa não trará sofrimento ou mesmo sacrifício dos animais;
- 3- **Subprojeto 3** – Utilização de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Clitoria fairchildiana* e *Acacia mangium* sobre helmintos gastrintestinais de caprinos = Esta etapa não trará sofrimento ou mesmo sacrifício dos animais;
- 4- **Subprojeto 4** – Desenvolvimento de um sistema agrosilvopastoril, integrando lavoura-produção de caprinos, utilizando leguminosas ricas em taninos condensados – Esta etapa não trará sofrimento embora ocorra o sacrifício dos animais;

V – Pendências

VI – Recomendações:

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

O projeto foi considerado APROVADO, uma vez que atende os requisitos da resolução 779 de 26 de agosto de 2010

São Luís, _____ 02 _____ / _____ Março _____ / _____ 2012 _____


Prof. Dra. Lucilene Amorim

Presidente do CEUA / UFMA